

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SODYUM KANALLARINDA İYON TAŞINIMININ VE TOKSİN  
BAĞLANMASININ MOLEKÜLER MODELLEMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Esra KÖRPE**

**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**  
Anabilim Dalı Başkan V.

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151611011 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Esra KÖRPE**'nin ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**SODYUM KANALLARINDA İYON TAŞINIMININ VE TOKSİN BAĞLANMASININ MOLEKÜLER MODELLEMESİ**” başlıklı tezi **08.12.2017** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

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

**Jüri Üyeleri :** **Doç. Dr. Gökhan BARIŞ BAĞCI (Başkan)** .....  
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

**Yrd.Doç. Dr. Murat ÇAVUŞ** .....  
Bozok 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.

Esra KÖRPE



## ÖZET

Yüksek Lisans

### SODYUM KANALLARINDA İYON TAŞINIMININ VE TOKSİN BAĞLANMASININ MOLEKÜLER MODELLEMESİ

Esra KÖRPE

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

Danışman: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

Tarih: Aralık 2017

İyon kanalları hücrelerde elektriksel sinyalin iletilmesinde önemli rol oynayan membran proteinleridir. İyon kanallarına, bir ligandın bağlanması veya elektriksel bir sinyalin gelmesi membran potansiyelini değiştirirken aksiyon potansiyeli meydana getirir. Açılan bu kanallar  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ya da  $\text{Cl}^-$  gibi belirli bir tip iyonları hücre membranından seçici bir şekilde geçmesine olanak sağlar. Bu kanallar elektronik devrelerdeki transistörler gibi çalışırlar. Bu durum pek çok hücre sinyalinde ortaya çıkarken en temel olanı sinir hücrelerindeki aksiyon potansiyelinin iletilmesidir. İyon kanallarının düzgün çalışmaması veya iyon kanallarında meydana gelen fonksiyonel bozukluklar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu bozukluklar gen kodlarında meydana gelen kanal proteinlerinin mutasyonu ya da çevresel etkilerden mütevelliddir. Bu yüzden iyon kanalları tedavi edici ilaçlar için önemli hedef protein yapılarıdır. Yapısal bilgi, model çalışmaları için temel teşkil eder; ancak kanalların nasıl çalıştığına tamamıyla anlaşılmasında yeterli değildir. Kanal fonksiyonlarının birçok özelliğine deneysel olarak doğrudan ulaşılabilirken bilgisayar destekli simülasyonlarda kanal proteinlerinin yapı ve fonksiyonuna ilişkin bilgilere ulaşılabilir. Bu çalışmada kristal yapısı var olan sodyum voltaj-kapılı iyon kanallarındaki iyon geçiş mekanizması moleküler dinamik simülasyonları

yöntemiyle aydınlatılmaya çalışılırken, aynı zamanda bu kanallara ligand bağlanmasının araştırılması için serbest enerji hesaplamaları yapılmıştır. Serbest enerji hesaplamaları seçilen bir reaksiyon koordinatı boyunca Şemsiye Örnekleme Metodu kullanarak kuvvet alanları potansiyeli (PMF) hesabından elde edilecektir. Şemsiye Örnekleme Metodu önceden tanımlanmış reaksiyon koordinatları boyunca uygulanan bir simülasyon metodudur. Bu metotta, reaksiyon koordinatları boyunca şemsiye potansiyelin farklı yerleşimlerinde çok sayıda simülasyon çalıştırılır. Her simülasyonun örneklemelemeden uygulanan potansiyel enerji ile temsil edilen popülasyon değerleri ortaya çıkarılır. Elde edilen popülasyonu (yoğunluk fonksiyonu) Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemi (WHAM) kullanılarak reaksiyon koordinatı boyunca birleştirilir. Yapılan WHAM analizinden de serbest enerji profiline geçilir. Ayrıca çalışmada kristal yapısı henüz ortaya çıkarılmamış olan memeli sodyum voltaj kapılı iyon kanallarından Nav1.4 kanalının homoloji modellemesi üzerine de çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmaların sonucunda elde edilmiş olan kompleks yapılar ve serbest enerji hesaplamaları sodyum iyonlarının bağlanma bölgeleri hakkında detaylı bilgi verirken, iyon koordinasyonları ve iyon geçirgenliği hakkında da bilgi vermektedir. Ligand bağlanmasıyla elde edilen sonuçların sodyum kanallarının inhibasyonunun açıklanmasında ve bu kanalları bloke eden ilaçların geliştirilmesi çalışmalarında şablon olması bakımından yararlı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler dinamik simülasyonu, Homoloji modellemesi, Serbest enerji hesabı, Sodyum kanalları.



## **ABSTRACT**

Master of Science

### **MOLECULAR MODELLING OF ION TRANSPORT AND TOXIN BINDING IN SODIUM CHANNELS**

Esra KÖRPE

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

Ion channels are membrane proteins that play an important role in the transmission of electrical signals in cells. The binding of a ligand or an electrical signal to the ion channels allows these channels to open as the membrane potential changes. These channels allow certain type of ion such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Cl}^-$  to cross from the cell membrane. These channels work like transistors in electronic circuits. While this occurs in many cell signals, the most basic is the transmission of the action potential in nerve cells. Functional disorders that occur in the ion channels due to mutation of channel proteins that occur in gene codes or environmental effects have been associated with many diseases. So ion channels are an important target for therapeutic drugs. Structural information is the basis for model work, but it is not enough to fully understand how the channels work. While many features of channel functions can not be reached directly experimentally, computer-aided simulations can provide information on structure and function of channel proteins. In this work, ion transition mechanism of sodium voltage-gated ion channels with crystal structure was tried to be elucidated by molecular dynamics simulations. At the same time, free energy calculations were carried out to investigate ligand binding to these channels. Free energy calculations will be obtained from the calculation of the force field

potential (PMF) using the Umbrella Sampling Method over a selected reaction coordinate. The Umbrella Sampling Method is a simulation method applied over predefined reaction coordinates. The free energy profile is also passed from the WHAM analysis. In this method, a large number of simulations are run at different locations of the umbrella potential along the reaction coordinates. The population values represented by the potential energy applied from the samples of each simulation are revealed. The resulting population (density function) is combined along the reaction coordinate using the Weighted Histogram Analysis Method. In addition, studies have also been conducted on homology modeling of the Nav1.4 channel from mammalian sodium voltage-gated ion channels for which crystal structure has not been revealed. The complex structures and free energy calculations obtained as a result of the studies carried out provide detailed information on the binding sites of sodium ions and also provide information on ion coordination and ion permeability. It is believed that inhibition of the sodium channels of the results obtained by ligand binding will be explained and that these channels will be useful in the development of blocking drugs in order to be a template.

**Keywords:** Molecular dynamic simulation, Homology modeling, Free energy calculations, Sodium channel.

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Prof. Dr.Turgut BAŞTUĞ'a, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Dr.Serdar KUYUCAK ve Dr. Murat ÇAVUŞ'a, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı 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, sağladıkları kaynaklardan dolayı TRUBA'ya ve NCI Avustralya'ya teşekkürü bir borç bilirim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ix
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	x
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	xi
<b>KISALTMALAR</b> .....	xii
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	xiii
<b>1 GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Uyarılabilir Hücreler .....	5
1.2 Voltaj Kapılı Sodyum İyon Kanalları .....	6
<b>2 TEORİ</b> .....	<b>7</b>
2.1 Moleküler Dinamik .....	7
2.2 Kuvvet Alanı .....	7
2.3 MD Simülasyonlarının Çalışması .....	8
2.4 Serbest Enerji Hesabı .....	9
2.5 Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF).....	9
2.6 Docking Çalışmaları.....	10
<b>3 NavMs KANALI İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>13</b>
3.1 Giriş.....	13
3.2 NavMs Sodyum Kanalının MD Simülasyonu.....	14
3.3 Protein Sisteminin Dengeye Getirilmesi .....	15
3.4 NavMs Kanalına Ligand Bağlanması İncelenmesi.....	23
3.4.1 Tetrodotoksin (TTX).....	23
3.4.2 NavMs ve tetrodotoksin sisteminin kurulması.....	24
3.5 PMF Hesaplamaları.....	27
3.6 Sonuç ve Tartışma.....	30
<b>4 Nav1.4 KANALININ HOMOLOJİ MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ ....</b>	<b>35</b>
4.1 NavMs Kanalından Nav1.4 Kanalının Modellenmesi .....	35
4.2 NavPas Kanalı ile Yapılan Çalışmalar .....	37
4.3 NavPas ve Nav1.4 Kanalları için Yapılan PMF Hesaplamaları .....	42
4.4 Sonuç ve Tartışma.....	43
<b>5 SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>53</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : Nav kanallarının yapısının temel gösterimi (Yu ve ark., 2005).....	6
Şekil 3.1 : NavMs yapısının kanal kısmının üstten görüntüsü (Bagneris ve ark.,2014) .....	13
Şekil 3.2 : NavMs sistemi .....	15
Şekil 3.3 : NavMs Sisteminin yoğunluk-zaman grafiği .....	17
Şekil 3.4 : NavMs protein yapısının omurga atomlarının 300 ns'lik MD boyunca RMSD değeri.....	17
Şekil 3.5 : Sistemin dengeye gelme işlemi sürecinde her bir protein zincirinin omurga yapısının atomlarının RMSD grafiği.....	18
Şekil 3.6 : (a) Protein yapı ile birlikte z eksenı boyunca (+30 Å ile -30 Å aralığında) su molekülleri (b) Kanal içinde bulunan bir sodyum iyonunun (c) İki sodyum (d) Üç sodyum iyonunun kanal içindeki görüntüleri.....	19
Şekil 3.7 : (a) Kanal içine giren iyonların z koordinatları ve (b) onların histogram eğrileri .....	20
Şekil 3.8 : (a) Kanal içinde bulunan 3 iyonun z koordinatları ve (b) onların histogram eğrileri .....	20
Şekil 3.9 : (a) Kanal içinde bulunan 4 iyonun z koordinatları ve (b) onların histogram eğrileri .....	21
Şekil 3.10: Tetrodotoksinin moleküler yapısı .....	24
Şekil 3.11: (A) NavMs ve tetrodotoksin kompleksinin Autodock ile elde edilen görüntüsü (B) Kompleksin MD sonucu elde edilen görüntüsü .....	26
Şekil 3.12: NavMs ve TTX kompleksinden elde edilen PMF grafiği.....	28
Şekil 3.13: (a) Filtrede bir iyon varken (b) Filtrede iki iyon varken (c) Filtrede üç iyon varken hesaplanan PMF grafikleri .....	29
Şekil 3.14: Bir iyon PMF hesabı için iyon etrafındaki su miktarlarının değişimi .....	31
Şekil 3.15: (a) 1. iyon (b) 2. iyon için etrafındaki su miktarlarının değişimi. 2. iyon aşağı yönde (-30 Å, 4 Å) çekilirken, 1. iyon kanalda durmaktadır. 2. iyon kanalda iken 1. iyon yukarı doğru (5 Å,+30 Å) çekilmektedir. ....	32
Şekil 3.16: 3 iyon PMF hesabında (a) 1. iyonun (b) 2. iyonun (c) 3. iyonun etrafındaki su miktarlarının değişimi. ....	33
Şekil 4.1 : NavMs kanalından modellenen Nav.1.4 kanalı .....	35
Şekil 4.2 : Seçici filtrede bulunan rezidülerin kendi aralarında yaptıkları bağ uzunlukları ve zamanla değişiminin gösterilmesi .....	36
Şekil 4.3 : NavPas iyon kanalı (Shen ve ark., 2017).....	38
Şekil 4.4 : NavPas ve Nav.14 kanalları arasında yapılan RMSD hesabı .....	40
Şekil 4.5 : NavPas-Nav1.4 kanallarının sekanslarının hizalanması .....	41
Şekil 4.6 : NavPas tek iyon PMF .....	42
Şekil 4.7 : Nav1.4 tek iyon PMF grafiği .....	43





## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 3.1 : Sistemi denge haline getirme işleminde uygulanan kuvvet sabiteri ve kuvvet sabitlerinin uygulandığı süreler .....	16
Tablo 3.2 : (A) Filtrede iki iyon varken (B) Filtrede 3 iyon varken İyon (1)'in su ve proteinle koordinasyonu .....	22
Tablo 3.3 : (A) Filtrede iki iyon varken (B) Filtrede üç iyon varken İyon (2)'nin su ve proteinle koordinasyonu .....	22
Tablo 3.4 : Filtrede üç iyon varken İyon (3)'ün su ve proteinle koordinasyonu .....	23
Tablo 3.5 : NavMsve TTX kompleksi için MD ve AutoDock sonucu elde edilen bağlar .....	26
Tablo 4.1 : NavMs ve Nav1.4 kanalları arasındaki sekansların hizalanması .....	37



## KISALTMALAR

<b>Nav</b>	: Sodyum Voltaj Kapılı İyon Kanalları
<b>NavMs</b>	: Magnetococcus Marinus Sodyum Voltaj Kapılı İyon Kanalı
<b>Nav1.1-9</b>	: Memeli Sodyum Voltaj Kapılı İyon Kanalı
<b>AP</b>	: Aksiyon Potansiyeli
<b>SF</b>	: Seçici Filtre
<b>DEKA</b>	: Memeli Kanallarındaki seçici filtre bölgesi
<b>EEEE</b>	: Bakteriyel Kanallardaki seçici filtre bölgesi
<b>TTX</b>	: Tetrodotoksin
<b>MD</b>	: Moleküler Dinamik
<b>VMD</b>	: MD için kullanılan görüntüleme yazılımı (Software for visualization of molecular dynamics)
<b>NAMD</b>	: Nanoboyutta MD için kullanılan yazılım (Software for nanoscale MD)
<b>POPC</b>	: Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine
<b>NPT</b>	: Sabit parçacık sayısı, basınç ve sıcaklık
<b>NVT</b>	: Sabit parçacık sayısı, hacim ve sıcaklık
<b>PDB</b>	: Protein Data Bankası
<b>RMSD</b>	: Root Mean Square Seviation
<b>CHARMM</b>	: Chemistry at Harvard macromolecular mechanics
<b>COM</b>	: Center of Mass
<b>WHAM</b>	: Weighted Histogram Analysis Method
<b>NMR</b>	: Nükleer Manyetik Rezonans
<b>LJ</b>	: Lennard-Jones
<b>US</b>	: Şemsiye Örnekleme (Umbrella Sampling)
<b>FEP</b>	: Free Energy Perturbation
<b>TI</b>	: Thermodynamic Integration
<b>SMD</b>	:Steered Molecuar Dynamic
<b>CADD</b>	: Computer Aided Drug Design



## SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$b$	Atomlar arası mesafe
$b_0$	Bağın denge uzunluğu
$K_b$	Bağın rijitlik uzunluğu
$\Delta G$	Gibbs serbest enerjisi
$\theta$	İki bağ vektörü arasında kalan açı
$\theta_0$	Denge halindeki bağ açısı
$K_\theta$	Bağın rijitlik geometrisi
$X$	Dihedral sayısı
$K_x$	Bariyer yüksekliğini belirleyen enerji parametresi
$N$	Periyodiklik
$\Sigma$	Faz
$q$	Atomlar üzerindeki net yük
$R_{ij}$	$i$ ve $j$ arasındaki uzaklık
$R_{\min,ij}$	LJ enerjisinin minimum olduğu uzaklık
$r_{ij}$	Uzaklık
$\epsilon_0$	Dielektrik boşluk sabiti
$\epsilon_{ij}$	Etkileşen atomlar için bir parametre
$\pi$	Pi sayısı
$m$	Kütle
$T$	Sıcaklık
$U$	Potansiyel enerji
$H(\lambda)$	Sistemin Hamiltoniyeni
$k_i$	$i$ 'nin kuvvet sabiti
$\lambda_i$	$i$ 'nin merkezi
$K_d$	Bağlanma sabiti
$N_A$	Avagadro sayısı
$w$	Enerji
$r$	Konum
$t$	Zaman
$R$	Yarıçap
$N$	Atom sayısı
$k_B$	Boltzman sabiti



## 1 GİRİŞ

Sodyum kanalları nöronlar, kas ve kardiyak hücreleri gibi uyarılabilir hücreler için oldukça önemli bir rol oynamaktadırlar (Hille ve ark., 2001). Bu kanallara oluşturan proteinlerde meydana gelen genetik mutasyonlar ya da çevresel nedenlerle oluşan işlev bozuklukları epilepsi (Steinlein ve ark., 2014), kronik ağrı (Hoeijmakers ve ark., 2015; Waxman ve ark., 2014) ya da iskelet kası kanalopatileri (Jurkat-Rott ve ark., 2010) gibi birçok hastalığa (Ashcroft ve ark., 2000; Brunklaus ve ark., 2014) neden olmaktadır. Önde gelen belirgin rollerinden dolayı Nav kanalları farmakolojide dikkat çeken ve terapötik (Clare ve ark.,2000; Catterall ve ark., 2014; Remme ve ark., 2014) olarak potansiyel hedef yapılar haline gelmiştir. Birçok molekül örneğin peptidler, kimyasal bileşikler bu kanallara hedef ligand olarak seçilmiştir ve ilgili hastalıkların tedavisinde potansiyel ilaç adayı olmak üzere çalışılmaktadır (Twede ve ark.,2009; French ve ark., 2004; Lewis ve ark.,2004) (Knapp ve ark., 2012; Norton ve ark., 2010; Zuliani ve ark., 2012). Hedef kanal için ligandların seçiciliği onları ilaçlara dönüştürmek için önemli bir faktördür. Bu amaca ulaşmak için ligand-kanal kompleksi hakkında moleküler düzeyde bilgi sahibi olunması gerekir (Zuliani ve ark., 2015). Geleneksel deneme-yanılma yaklaşımını kullanarak yeterli seçiciliğe sahip güçlü bir analog tasarlamak oldukça karmaşık ve zaman alıcı bir yoldur. Bilgisayar destekli hesaplama teknikleri, ligand-kanal kompleksleri hakkında bilgi vererek bu işlemi kolaylaştırabilir, daha güçlü ve seçici analogların rasyonel tasarımına yol açabilir.

Bu tezde bilgisayar destekli hesaplama metotları yardımıyla voltaj kapılı sodyum iyon kanallarına ligand bağlanması, iyon geçiş mekanizmalarının aydınlatılması ve henüz kristal yapısı bulunmayan voltaj kapılı memeli sodyum iyon kanalları için homoloji modelinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Teze başlanıldığında ökaryotik bir voltaj kapılı sodyum kanalının kristal yapısının olmayışı ve bakteriyel kanallara ilişkin deneysel çalışmaların fazlalığı nedeniyle prokaryotik organizmalar homoloji modelinde şablon olarak seçilmiştir. Böylece başlangıçta voltaj kapılı bakteriyel kanal olan NavMs (PDB kodu: 4CBC) (Bagneris ve

ark.,2014) incelenmiştir ve daha sonra hamam böceğinden izole edilen NavPas (PDB kodu: 5X0M) (Shen ve ark., 2017) kanalı incelenmiştir. Her iki yapıdan da türetilen homoloji modelleri için ligand bağlanması ve yapının kararlılığı incelenmiştir. Sonuçlar, ökaryotik bir canlıdan alınan NavPas kanalının memeli voltaj kapılı sodyum kanalları için daha iyi bir şablon olduğunu göstermiştir. Tezin ana bölümü olarak homoloji modelinde şablon, seçilen sodyum kanallarının iyon geçirme mekanizmaları ve ligand bağlanması verilmiştir. Sonuçlar, memeli sodyum kanalları ve toksin bağlanması hakkında yapısal ve işlevsel bilgi sağlarken; sodyum kanallarını hedef alan güçlü ve seçici ilaçların tasarımı için de oldukça yararlı olacağı düşünülmektedir. Vücuttaki fizyolojik işlevlerin çoğu aksiyon potansiyellerini başlatan ve yayabilen uyarılabilir hücrelere bağlıdır. İyon kanalları elektrik sinyallerinin uyarılabilir hücrelerde iletilmesi için oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Hille ve ark., 2001). Membran potansiyelinde meydana gelen değişikliklerle kanal iyon geçişini sağlar; iyon kanallarında iyon akışı tıpkı bir transistörden akım geçmesi gibidir. İyon kanallarının disfonksiyonu sayısız hastalıklarla (Ashcroft ve ark., 2000; Brunklaus ve ark., 2014) ilişkilendirilmektedir, bu nedenle iyon kanalları terapötik müdahale için önemli hedeflerdir (Jensen ve ark., 2005; Wulff ve ark., 2009; Clare ve ark., 2010). Yüksek afinite ve seçicilikte iyon kanallarına bağlanan bileşiklerin bulunması ilaç endüstrisi için devam eden bir ilgiye sahiptir. Doğada, zehirli hayvanlardan elde edilen toksinler bu spesifik iyon kanallarına yüksek afiniteyle bağlanabilmektedir (Miller ve ark., 1995; Terlau ve ark., 2004; Rodriguez ve ark., 2004; Al-Sabi ve ark., 2006; King ve ark., 2008; Mouhat ve ark., 2008; Klint ve ark., 2012). Bu özellikleri ile, ilaç olarak geliştirilebilen, güçlü ve seçici analoglar tasarlamak için zengin bir peptid kaynağı sağlarlar. İlaç tasarımıdaki ilerleme, iyon kanallarının yapıları ve bunların toksin blokerleri ile komplekslerinin bulunması sayesinde son derece hızlandırabilir.

Zar proteinlerinin yapısını belirlemek, genel olarak zor bir görevdir. Düşük dielektrik lipid ortamında gömülü oldukları için onları kristalleştirmek çok zordur. Aynı zamanda, NMR tekniği bu kadar büyük makromoleküllerin yapısını bulmak için verimli değildir. İlk kristal yapı çalışmaları biyolojik iyon kanalları üzerinedir (Doyle ve ark., 1998). Bu çalışmaları bakteriyel potasyum kanallarının yapısının belirlenmesi takip etmiştir (MacKinnon ve ark., 2003), daha sonra memeli voltaj kapılı K<sub>v</sub>1.2 kanalının kristal yapısı elde edilmiştir (Long ve ark., 2005). Bir sonraki



büyük bir başarının gerçekleşmesi on yıl sonra bakteriyel bir voltaj kapılı sodyum kanalının yapısının çözülmesi ise gerçekleşmiştir(Payandeh ve ark., 2011). Başka türlerde örneğin mekanik duyarlı ve klorür kanalları gibi kanalların yapısı da tespit edilmiştir (Chang ve ark., 1998; Dutzler., 2002). Bu gelişmelere rağmen, zar proteinlerinin kristallendirilmesi çok zor bir iş olmayı sürdürmektedir ve memeli sodyum kanalları, kalsiyum kanalları ve nikotinik asetilkolin reseptörü gibi birçok önemli kanalın yapıları henüz belirlenememiştir. Tüm bu kanallar terapötik amaçlı olarak yüksek ilgi görmektedir; ancak yapılarının yakın gelecekte belirleneceği olasılığı düşük gibi görünmektedir. Bu nedenle bu kanalların yapısı ve fonksiyonuna dair elde edilen tüm veriler yüksek önem arz etmektedir. Bu noktada bilgisayar destekli hesaplamalar örneğin homoloji modellemesi ve biyoinformatik çalışmalar oldukça faydalı olacaktır.

Hesaplamalı yöntemler, iyon kanallarının işlevi ve toksinlerin bunlara nasıl bağlanıp bloke ettiğini anlamak için çok yardımcı olmaktadır. Bu amaca ulaşmak için, hedef kanalın atomik yapısına ve toksin bağlanmış kompleks yapıya ihtiyacımız vardır. Kanal proteini kristalleştirilebilirse, atom yapısı X-ışını kırınımı ile elde edilebilir. Aksi takdirde, bilinen yapılara dayanan yapıyı tahmin eden homoloji modellemesine güvenilmelidir. Son yıllarda geliştirilen hesaplama yöntemleri ve algoritmalar sayesinde, homolog yapıların varlığında bir proteinin veya bir protein-ligand kompleksinin yapısı tahmin edilebilmektedir. Elbette, proteinler ve kompleksleri için bu tür modellerin tahminleri mevcut deney verileri ile karşılaştırılarak doğrulanmalıdır. Doksanlardaki küme mimarisi ve paralel hesaplamaların getirilmesi bilgisayar gücünü büyük ölçüde arttırdı. Bu, özellikle biyomoleküller gibi kompleks sistemler ile çalışılması için oldukça önemlidir. Biyomoleküler bir sistemin yapısı ve hareketleri hakkında doğru bir tanıma sahip olmak için moleküler dinamik (MD) simülasyonları yoluyla atomik seviyede bir muamele ve simülasyon sisteminin yeterli örneklemesine ihtiyaç duyulmaktadır. Birkaç bin atomdan oluşan bir protein sisteminin rutin simülasyonu kümeler tarafından sağlanan yüksek performanslı bilgi işlem gücü olmadan birçok mikrosaniye için mümkün olmazdı. Yazılım alanında AMBER (Pearlman ve ark., 1995), NAMD (Kale ve ark., 1999) gibi programlar geliştirilirken kuvvet alanları için AMBER (Cornell ve ark., 1995), ve CHARMM (MacKerell ve ark., 1998), MD başlangıcından bu yana geliştirilmeye devam etmektedir. Doğru protein-ligand kompleks modelleri üretmek, MD simülasyonlarını

bir docking programı ile birleştirerek mümkün kılar (Alonso ve ark., 2006). Son olarak, belirli bir protein-ligand için bağlanmanın standart serbest enerjisini tahmin etmek ve kimyasal doğruluk yakınında bir mutasyona bağlı bağlanma serbest enerjisindeki değişimi belirlemek için serbest enerji simülasyonları yapılabilir (Gilson ve ark., 2007; Deng ve ark., 2009; Christ ve ark., 2010; Steinbrecher ve ark., 2010).

Bu tezde, voltaj kapılı sodyum iyon kanallarının yapılarının ve iyon geçiş mekanizmalarının aydınlatılması, ayrıca ligand ile etkileşimlerinin incelenmesi için bilgisayar destekli hesaplama yöntemleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Voltaj kapılı bakteriyel sodyum iyon kanalı ile yapılan çalışmada, bu kanalın iyon geçiş mekanizmasının yanısıra ligand bağlanmasından elde edilen sonuçlar, memeli sodyum kanallarının çalışma mekanizmasını anlamak için de yararlı olacağı öngörülmüştür. Ayrıca bakteri benzeri olan ve bir memeli sodyum kanal homolojisi modelinde şablon olarak kullanılan bakteriyel kanalların incelenmesi bir gerekliliktir. Tez aşamasındayken yeni bir voltaj kapılı sodyum iyon kanalı yapısının bulunması ile homoloji modellemesinde kullanılabilecek ikinci bir yapı (NavPas) ortaya çıkmıştır. NavPas kanalının da NavMs kanalı gibi iyon geçişi ve Nav1.4 kanalı ile benzerliği incelenmiştir. İki farklı kanalın baz olarak kullanıldığı memeli sodyum kanalları üzerine yaptığım tezin sonuçları, memeli sodyum kanallarının araştırılması için bir başlangıç noktası oluşturmaktadır. Sodyum kanallarının yapısının tam olarak belirlenebilmesi için daha ileri hesaplama ve deneysel çalışmalarla birlikte oluşturulmaları gerekir.

Bu çalışma 115Z505 numaralı “Sodyum Kanallarına (Nav1) Toksin Bağlanmasının Moleküler Modellemesi” başlıklı TÜBİTAK projesi kapsamında yapılmıştır. Proje kapsamında memeli sodyum kanallarının homoloji modellerinin oluşturulması ve oluşturulan kanallara toksin bağlanması hedeflenmiştir. Homoloji modeline alt yapı oluşturacak kristal yapısı mevcut sodyum (NavMs ve NavPas) kanallarının yapı ve fonksiyonunun anlaşılması gerekmektedir. Bu tezde yapılan çalışmalar bu kanallarda iyon taşınımı ve toksin bağlanmasının moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır.

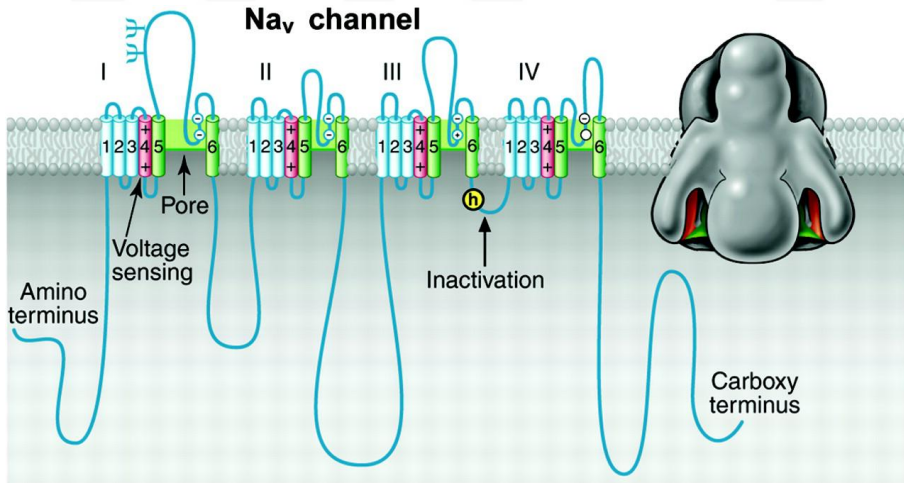
## 1.1 Uyarılabilir Hücreler

Uyarılabilir hücreler aksiyon potansiyelini (AP) üretmek ve yaymak için tasarlanmıştır. Aksiyon potansiyeli biyolojik sistemlerde gerçekleşen kaslarda kasılma, aksonlarda sinir uyarıları ve hücre iletişiminden elektriksel olaylardan meydana gelir. Hücre zarı hücreyi çevreleyen ve birçok çözünen maddeye karşı bir bariyer görevi gören bir lipid çift katmanından oluşur. Çift tabakadaki lipid moleküllerinin baş grupları polar gruplar olup kuyruk hidrokarbon grupları birbirine bakar ve ortada bir hidrofobik bölge oluşturarak hücrenin içinde ve dışındaki suyla hidrofilik bir arayüz oluşturur. İyonlar ve yüklü moleküller, yüksek dielektrik su ortamından düşük dielektrik hidrokarbon ortamına geçmek için büyük bir enerji bariyeri ile karşı karşıyadırlar. Bu bariyer, yüklü parçacıkların çift tabakadan geçmesini önler. İyon taşınması membrana gömülü olan özelleşmiş biyomoleküller tarafından gerçekleştirilir. İyon kanalları, elektrokimyasal gradyanlar yönünde iyonların pasif olarak taşınımı için su dolu yollar sağlarken, taşıyıcı kanallar molekülleri elektrokimyasal gradyanlara karşı hareket ettirmek için ATP ya da membranda depolanmış potansiyel enerjiyi kullanırlar. Zar boyunca iyonların farklı gradyan derecesi, tüm hücrelerin membran boyunca potansiyel bir fark getirir. Bir hücrede yüksek konsantrasyonda  $K^+$  iyonu ve dışarıda yüksek oranda  $Na^+$  iyonu konsantrasyonu vardır, bu durum değeri iskelet kası hücrelerinde  $-90$  mV, sinir hücrelerinde  $-70$  mV, düz kas hücrelerinde  $-50$  mV ile  $-60$  mV, sağ bizi hücrelerinde ise  $-10$  mV ile  $-20$  mV olan ve dinlenme potansiyeli olarak adlandırılan bir sonuç ortaya çıkarır. Bu durum uyarılabilir hücrelerde, voltaj kapılı iyon kanalları gibi iyon kanallarının uyarılması ve işlevi yoluyla değişebilmektedir. Hücreler vücudun dışından bilgi sağlayan ısı gibi dış uyaranlara veya sinir hücrelerindeki aksiyon potansiyeli gibi uyarıcı yardımıyla uyarılabilir. Voltaj kapılı sodyum ( $Na_v$ ) kanalları, depolarizasyon denilen aksiyon potansiyelinin yükselen fazından sorumludur. Burada, bir uyaran, membran potansiyelini küçük bir miktarda (sodyum kanalları için tipik olarak  $+30$  mV) değiştirdiğinde,  $Na_v$  kanalları açık hale gelir ve sodyum iyonları, dışarıdan hücre içine geçer dolayısıyla zar potansiyelini ileri yönde artırır. Zar potansiyelindeki değişim voltaj kapılı potasyum kanallarının açılmasına neden olur ve potasyum iyonları içten dışa doğru hareket eder. Bu da zar potansiyelini düşürür ve nihayetinde dinlenme potansiyeli değerine getirir. Bu kanallar stokastik olarak kapanır, ancak depolarizasyon diğer komşu sodyum

kanalları tarafından hissedilir, AP bir sonraki kısma geçer ve aksiyon potansiyeli ilerleyerek devam eder.

## 1.2 Voltaj Kapılı Sodyum İyon Kanalları

Voltaj-kapılı sodyum iyon kanalları yardımcı beta-alt birimleri içeren alfa-alt birimlerinden oluşmaktadır (Catterall ve ark., 2000). Yapının gözeneklerini oluşturan alfa-altbirimi kanalın fonksiyonel ifadesi için yeterlidir; ancak kanalın kinetiği ve kapının voltaja duyarlılığı beta-altbirimi tarafından kontrol edilir. Beta-altbirimleri aynı zamanda kanalın lokalizasyonu, hücre dışı matris ve hücre içi iskelet arasında moleküllerin adezyonunun etkileşimini de sağlar. Alfa-altbirimleri domain (DI-DIV) olarak adlandırılan dört kısımdan meydana gelmektedir. Bunlardan her birisi de dışarıdan ve içeriden birbirine bağlı altı alfa-heliks (S1-S6) yapısı içerir. Çok büyük bir parça olan pore-loop olarak adlandırılan kısım ise S5 ve S6 helikslerinin arasında seçici filtre kısmını da içeren bir bölgeyi oluşturur. Her domainde bulunan S4 bölgesi ise her üçüncü pozisyonda bir pozitif aminoasit içeren bir bölgedir ve kanalın voltaj sensörü kısmını oluşturur (Catterall ve ark., 2005). Kanalın temel yapısının gösterimi Şekil 1.1 'de verilmiştir.



Şekil 1.1: Nav kanallarının yapısının temel gösterimi (Yu ve ark., 2005).

## 2 TEORİ

### 2.1 Moleküler Dinamik

Moleküler Dinamik bir atom sisteminin dinamiklerini takip etmek için temel bir yöntemdir. Bu yöntem başlangıç koordinatlarını ve kuvvet alanı parametrelerini kullanarak Newton'un hareket denklemlerinin çözülmesini esas alarak çalışılır. Ek araçlar kesilme olmaksızın elektrostatik etkileşimleri hesaplamak ve sistemi belirli bir sıcaklık ve basınçta tutmak için kullanılır. MD simülasyonları gerçekleştirmek için gerekli temel bileşenler aşağıdaki bölümlerde tartışılmıştır.

### 2.2 Kuvvet Alanı

Kuvvet alanı, atom koordinatlarının bir fonksiyonu olarak proteinin enerjisini tanımlamak için kullanılan fiziksel formüllerin ve ilişkili parametrelerin kombinasyonu olarak ifade edilir (Guench ve ark., 2008). Biyomoleküllerin MD simülasyonlarında, yaygın olarak kullanılan kuvvet alanları: AMBER (Cornell ve ark., 1995), CHARMM (MacKerell., 1998), OPLS-AA (Jorgensen ve ark., 1996), ve GROMOS (Oostenbrink ve ark., 2004)'dır. Bu tez boyunca yapılan tüm çalışmalarda CHARMM kuvvet alanı parametreleri kullanılmıştır. Kuvvet alanları temsil ettikleri moleküler özellikler bakımından, bağlı (bonded) ve bağlı olmayan (non-bonded) şeklinde iki grupta sınıflandırılır. Bağlı etkileşimleri temsil eden terimler; bağların gerilmesi (bonded), değerlik açılarının eğilmesi (angles) ve dihedrallar (dihedrals) etrafındaki dönme sayısı ile hesaplanır.

$$E_{bonded} = \sum_{bonded} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} K_\chi [1 + \cos(n\chi - \sigma)] \quad (2.1)$$

$$E_{non-bonded} = \sum_{non-bonded\ pairs, ij} \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 * \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}} \quad (2.2)$$

$$E_{total} = E_{bonded} + E_{non-bonded} + E_{other} \quad (2.3)$$

Bağlı olmayan etkileşimler ( $E_{non-bonded}$ ) ise elektrostatik etkileşimler ve Pauli dışlama ilkesinden gelir. Bu kuvvet alanlarında toplam  $E_{total}$  enerji terimleri,  $E_{bonded}$  olanın, bağlı etkileşimlerden ve  $E_{non-bonded}$  ise, bağlanmamış etkileşimlerin katkısıdır,  $E_{other}$  ise kuvvet alanına özgü terimleri içerir (Eşitlik (2.3)).

Eşitlik (2.1)'de verilen ilk terim tüm bağlanmış atom çiftlerinin bir toplamıdır ve bağların gerilmesini açıklar;  $b$ , atomlararası mesafe,  $K_b$  ve  $b_0$  sırasıyla bağın yapısını ve denge uzunluğunu açıklayan parametrelerdir. İkinci terim, üç atomlu bir molekülde (örneğin; A'nın B'ye ve B'nin C'ye bağlandığı bir molekülde) atomlar arasındaki açının gerilmesini tanımlar.  $\theta$  iki bağ vektörü arasında kalan açıyı tanımlarken,  $K_\theta$  ve  $\theta_0$  açının gerilme ve denge halindeki geometrisini belirtir. Eşitlik (2.1)'de verilen son terim ise dört atomlu bir molekülde (örneğin; A'nın B'ye, B'nin C'ye ve C'nin D'ye bağlı olduğu) dihedralların dönmesiyle ilişkili bir enerji terimidir.  $K_\chi$  dihedrallerin harmonik katsayısını ifade ederken,  $n$  periyodikliği,  $\sigma$  fazı tanımlar.

Eşitlik (2.2)'de  $i$  ve  $j$  iki farklı atomu ifade eder. Eşitlikteki ilk terim Pauli dışlama ilkesinden gelen Lennard-Jones etkileşimlerini ifade ederken;  $R_{ij}$  atomlar arası uzaklığı,  $R_{min,ij}$  LJ enerjisinin minimum olduğu uzaklığı,  $\varepsilon_{ij}$  etkileşen atomlar için bir parametredir. Eşitliğin ikinci kısmı Coulomb yasasından kaynaklı elektrostatik etkileşimlerden gelir.  $q_i$  ve  $q_j$  atomlar üzerindeki net yükü,  $r_{ij}$  uzaklığı tanımlar

### 2.3 MD Simülasyonlarının Çalışması

MD simülasyonlarında, Newton mekaniği vasıtası ile sistemler dinamik olarak gözlemlenir (Eşitlik 2.4).

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = -\nabla_i U(\{r_i\}) \quad (2.4)$$

Öncelikle öngörülen etkileşimlere bağlı olarak sistemin toplam potansiyel terimi yazılır, sonrasında sistemi oluşturan atomların ilk hız ve konum değerleri Langevin yahut heat-bath ile bulunur. İlk konumları ve hızları bilinen sistemin zaman içerisindeki devinimi Newtonun II. Hareket yasasında belirtien denkemin nümerik olarak (Newton Ralphson) çözülmesi ile elde edilir. Bu işlemler iteratif olarak istenilen zaman aralığında yapılır. Eşitlik (2.4)'de verilen,  $r_i$  atomik koordinatları,  $m_i$  atomun kütleini ifade eder. Sistemin dinamiğini meydana getiren durumlar için seçilen zaman aralığı hidrojen atomunun titreşim periyodunun yarısı seçilir ve MD zaman adımını yaklaşık 1 fs'ye kadar kısıtlar.

#### 2.4 Serbest Enerji Hesabı

Serbest enerji hesabı temelde  $\Delta\Delta G$  hesaplanarak sistemin enerji profilinin çıkarılmasıdır. Bu hesaplama yöntemleri ilgilenilen biyolojik bir sistemde protein-ligand kompleksinin doğruluğu için niceliksel bir değerlendirme sağlayabilir. Üç boyutlu bir PMF hesabı ligandın bağlanma enerjisi ve nasıl bağlandığını anlamak için gerekli tüm bilgileri verir. Ancak üç boyutlu PMF hesabı yapılması oldukça karmaşık ve çok fazla işlem hacmi gerektirmesi nedeniyle mevcut şartlarda yapılması mümkün bir hesaplama değildir. İyon kanalları kanal eksenine ve mekanizma yolu iyi tanımlanabilen bir yapı olduğu için tek boyutta yapılan PMF'ler ligand ve kanal arasındaki bağlanma mekanizması ve bağlanma sabiti hakkında bilgi verebilmektedir. PMF'lerin entegrasyonu ile bağlanma sabiti hakkında bilgi edinmek mümkündür.

#### 2.5 Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF)

PMF hesaplamaları, serbest enerji hesaplanmasında iyon kanalları için sıklıkla kullanılan ve literatürde gerçekçiliğini ispat etmiş bir yöntemdir (Rashid ve ark., 2013; Pennington ve ark., 2012; Rashid ve ark., 2012; Rashid ve ark., 2014; Zarrabi ve ark., 2007; Jin ve ark., 2007; Yi ve ark., 2008, Masetti ve ark., 2008; Qiu ve ark., 2009; Chen ve ark., 2009; Jin ve ark., 2011; Yi ve ark., 2011; Khabiri ve ark., 2011;

Chen ve ark., 2012) . Bir reaksiyon koordinatı boyunca, bir ligandın veya iyonun PMF'i, MD simülasyonlarında ligandın kütle merkezi (COM) koordinatını örnekleyerek hesaplanır. PMF hesaplarında yola bağımlı (Umbrella Sampling, Steered MD) ve yoldan bağımsız (FEP, TI) olmak üzere iki farklı yöntem vardır. Bu tez çalışmasında PMF hesabı için her zaman şemsiye örnekleme (US) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde harmonik (biasing) yanlı bir potansiyel uygulanarak (Eşitlik (2.5)), ligand veya iyonun yüksek enerjili yerlerde örneklenmesine yardım ederek, örnekleme sorunları ortadan kaldırılır (Torrie ve ark., 1977). Eşitlik (2.5)'de  $H(\lambda)$ , potansiyel enerji fonksiyonudur,  $\lambda$  reaksiyon koordinatının akım değeri,  $\lambda_i$  ve  $k_i$  sırasıyla her penceredeki  $i$ 'nin merkez ve kuvvet sabitidir. Bu metotta, US pencereler reaksiyon yolu boyunca düzenli aralıklarla tanımlanır. Şemsiye potansiyelinin farklı yerleşimlerinde birçok sayıda simülasyon yapılır ve her simülasyonda  $\lambda$  değeri kaydedilir. Uygulanan potansiyel enerji ile oluşturulan popülasyon değerleri ortaya konur. Bu işlem WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) algoritması kullanılarak yapılır.

$$H' = H(\lambda) + \frac{1}{2}k_i(\lambda - \lambda_i)^2 \quad (2.5)$$

Dışarıdan bir kuvvetin olmaması halinde harmonik potansiyel, koordinat boyunca bir Gaussian dağılımı verir. Ligand üzerine etki eden sabit bir kuvvet, şeklini etkilemeksizin bu dağılımın konumunda bir kaymaya neden olur. Daha karmaşık güçler aynı zamanda dağılım biçimini de bozabilir ve konumunu değiştirebilir. Harmonik kuvvetinin reaksiyon koordinatına etkisini bildiğimizden, bunu ortadan kaldırıp, tarafsız dağılımdan liganda etki eden fiili ortalama kuvvet potansiyeli belirlenebilir.

## 2.6 Docking Çalışmaları

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) çalışmalarının ortaya çıkmasıyla birlikte, kimyada ilaç tasarımında matematiksel hesaplamalar ve bilgisayar programlarının kullanımı ön plana çıkmıştır. Yeni ilaç adaylarının keşfinde bilgisayar destekli tasarımın yapılması hem maliyet hem de zamandan tasarruf sağlaması nedeniyle bu çalışmalar daha da önemli kılınmıştır. Docking çalışmaları, iki yapı arasında en iyi konfigürasyonun bulunmasını sağlarken bu moleküllerin birbirleriyle etkileşimi



hakkında da bilgi vermektedir. Mevcut programlar ile protein-protein; ligand-protein olmak üzere iki farklı türde docking çalışması yapılabilmektedir. Elde edilen sonuçlardan bağlanma enerjisi, kompleks yapıya dair muhtemel bir konformasyonun bulunması mümkündür. Bu tez çalışmasında tüm docking işlemleri için AutoDock 4 (Morris ve ark., 2009) programı kullanılmıştır.

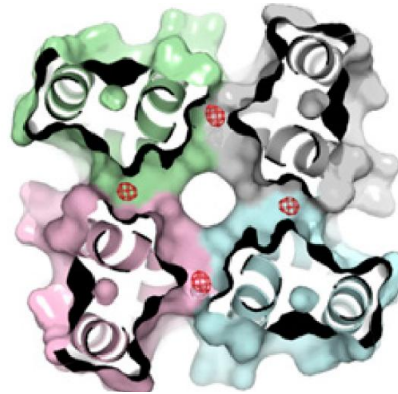




### 3 NavMs KANALI İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

#### 3.1 Giriş

Voltaj kapılı sodyum kanalları, farmasötik ilaçların geliştirilmesi için önemli hedeflerdir, çünkü farklı memeli sodyum kanalı izoformlarındaki mutasyonlar, bir dizi nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarla nedensel ilişkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bagneris ve ark. tarafından 2014 yılında yeni bir prokaryotik kanalın kristallendirilmesi bu çalışmalarda dinnanizme katkı sağlamıştır. Yapılan elektrofizyolojik çalışmalar, iki farklı türdeki milyonlarca yıllık evrime rağmen, Magnetococcus Marinus'dan izole edilen prokaryotik sodyum kanalının (NavMs), ökaryotik bir sodyum kanalı olan Nav1.1 ile benzer bir şekilde sodyum kanalı blokerleri ile bağlanıp inhibe olduğunu göstermiştir. In-silico docking çalışmaları ve elektrofizyolojik çalışmalar bu bölgenin inhibasyon için doğru bölge olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar NavMs kanalının, insan kanallarına uygun ilaçların taranması ve rasyonel tasarımı için değerli bir araç olabileceğini düşündürmektedir. (Bagneris ve ark., 2014) NavMs kanal yapısının üstten görünümü Şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1 :NavMs yapısının kanal kısmının üstten görüntüsü (Bagneris ve ark.,2014).

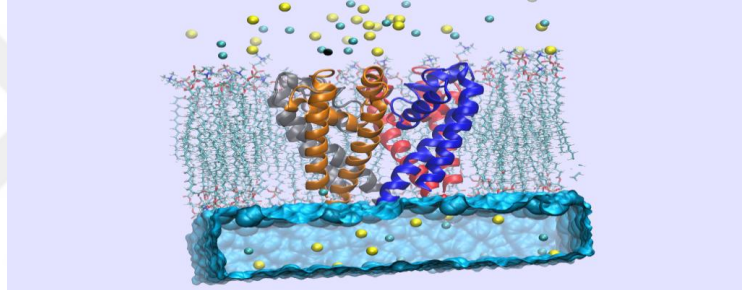
Prokaryotik sodyum kanalları domain olarak adlandırılan, birbirine eşdeğer 4 bölgeden oluşmaktadır, bu bölgeler DI, DII, DIII ve DIV olarak gösterilirler. Bineanaleyh, ökaryotik kanallarda yine 4 bölge bulunmasına rağmen bu bölgeler

eşdeğer değildir. Deneysel veriler, ökaryotik sodyum kanallarına DIV'deki rezidülerden Phe 1774 ve Tyr 1781 (ve DI, DIII'deki aynı rezidüler) bloker bileşiklerini bağlamak için önemli olarak tanımlanmış olup ilaç bağlanma bölgesi olarak önem arz etmektedirler. Bu rezidüler, NavMs'de DIV'deki Thr 207 ve Phe 214 rezidülerine karşılık gelir. Yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda bu rezidülerin önemli bir bağlanma bölgesinde olduğunu göstermiştir (Hanck ve ark.,2009; Ragsdale ve ark, 1996; Wang ve ark., 2001; Ren ve ark., 2001; Nurani ve ark., 2008; Lee ve ark., 2012; Bean ve ark., 1983; Hille., 1977; Yarov-Yarovoy ve ark.,2001; Desaphy ve ark., 2010).Kanal boyunca bulunan heliksler, sarmal-dipol etkileşim yoluyla merkezi kavitede katyonları stabilize etmek için konumlandırılmış durumdadır (Payandeh ve ark., 2011). NavMs yapısındaki iyon iletim yolu güçlü bir şekilde elektronegatifdir ve seçici filtrenin hücre dışı tarafından kanal daralır. Kanal filtre yapısı Thr 176, Leu 177, Glu 178, Ser 179 ve Trp 180 aminoasitlerinden oluşmaktadır. Thr 176 ve Trp 180 arasındaki rezidüler sıkı bir yapı oluşturur, Thr 176 ve Leu 177 omurga karbonilleri iyonların iletilmesinde rol oynarlar. Sodyum kanallarındaki mekanizmaların kontrolünü sağlayan en önemli bölge seçici filtre bölgesidir. Bu bölge ligand bağlanması ve iyon geçişi için bir kapı gibi davranmaktadır. NavMs kanalındaki bu seçici filtre bölgesinde iyon ve ligand etkileşiminin en önemli olduğu rezidüsü Glu 178 'dir. Bu tez çalışmasında özellikle filtre bölgesindeki bu aminoasit ile iyon ve ligand etkileşiminin incelenmesi yapılmış ve deneysel verilerle karşılaştırılmıştır.

### **3.2 NavMs Sodyum Kanalının MD Simülasyonu**

Proteinin kristal yapısı RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)'dan alındı (PDB Kodu: 4CBC). NavMs kanalının tetramer yapısını sağlamak amacıyla indirilen kristal yapıda verilen simetri operasyonları uygulandı ve tetramer yapı elde edildi. VMD (Humphrey ve ark., 1996) programı yardımıyla palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine (POPC) lipitleri seçilerek 90x90 Å<sup>2</sup> boyutunda xy düzleminde 125 adet lipit zincirinden (16750 atom) oluşan bilayer elde edildi ve protein bu yapının içerisine gömüldü. Membran içine gömülü yapıyı fizyolojik ortama benzetmek için sisteme toplam 9047 adet su molekülü (27141 atom) eklemek suretiyle membran protein sistemi kuruldu. Sistemi nötralleştirmek ve fizyolojik değeri sağlamak amacıyla 150 mM'lık bir iyon konsantrasyonu eklendi ( 34 Na<sup>+</sup>, 24

Cl<sup>-</sup> atomu). Toplamda sistemde 49831 atom bulunmaktadır ve sistem 90 x 90x 80 Å<sup>3</sup> boyutlarındadır. Sistemin örnek görünümü Şekil 3.2’de verilmiştir. Tüm MD simülasyonları, CHARMM36 (Vanommeslaeghe ve ark., 2010) kuvvet alanı ile NAMD 2.11(Philipps ve ark., 2005) sürümünü kullanarak gerçekleştirildi. Tüm yönler için periyodik sınır koşulları uygulandı. Uzun menzilli elektrostatik etkileşimler ise PME algoritması kullanan NPT topluluğunda yapıldı. Sıcaklık 300 K’de iken Langevin Piston metodu, 50 fs piston bozulumu ve 100 fs piston periyodu ile basıncı 1 atm’ de sağlamak için kullanıldı. Van der Waals etkileşimlerinde cut-off mesafesi 12 Å ve switching mesafesi 10 Å’ da tutuldu. Simülasyon boyunca zaman adımı 2 fs olarak alındı ve her 1 ps aralıklarla simülasyon verileri kaydedildi. Yörünge verileri 1 ps aralıklarla kaydedilirken şemsiye örnekleme (umbrella sampling) simülasyonlarında her adımda koordinat yazıldı.



Şekil 3.2 : NavMs sistemi.

### 3.3 Protein Sisteminin Dengeye Getirilmesi

Sistem yukarıda bahsedilen programlar ile kurulmuştur. Sistem ilk oluşturulduğunda bazı atomlar arasındaki mesafenin van der Waals uzaklıklarından az olması kuvvetle muhtemel olduğundan ilk adım olarak sistem 1000 MD adımında (1 ps) minimize edildi. Bu süre kötü etkileşim uzaklıkları olarak (badcontact) adlandırılan uzaklıkları ortadan kaldırmak için yeterlidir. Sistem kurulduktan sonra öncelikle sistemin dengeye gelmesi gerekmektedir. Sistemi dengeye getirme işlemi sırasında protein yapısının omurgasına ve diğer ağır atomlarına harmonik kuvvetler (konstraintler) uygulandı. Buradaki amaç proteinin lipit ve su atomlarıyla birlikte adapte olmasını ve sistemde NPT simülasyon koşullarını sağlamaktır. Protein üzerindeki harmonik kuvvetler belirli zaman aralıklarında azaltıldı ve kuvvet sabiti  $k = 0.1$  kcal/mol/Å<sup>2</sup>olana kadar simülasyon devam ettirildi. Tablo 3.1’de MD simülasyon zamanı;  $K_{bb}$  protein yapının omurga atomlarına;  $K_{noh}$  yine protein yapının hidrojen

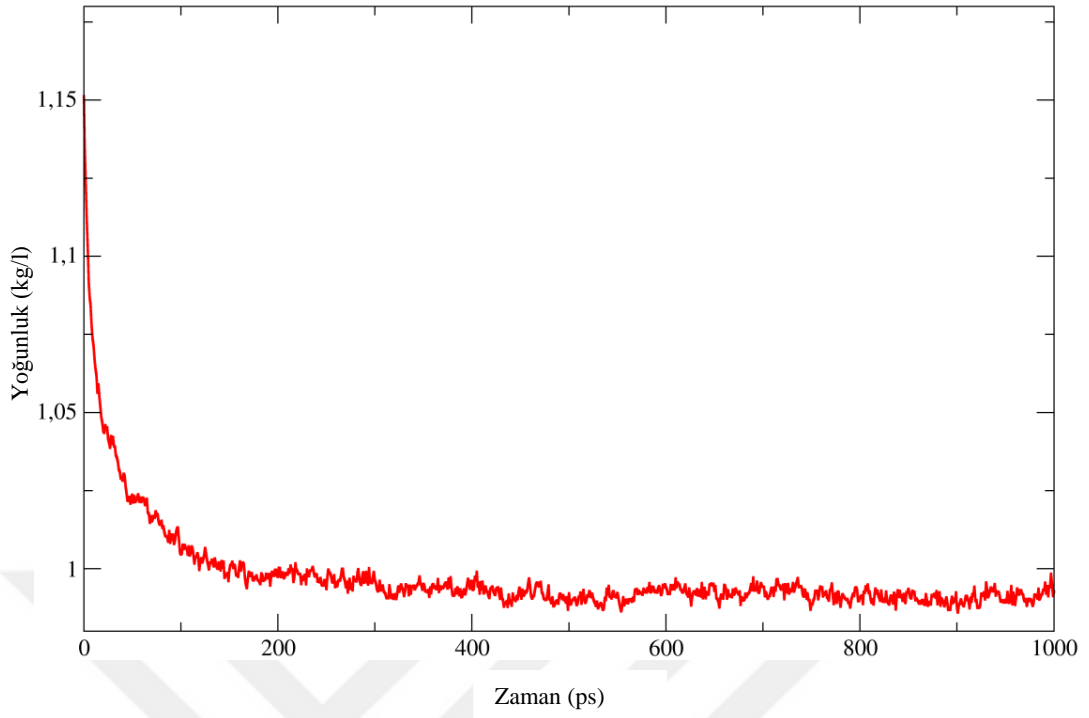
atomu hariç yan zincirlerine;  $K_{ion}$  iyonlara xyz yönünde uygulanan kuvvet sabitini gösterirken P, C218 ve C316 (z) lipidin fosfor, 218 ve 316 numaralı karbon atomlarına z yönünde uygulanan kuvvet sabiti değerini göstermektedir. Tablo 3.1’de görüldüğü üzere sistem yavaş yavaş serbest bırakılmış ve bu süre zarfında sistem sıcaklığı 300 K ve basınç 1 atm’ye getirilmiştir.

Tablo 3.1: Sistemi denge haline getirme işleminde uygulanan kuvvet sabiteri ve kuvvet sabitlerinin uygandığı süreler.

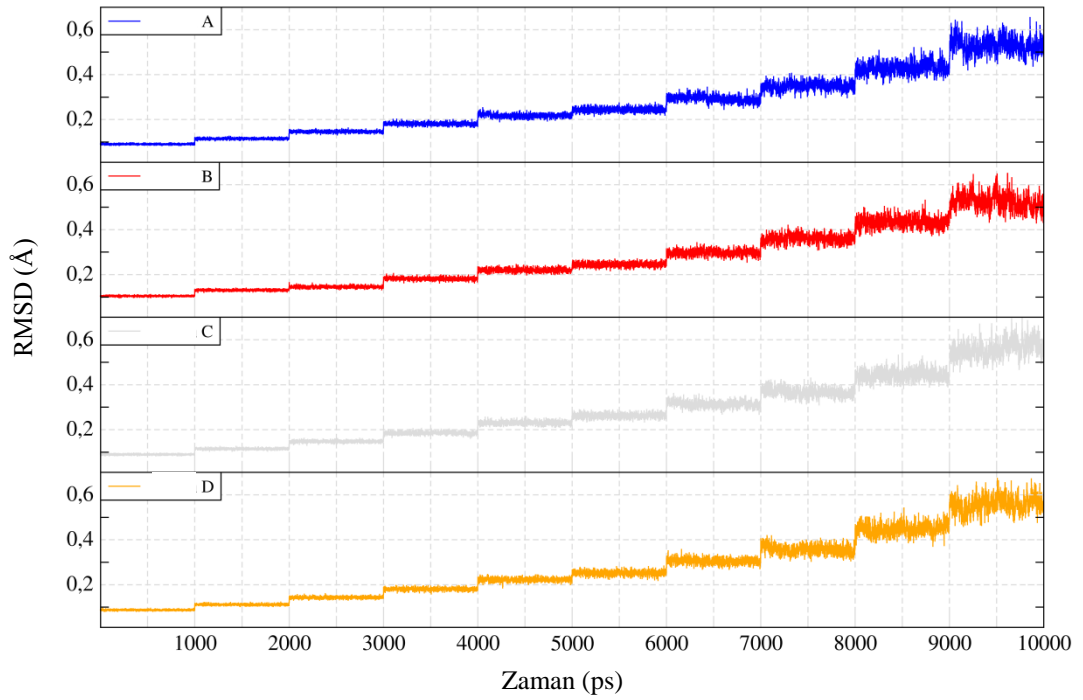
MD Zamanı (ps)	$K_{bb}$ (kcal/mol/Å <sup>2</sup> )	$K_{noh}$ (kcal/mol/Å <sup>2</sup> )	$K_{ion}$ (kcal/mol/Å <sup>2</sup> )	P1, C218 ve C316 (z) (kcal/mol/Å <sup>2</sup> )
1000	50	25	5,0	3,0
1000	25	12	3,0	3,0
1000	12	6,0	1,0	3,0
1000	6,0	3,0	1,0	3,0
1000	3,0	1,5	0,5	1,0
1000	2,0	1,0	0,5	1,0
1000	1,0	0,5	0,25	1,0
1000	0,5	0,25	0,1	0,0
1000	0,25	0,1	0,1	0,0
1000	0,15	0,0	0,1	0,0

Sistemin dengeye gelme işlemi sırasında sistemin yoğunluk grafiğine bakıldığında, Şekil 3.3’de sistemin yoğunluğunun yaklaşık 1.0 kg/l olduğu ve sistemin dengeye geldiği görüldü. Sistemin çoğunluğunu su ve lipid oluşturduğundan beklenen yoğunluk değeri 1.0 kg/l’dir. Dengeye gelme işlemi sürecinde ayrıca her bir protein zincirinin omurgasındaki atomların Eşitlik (3.1)’de verilen denkleme göre RMSD grafiğine bakıldı (Şekil 3.4). Burada her bir protein zincirinin RMSD değerinin maksimum 0.6 Å olduğu görülmektedir. Bu değer NavMs kristal yapısında verilen çözünürlük değerinin (2.66 Å) altındadır. Sistem dengeye getirildikten sonra iyon kanalının omurga atomlarına çok küçük bir harmonik konstraint (0,1 kcal/mol) uygulanarak MD yapıldı. Bu süre içerisinde protein omurga yapısının RMSD grafiği Şekil 3.5’de verilmiştir. NavMs protein yapısının omurga atomlarının RMSD değerinin ise 0.6 Å’da dalgalandığı görülmektedir.

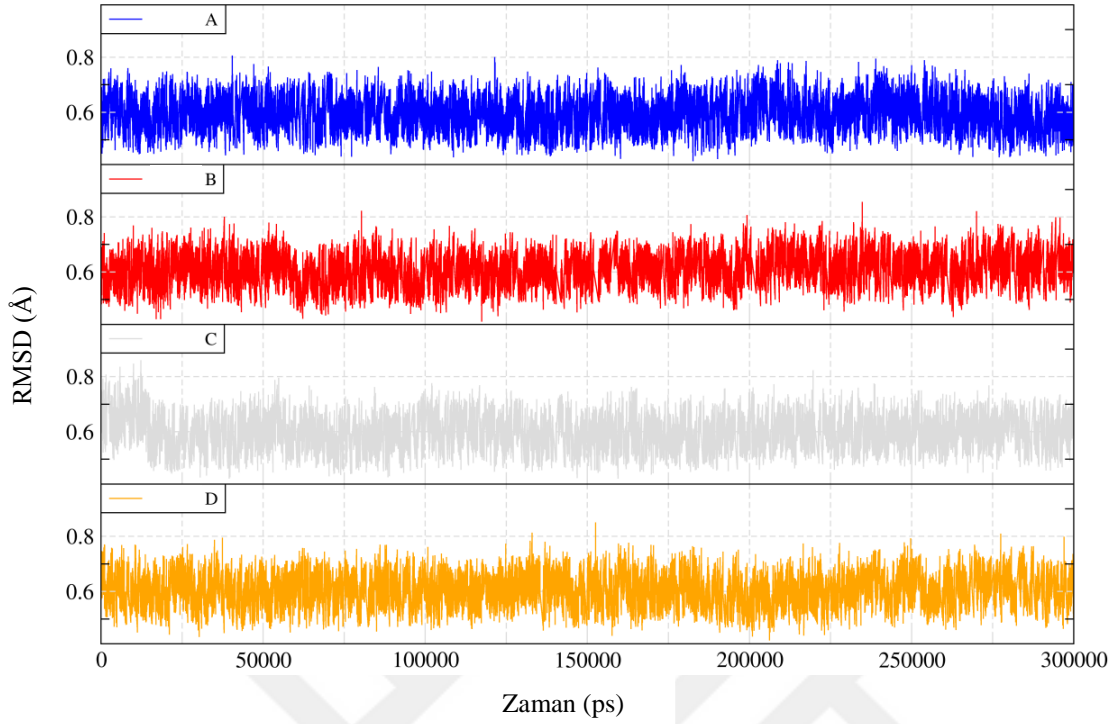
$$RMSD = \sqrt{\frac{\frac{1}{N} \sum_{i_1}^{N_{atom}} (r_i(t_1) - r_i(t_2))^2}{N_{atom}}} \quad (3.1)$$



Şekil 3.3 : NavMs Sisteminin yoğunluk-zaman grafiği.



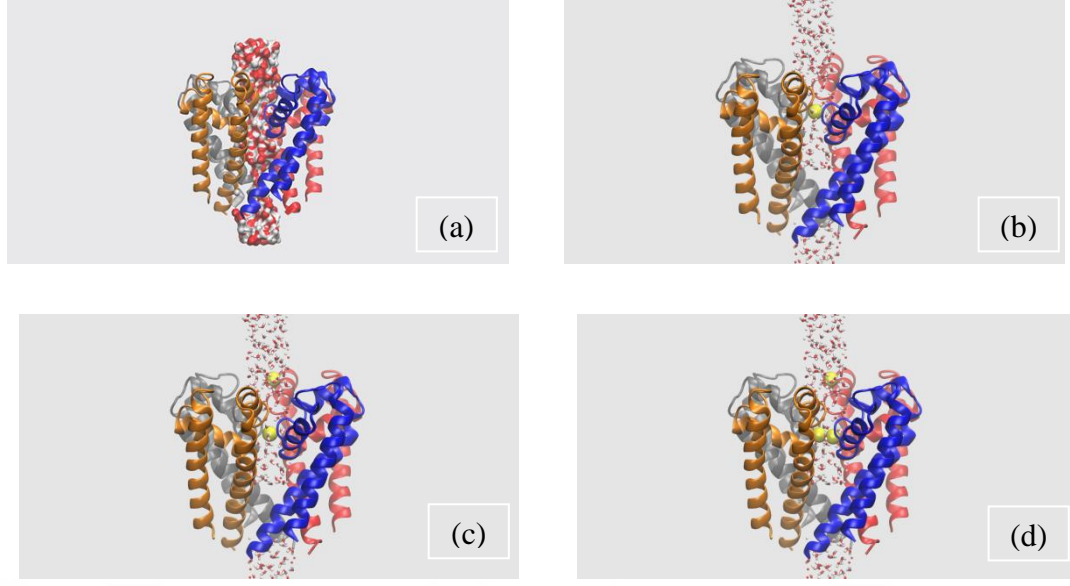
Şekil 3.4 : NavMs protein yapısının omurga atomlarının 300 ns'lik MD boyunca RMSD değeri.



Şekil 3.5 : Sistemin dengeye gelme işlemi sürecinde her bir protein zincirinin omurga yapısının atomlarının RMSD grafiği.

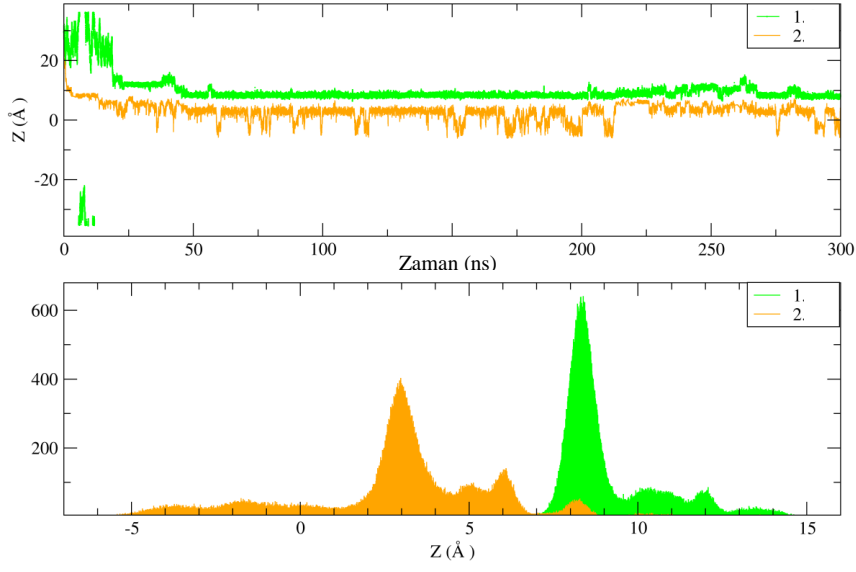
300 ns'lik MD simülasyonu süresinde iki tane sodyum iyonu kanal içine doğru yönelmiş ve 4. ns içinde ilk iyon, 20. ns içinde de diğer iyon kanalının seçici filtresinde bulunan rezidüle bağlanarak simülasyon süreci boyunca filtre içinde kalmıştır. Şekil 3.6'da NavMs kanalı ve simülasyon boyunca kanal içine giren sodyum iyonlarının görüntüleri verilmiştir. Şekil 3.7 (a)'da 300 ns'lik tüm simülasyon boyunca iyonların z koordinatları, Şekil 3.7 (b)'de iyonların filtre içine girdikten sonra z koordinatlarının histogram eğrileri verilmiştir. Burada 1. iyonun z ekseninde çoğunlukla 8.3 Å civarında durduğu ve bu nokta etrafında dalgalanmaların olduğu görülmektedir. 2. iyonun ise z ekseninde çoğunlukla 2.9 Å civarında durduğu ve bu nokta etrafında dalgalanmaların olduğu görülmektedir; x ve y eksenlerinde ise büyük çoğunluğu 0 Å civarında durduğu ancak bu eksenlerde de dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Bu da sodyum iyonunun filtrenin yan zincirleri ile hidrojen bağı yaparak filtre kenarlarına kaydığını göstermektedir. Bu çalışmadan kanal filtresinde 2 iyon bulunduğu görülmektedir. Literatürde kavitede 3. iyonun varlığı bildirildiğinden çalışmanın devamında kaviteye bir iyon daha konulmuştur.



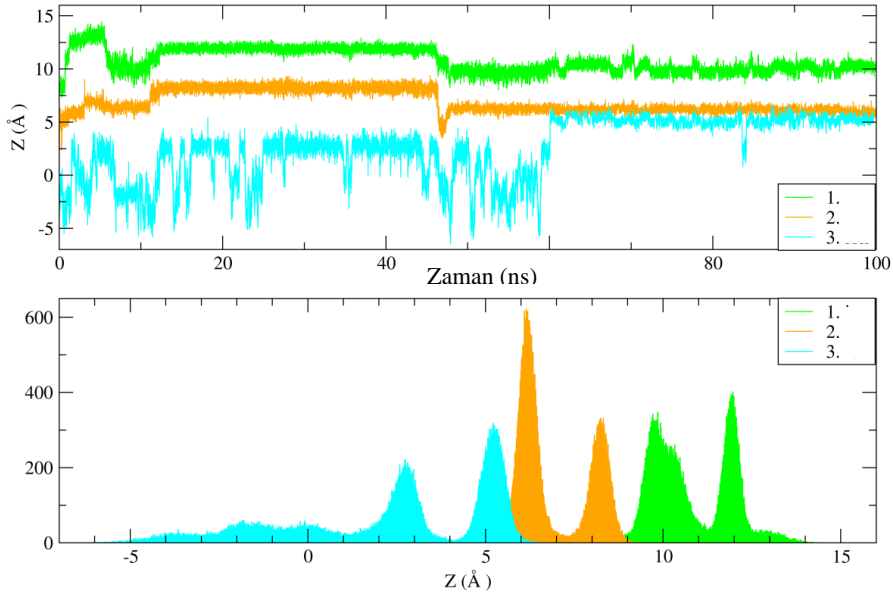


Şekil 3.6 : (a) Protein yapı ile birlikte z ekseni boyunca (+30 Å ile -30 Å aralığında) su molekülleri (b) Kanal içinde bulunan bir sodyum iyonunun (c) İki sodyum (d) Üç sodyum iyonunun kanal içindeki görüntüleri.

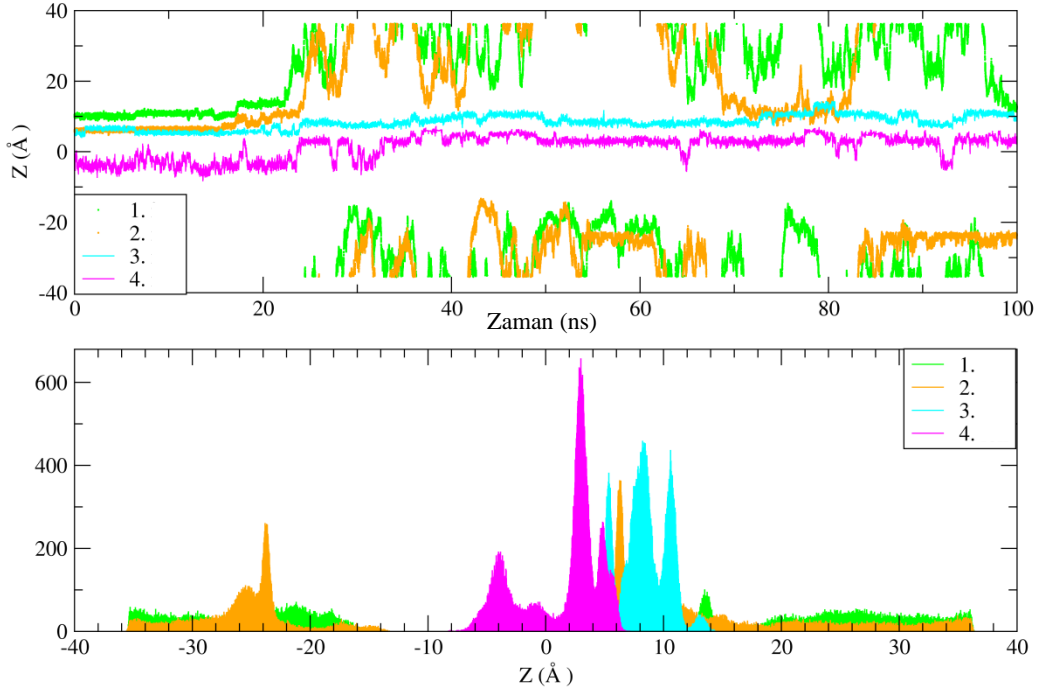
Kaviteye iyon koyma işlemi kavitedeki bir su molekülünün dışarıda bulunan bir iyon ile değiştirilmesi şeklinde olmuştur. Yaptığımız MD simülasyonlarında kaviteye konulan 3. iyonun filtreye girdiği ve filtrede bulunan 2. iyon ile yaklaşık aynı z değerinde bulunmaktadır. Bu simülasyondan elde ettiğimiz iyon koordinatları Şekil 3.8'de verilmiştir. Şekil 3.8 (a)'da kavitedeki iyon ilk 60 ns boyunca filtreye doğru dalgalanma göstermektedir. Bu durumda 1. ve 2. iyon bir miktar yerlerinden oynamakta ve ekstraselüler kısma doğru kaymaktadırlar. Ancak 60 ns'den sonra iyon 1 ve iyon 2 tekrar hücre içerisine doğru kaymakta 3. iyon da filtrede kendine yer bulmaktadır. Histogram eğrilerine bakıldığında son 40 ns'de iyon 2 ve iyon 3'ün z yönünde dağılımları oldukça yakındır. Bu da bize iyonların filtre içerisinde filtrede bulunan rezidülerle hidrojen bağı yaptığını göstermektedir. Bu çalışmada filtrenin 2 değil 3 iyon barındırabildiği gösterilmiştir. Çalışma aynı zamanda filtrede 3 iyon varken kaviteye 4. iyon konulması durumunda neler olacağına ilişkin durum hakkında merak uyandırmış ve bunun çalışması da yapılmıştır. Filtrede 3 iyon varken kaviteye 4. iyon konulması durumunda bu iyonun yaklaşık 20 ns sonunda filtreye girdiği ve burada bulunan 2 iyonun dışarı kaçtığı gözlenmiştir.



Şekil 3.7 : (a) Kanal içine giren iyonların z koordinatları ve (b) onların histogram eğrileri.



Şekil 3.8 : (a) Kanal içinde bulunan 3 iyonun z koordinatları ve (b) onların histogram eğrileri.



Şekil 3.9 : (a) Kanal içinde bulunan 4 iyonun z koordinatları ve(b) onların histogram eğrileri.

Filtrede bulunan ve kaviteye konulan iyonların koordinatları Şekil (3.9)'da gösterilmiştir. Şekil (3.9)'da 4 iyonunda z koordinatları verilmiştir. Bunlardan yeşil ve turuncu olan filtreye kendiliğinden giren ilk iki iyon olup 4. iyonun kaviteye konulmasıyla bu iyonların filtreden çıktığı görülmektedir. Şekilde her iki iyonunda z koordinatının negatif olması periyodik sınır koşullarından dolayı ortaya çıkmaktadır. Sistemimizde z koordinatının sıfır olduğu bölge filtrenin hemen altındaki kavite bölgesidir. Filtre ve kavitede dört iyon varken yaptığımız simülasyonda filtredeki iki iyon dışarı çıkınca kavitede bulunan iyonun filtreye girdiği ve filtrede iki iyon bulunan başlangıç koşulunun tekrar oluşturduğu gözlenmektedir. Bu simülasyon dışı doğru (outward) bir iyon akımı olduğunu göstermektedir. MD simülasyonlarında gözlemlediğimiz bu davranışların serbest enerji hesapları ile doğrulanması gereği ortaya çıkmıştır. Çalışmanın devamında iyon bağlanmasının serbest enerji hesabı yapılmıştır. Tablo (3.2) ve Tablo (3.3-3.4) sırasıyla kanal içinde 2 ve 3 iyon varken, iyonların su ve protein tarafından koordine edilen oksijen atomlarını göstermektedir. Verilen tablolar simülasyon boyunca sodyum iyonlarını koordine eden aminoasitleri ve su moleküllerini göstermektedir. Yeşil ile verilen atomlar iyon ile en iyi ikincil bağ yapan atomları göstermektedir.

Tablo 3.2: (A) Filtrede iki iyon varken (B) Filtrede 3 iyon varken İyon (1)'in su ve proteinle koordinasyonu.

Filtrede 2 iyon bulunduğunda (A)				Filtrede 3 iyon bulunduğunda (B)			
İyon 1	x-koord	y-koord	z-koord	İyon 1	x-koord	y-koord	z-koord
	0.24	-0.63	8.67		0.53	-0.75	10.42
İyon 1 ve diğer moleküllerin O atomu arasındaki uzaklık (Å)				İyon 1 koordinasyon ve diğer moleküllerin O atomu arasındaki uzaklık (Å)			
WT2137	2.41	P1/THR176;Q	6.64	WT5571	2.45	P1/THR176;Q	8.57
WT4233	2.53	P1/LEU177;Q	4.24	WT7732	2.49	P1/LEU177;Q	6.12
WT2663	2.26	P1/GLU178;Q	5.72	WT3303	2.36	P1/GLU178;Q	6.57
WT7100	2.23	P1/GLU178;OE1	6.09			P1/GLU178;OE1	2.41
WT5881	2.30	P1/GLU178;OE2	4.47			P1/GLU178;OE2	3.22
WT5561	2.29	P1/SER179;Q	4.93			P1/SER179;Q	8.37
		P1/SER179;OG	4.93			P1/SER179;OG	4.98
		P2/THR176;Q	7.88			P2/THR176;Q	9.36
		P2/LEU177;Q	5.03			P2/LEU177;Q	6.11
		P2/GLU178;Q	6.75			P2/GLU178;Q	7.79
		P2/GLU178;OE1	4.40			P2/GLU178;OE1	4.91
		P2/GLU178;OE2	6.32			P2/GLU178;OE2	5.45
		P2/SER179;Q	4.24			P2/SER179;Q	8.38
		P2/SER179;OG	4.24			P2/SER179;OG	5.22
		P3/THR176;Q	7.84			P3/THR176;Q	8.80
		P3/LEU177;Q	5.38			P3/LEU177;Q	5.44
		P3/GLU178;Q	7.04			P3/GLU178;Q	6.31
		P3/GLU178;OE1	6.21			P3/GLU178;OE1	6.27
		P3/GLU178;OE2	4.12			P3/GLU178;OE2	4.05
		P3/SER179;Q	4.92			P3/SER179;Q	6.52
		P3/SER179;OG	4.92			P3/SER179;OG	4.36
		P4/THR176;Q	7.36			P4/THR176;Q	7.76
		P4/LEU177;Q	4.45			P4/LEU177;Q	5.29
		P4/GLU178;Q	6.33			P4/GLU178;Q	5.90
		P44/GLU178;OE1	6.54			P4/GLU178;OE1	2.28
		P4/GLU178;OE2	4.41			P4/GLU178;OE2	2.62
		P4/SER179;Q	7.36			P4/SER179;Q	6.69
		P4/SER179;OG	5.16			P4/SER179;OG	4.11

Tablo 3.3 : (A) Filtrede iki iyon varken (B) Filtrede üç iyon varken İyon (2)'nin su ve proteinle koordinasyonu.

Filtrede 2 iyon bulunduğunda (A)				Filtrede 3 iyon bulunduğunda (B)			
İyon 2	x-koord.	y-koord.	z-koord.	İyon 2	x-koord.	y-koord.	z-koord.
	0.03	-0.06	2.94		-2.09	0.34	6.06
İyon 2 ve diğer moleküllerin O atomu arasındaki uzaklık (Å)				İyon 2 koordinasyon ve diğer moleküllerin O atomu arasındaki uzaklık (Å)			
WT6095	2.25	P1/THR176;Q	5.28	WT4941	2.32	P1/THR176;Q	7.16
WT3556	2.34	P1/LEU177;Q	5.01	WT6661	2.28	P1/LEU177;Q	5.54
WT5688	2.40	P1/GLU178;Q	9.05	WT8225	2.22	P1/GLU178;Q	8.41
WT4941	2.28	P1/GLU178;OE1	9.83	WT3303	2.91	P1/GLU178;OE1	4.08
WT3517	2.20	P1/GLU178;OE2	9.21			P1/GLU178;OE2	6.07
WT17865	2.74	P1/SER179;Q	11.41			P1/SER179;Q	10.86
		P2/THR176;Q	5.03			P2/THR176;Q	7.41
		P2/LEU177;Q	4.61			P2/LEU177;Q	4.75
		P2/GLU178;Q	8.60			P2/GLU178;Q	8.80
		P2/GLU178;OE1	7.82			P2/GLU178;OE1	7.06
		P2/GLU178;OE2	9.94			P2/GLU178;OE2	6.66
		P2/SER179;Q	11.03			P2/SER179;Q	10.19
		P3/THR176;Q	4.95			P3/THR176;Q	5.39
		P3/LEU177;Q	5.05			P3/LEU177;Q	2.28
		P3/GLU178;Q	8.70			P3/GLU178;Q	5.87
		P3/GLU178;OE1	8.77			P3/GLU178;OE1	7.00
		P3/GLU178;OE2	7.04			P3/GLU178;OE2	5.19
		P3/SER179;Q	11.01			P3/SER179;Q	7.43
		P4/THR176;Q	4.90			P4/THR176;Q	4.81
		P4/LEU177;Q	5.26			P4/LEU177;Q	4.45
		P4/GLU178;Q	9.13			P4/GLU178;Q	6.42
		P44/GLU178;OE1	10.18			P44/GLU178;OE1	4.43
		P4/GLU178;OE2	0.46			P4/GLU178;OE2	2.29
		P4/SER179;Q	11.35			P4/SER179;Q	8.93

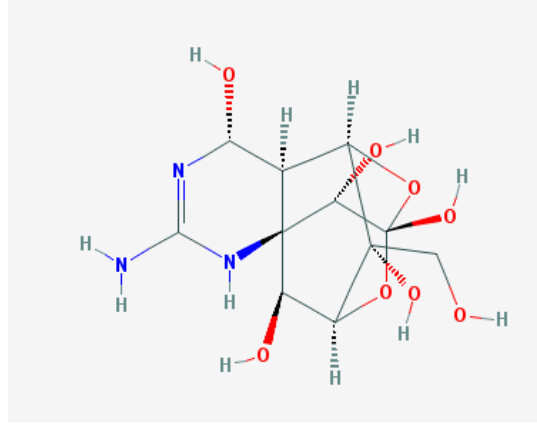
Tablo3.4 : Filtrede üç iyon varken İyon (3)'ün su ve proteinle koordinasyonu.

Filtrede 3 iyon bulunduğunda			
İyon 3	x-coord	y-coord	z-coord
	1.26	-0.53	4.89
İyon 3 ve diğer moleküllerin O atomu arasındaki uzaklık (Å)			
WT8225	2.57	P1/THR176;Q	4.42
WT4431	2.43	P1/LEU177;Q	2.24
WT5428	2.39	P1/GLU178;Q	6.72
WT6225	2.32	P1/GLU178;OE1	4.80
WT6661	2.74	P1/GLU178;OE2	6.13
		P1/SER179;Q	8.95
		P1/SER179;OG	7.88
		P2/THR176;Q	4.82
		P2/LEU177;Q	3.83
		P2/GLU178;Q	7.54
		P2/GLU178;OE1	5.77
		P2/GLU178;OE2	4.38
		P2/SER179;Q	10.09
		P2/SER179;OG	7.90
		P3/THR176;Q	6.71
		P3/LEU177;Q	5.42
		P3/GLU178;Q	8.71
		P3/GLU178;OE1	8.22
		P3/GLU178;OE2	6.53
		P3/SER179;Q	10.64
		P3/SER179;OG	8.54
		P4/THR176;Q	6.73
		P4/LEU177;Q	5.13
		P4/GLU178;Q	8.58
		P4/GLU178;OE1	7.03
		P4/GLU178;OE2	5.42
		P4/SER179;Q	10.14
		P4/SER179;OG	9.05

### 3.4 NavMs Kanalına Ligand Bağlanması İncelenmesi

#### 3.4.1 Tetrodotoksin (TTX)

Tetrodotoksin (Şekil 3.10) düşük molekül ağırlıklı nörotoksitesi yüksek bir moleküldür. Bu molekülde pozitif yüklü bir guanidyum grubu ve pirimidin halkasına bağlı C-4, C-6, C-8, C-9, C-10 ve C-11 pozisyonlarında altı hidroksil grubu bulunmaktadır. Tetrodotoksin, kirpi balıklarından veya fugalardan (tetraodontide ailesi) dokularından (karaciğer, bağırsaklar, gonadlar, deri, böbrek, kan) izole edilebilen bir nörotoksindir. Ayrıca sodyum voltaj kapılı proteinin iletkenliğini seçici olarak tersine çevirebilen bir inhibitördür (Kao Cy.,1966).



Şekil 3.10 : Tetrodotoksinin moleküler yapısı.

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 da TTX'in ağrı sendromunun bloke edilmesinde potansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir (Hagen ve ark., 2007). TTX aksiyon potansiyellerini interfere eden ve uyarılabilir zarlardaki implusları bloke edebilen potansiyele sahip bir moleküldür. TTX farklı sodyum kanallarına farklı afinitelerle 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 transmembran ve ekstraselüler domainler arasındaki (S1-S6 helikslerinde) benzerlik %50' den fazladır. Toksin bağlanma bölgesinde belirgin rol alan S5-S6 helikslerinde 4 domain için benzerlik oranı %90' dan fazladır. TTX'in bağlanma afinitesi yan zincirler ve TTX arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Nav1.1, Nav1.2, Na1.3 ve Na1.7 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 bulunmuştur (Lee CH ve ark.,2008). Zira bu özelliğin kullanılması homoloji modelinde elde edilmesi yapının doğruluğu için test olacaktır.

### 3.4.2 NavMs ve tetrodotoksin sisteminin kurulması

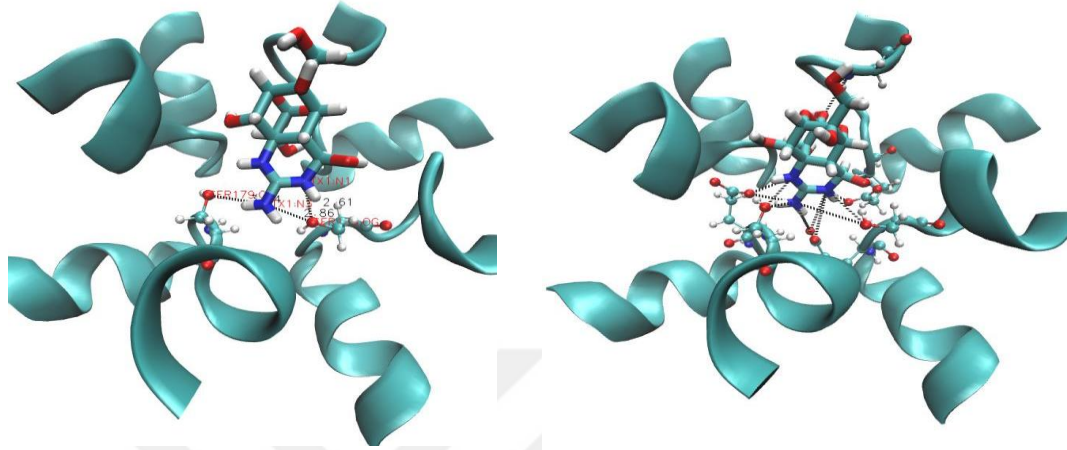
Yukarıda detayı verilen (Bölüm 3.2) çalışmada NavMs kanalı için sistem oluşturulmuş ve sistem 100 ns sürede dengeye getirilmiştir. Çalışmamızın TTX bağlanması kısmında dengeye getirilen yapı kullanılmıştır. Önceki çalışmadan elde

edilen sodyum iyonlarının konumları korunurken TTX bağlanmıştır. NavMs sisteminde filtrede 3 iyon kadar iyon bulunabileceği yukarıda gösterilmiştir. TTX bağlanması çalışmasında farklı sayılarda iyon alınarak Autodock 4 ile docking işlemleri yapılmıştır. Tek iyonlu yapılar için diğer konumdaki iyon su ile yer değiştirilmiştir. Dockingler arasındaki farklılıklar aşağıda sıralanmıştır:

- İyonsuz TTX bağlanması
- Tek iyon  $z = +3$  konumunda iken TTX bağlanması
- Tek iyon  $z = +9$  konumunda iken TTX bağlanması
- Tek iyon  $z = +7$  konumunda iken TTX bağlanması
- İki iyon  $z = +3$  ve  $z = +9$  da iken TTX bağlanması

Yapılan docking çalışmalarının incelenmesinde bağlanma enerjileri, docking pozisyonları, bu konformasyonların oluşturduğu kümeler ve oluşan bağlar dikkate alınmıştır. Yapılan beş farklı docking çalışmasının her birinde yüzer konformasyon oluşturulmuştur. Tüm konformasyonlar içinde en iyi küme ve en iyi dock pozisyonları incelenip ligand-protein etkileşimleri de dikkate alınarak en kararlı konformasyon seçilmiştir. Seçilen komplekslere moleküler dinamik (MD) yapılmıştır. Sistemler farklı süreler boyunca simüle edilmiştir. İyonsuz docking ve iyon ( $z:+3$ ) iken sistem 24.5 ns, iyon ( $z: +9$ ) iken 58.5 ns , iki iyon ( $z:+3$  ve  $z: +9$ ) iken 54.9 ns ve iyon ( $z:+7$ ) için 51 ns MD yapılmıştır. Yapılan MD sonuçlarından elde edilen bağların AutoDock ile yapılan sonuçlarla uyumlu olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Özellikle NavMs yapısının filtre kısmındaki Glu 178 amino asiti ile ligandın etkileşimleri incelenmiştir. TTX'in zamana bağlı konumu ve konformasyonu da incelenmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda iyonsuz docking ve iki iyonlu docking komplekslerinde kararlı bir yapının oluşmadığı görülmüştür. İyon ( $z: +4$ ) ve ( $z:+9$ ) ile yapılan simülasyonlarda filtre içindeki her iki iyonunda zamanla ( $z:+7$ ) konumuna geldiği görülmüştür. Bunun üzerine bir iyon ( $z:+7$ ) konumundayken docking yapılmış ve sonrasında MD simülasyonu yapılmıştır. MD sonuçlarını karşılaştırmak ve daha iyi analiz etmek için aşağıda Tablo 3.5'de komplekslerden elde edilen ikincil bağların zamanla bağ uzunluklarındaki değişim, standart sapmalarıyla birlikte hesaplanmıştır. Yapılan MD simülasyonun analizinde en kararlı yapının iyon ( $z:+9$ ) ile başlanılan konformasyon olduğu anlaşılmıştır. MD'den çıkan son dosyada TTX in kütle merkezi ( $z:+13$ ), iyonun kütle merkezi ( $z: +7$ ) olarak elde edilmiştir. NavMs-TTX kompleksinin AutoDock ve MD görüntüsü

Şekil 3.11’de verilmiştir. Şekil 3.11’den de görüldüğü üzere AutoDock ile elde edilen kompleks yapı ve MD sonucu elde edilmiş yapı arasında hem konformasyon değişikliği hem de ligand ve protein arasındaki hidrojen bağlarının sayısı açısından önemli bir fark olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 3.11 : (A) NavMs ve tetrodotoksin kompleksinin Autodock ile elde edilen görüntüsü (B) Kompleksin MD sonucu elde edilen görüntüsü

Tablo 3.5 : NavMsve TTX kompleksi için MD ve AutoDock sonucu elde edilen bağlar.

TTX	NavMs ve İyon 3	MD ort (Å)	Auto Dock (Å)	NavMs ve İyon 7	MD ort (Å)	Auto Dock (Å)	NavMs ve İyon 9	MD ort (Å)	Auto Dock (Å)
N1	GLU-OE2-P4	2.89±0.16	4.27	SER-OG-P4	-	2.57	GLU-OE2-P2	3.30±0.30	4.86
N1	-	-	-	-	-	-	GLU-OE2-P3	3.11±0.29	5.07
N1	-	-	-	-	-	-	GLU-OE1-P2	3.53±0.43	5.15
N1	-	-	-	-	-	-	SER-OG-P2	-	2.61
N2	SER-OG-P2	3.06±0.18	2.92	GLU-OE2-P3	3.38±0.71	5.04	SER-OG-P1	3.20±0.18	3.48
N2	-	-	-	GLU-OE1-P3	3.28±0.57	5.57	GLU-OE1-P1	2.90±0.25	5.43
N2	-	-	-	SER-OG-P3	-	3.01	-	-	-
N3	GLU-OE2-P3	2.68±0.09	2.66	GLU-OE2-P3	3.62±0.90	5.4	GLU-OE2-P2	2.74±0.11	3.64
N3	GLU-OE1-P4	2.68±0.09	5.68	GLU-OE1-P3	3.16±0.72	6.52	GLU-OE1-P1	2.78±0.20	5.4
N3	-	-	-	LEU-O-P2	2.74±0.11	8.58	GLU-OE1-P2	3.34±0.31	3.58
N3	-	-	-	GLU-OE1-P4	-	2.94	SER-OG-P1	3.63±0.25	3.14
N3	-	-	-	SER-OG-P4	-	2.85	SER-OG-P2	-	2.86
O6	SER-N-P4	2.87±0.10	2.48	SER-N-P4	3.61±0.42	6.42	-	-	-
O2	-	-	-	SER-N-P2	3.04±0.18	5.61	-	-	-
O4	-	-	-	-	-	-	GLY-N-P3	3.13±0.20	3.32
İYON		7.12±0.40	4		6.98±0.23	7		7.16±0.24	9
Na-N3		5.52±0.20	5.37		3.81±0.31	6.36		4.01±0.33	4.65

Bu yapılarla ilişkin daha detaylı bir inceleme Tablo 3.5’de verilmiştir. Verilen tabloda AutoDock ve MD simülasyonları sonucunda tetrodotoksinin bağlanmasında ve kanalı inhibe etmesinde etkin olan aminoasitlerle, ligandın atomları arasındaki uzaklıklar verilmiştir. Bu aminoasitlerin belirlenmesi NavMs kanalının ligandın bağlanması için gerekli kimyasal çevrenin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. TTX’in bağlanmasında en önemli bölgenin kanalın filtre bölgesi olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar göstermiştir ki AutoDock ile elde edilen sonuçlar MD ile karşılaştırıldığında önemli bir değişikliğe uğramaktadır. Bu da bize



docking çalışmalarından elde edilen sonuçların mutlaka MD ile de refere edilmesi gerekliliğini göstermektedir.

### 3.5 PMF Hesaplamaları

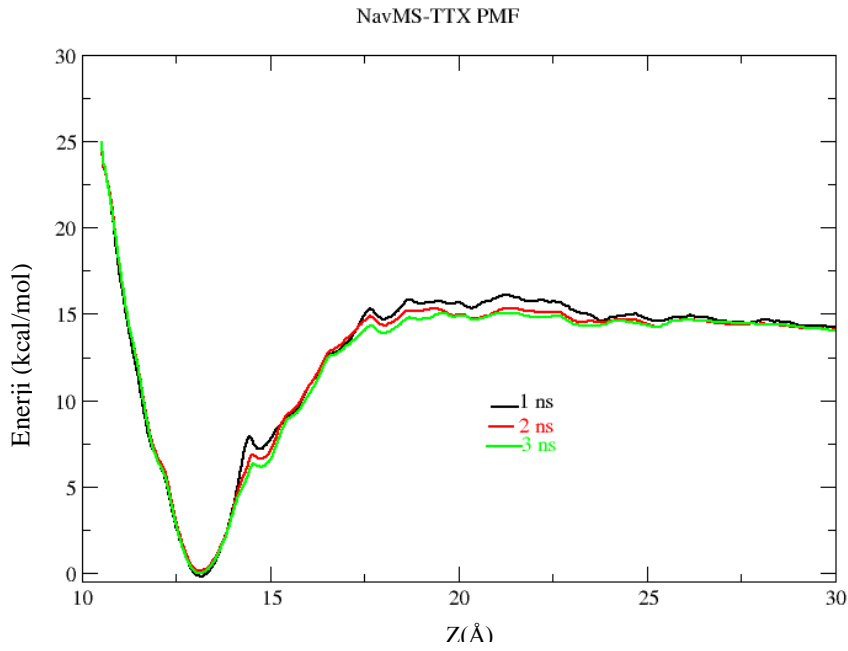
İyonların NavMs bağlanma bölgelerinden ayrılması için ortalama kuvvet (PMF) potansiyeli, şemsiye örnekleme MD simülasyonları kullanılarak oluşturulmuştur. Yöntem daha önce (Bölüm 2) ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu kısımda simülasyon detaylarına dair kısa bir açıklama verilmektedir. Tüm hesaplamalarda reaksiyon koordinatı, kanal ekseni boyunca iyonların ve NavMs protein kanalının kütlelerin merkezi arasındaki uzaklık olarak seçilmiştir. Şekil 3.6 (a)'da protein yapı ile birlikte z ekseni boyunca PMF yapılacak bölgedeki (+30 Å ile -30 Å aralığında) su molekülleri görülmektedir. Şekil 3.6 (b)'de filtre bölgesinde bir sodyum iyonu varken Şekil 3.6 (c)'de filtre bölgesinde iki sodyum iyonu varken, Şekil 3.6 (d)'de filtre bölgesinde üç sodyum iyonu varken NavMs yapısının görüntüleri verilmiştir. Şekil 3.6'dan da anlaşılacağı gibi kanalın açık bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. PMF yapılırken, kuvvet sabiti  $k=15 \text{ kcal/mol/Å}^2$  ile kanal ekseni boyunca 0.5 Å aralıklarla 120 umbrella penceresi oluşturularak US MD örnekleme yapılmıştır. Bu boyuttaki iyonlar için aynı kuvvet sabiti, şemsiye örnekleme simülasyonlarında kullanılması yeterlidir (Baştuğ ve ark., 2008). Yansız (unbiased) simülasyonlardan toplanan iyon koordinatları ağırlıklı histogram analizi yöntemi (WHAM) kullanılarak birleştirilir (Kumar ve ark., 1992). Her bir pencere 6 ns için simüle edildi ve verilerin yakınsamış PMF elde etmek için yeterli olduğu görüldü.

NavMs-TTX kompleksinde en kararlı yapının seçilmesinden sonra yapının enerji profilinin çıkarılması için de PMF hesabı yapılmıştır. PMF hesabının yapılmasında yukarıda anlatılan prosedür aynen uygulanmıştır. Bunun üzerine TTX (z:+10.5)'dan (z:+33)'e kadar çekilmiştir. TTX'in NavMs kanalı boyunca PMF hesabının yapılması için WHAM ile birleştirilmiş US metodu kullanılmıştır. NavMs iyon PMF'inde uygulanan aynı prosedür bu kısımda da tekrarlanmış ve 0,5 Å aralıklarla simülasyon pencereleri oluşturulmuştur. Her pencere 3 ns tekrar edilmiştir. Hesaplanan PMF Şekil 3.12'de verilmiştir. Grafiklerin birbirine yakınsadığı görülmektedir. TTX'in bağlanma sabiti literatürde 36 nM olarak verilmektedir. Bu değer hesaplanan PMF profilinden bağlanma sabitinin bulunması için Eşitlik 3.2'ye

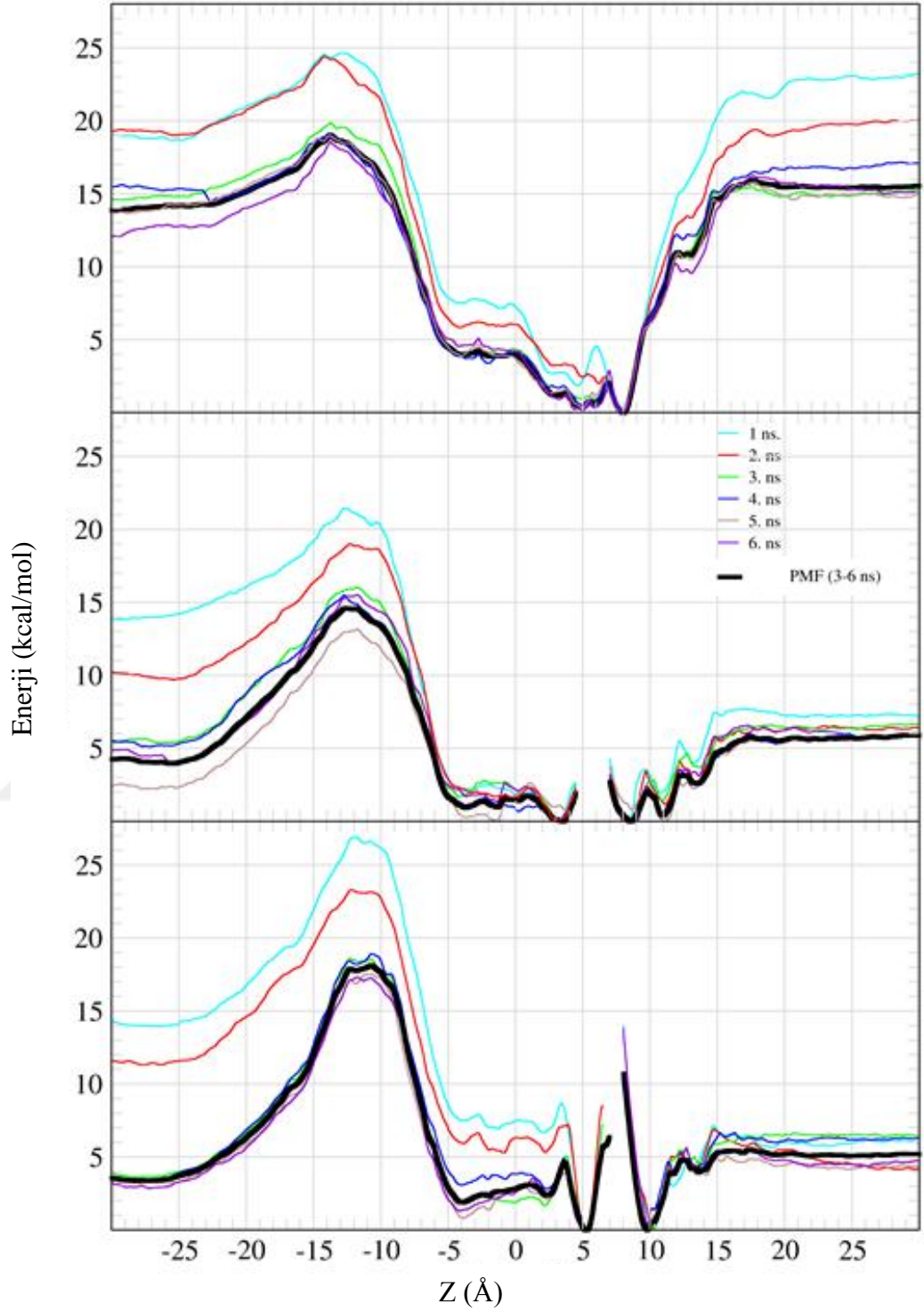
kullanılmıştır (Gordon ve ark., 2013).Yapılan PMF sonucunda elde edilen bağlanma sabiti değeri 22 nM olarak bulunmuştur.

$$K_d^{-1} = 1000\pi R^2 N_A \int_{z_0}^{z_1} \exp\left[\frac{-w_1(z)}{kT}\right] dz \quad (3.2)$$

Eşitlik (3.2)'de verilen denkleme göre; k Boltzman sabitini; T (K) cinsinden sıcaklığı, NA Avagadro sayısını,  $\pi R^2$  ligandın kütle merkezi (COM) esas alınarak bağlanma bölgesinin ortalama kesit alanını, z0 ve z1 PMF için seçilen yolu ifade ederken, W(z) z eksenı boyunca yapılan PMF'den elde edilen potansiyel terimidir.



Şekil 3.12: : NavMs ve TTX kompleksinden elde edilen PMF grafiği.



Şekil 3.13 : (a) Filtrede bir iyon varken (b) Filtrede iki iyon varken (c) Filtrede üç iyon varken hesaplanan PMF grafikleri.

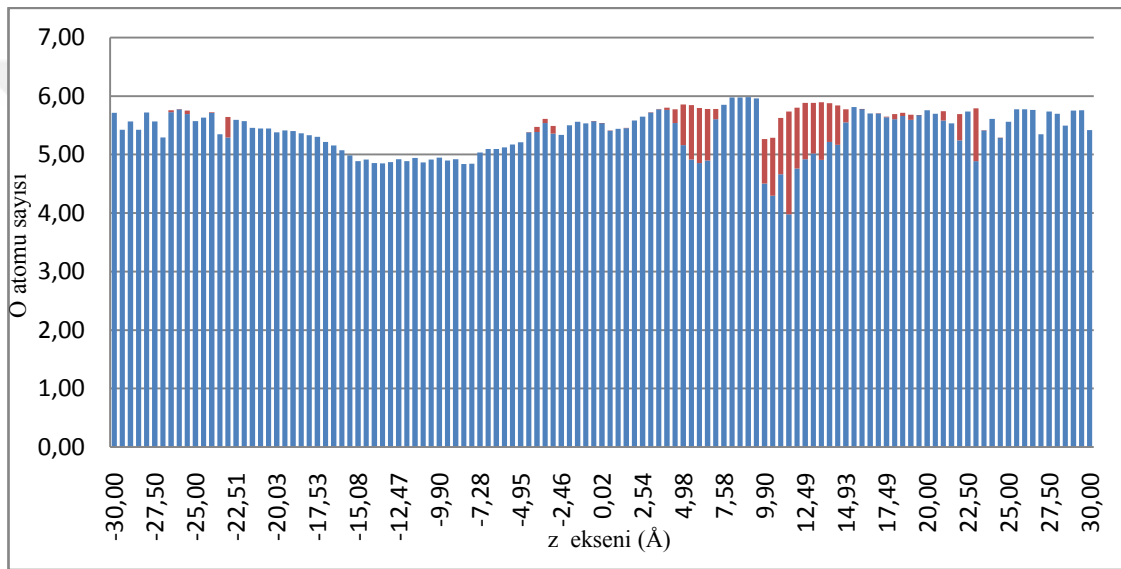
### 3.6 Sonuç ve Tartışma

Şekil 3.13’de seçilen reaksiyon koordinatı boyunca simülasyon verilerinden WHAM analizi yapılarak elde edilen PMF grafikleri verilmiştir. Her PMF hesabı 6 ns iş koşturularak yapılmıştır. Şekil 3.13 (a)’da tek iyon için Şekil 3.13 (b)’de iki iyon için Şekil 3.13 (c)’de ise üç iyon için PMF hesabı yapılmış ve PMF hesaplarına ait grafikler verilmiştir. Her üç PMF hesabından elde edilen eğrilerden PMF’in yakınsadığı görülmektedir. Grafikte görülen çukurlar bağlanma pozisyonlarını göstermektedir. Ayrıca, grafik her ne kadar potansiyel minimum pozisyonlarını tutarlı olarak gösterse de her bir eğride potansiyel değerleri dalgalanmaktadırlar. Potansiyel platosunun bulunduğu bölgede iyon kanalı terk etmiş ve tamamıyla su (bulk) içerisine girmiştir. MD simülasyonlarına bakıldığında filtrede tek iyon değil daha fazla iyon olduğu görülmüştür.

Şekil 3.13 (a)’da tek iyon için PMF hesabı yapılmıştır. Aslında daha önceden yapılan MD hesaplarından da öngörüldüğü üzere bu durum pek olası değildir. Yani sodyum kanalından sadece tek iyonun geçmesi mümkün değildir. Şekil 3.13(a)’da da görüldüğü üzere iyon bağlanma pozisyonu ve bulk arasında yaklaşık 15 kcal/mol’lük bir enerji farkı olması bu durumu doğrular niteliktedir. Bu çok yüksek bir enerji bariyeridir.

Bu nedenle filtrede bir iyonun varlığında başka bir iyonun PMF hesabı yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Şekil 3.7’de verilen grafikte de görüldüğü üzere MD sırasında 2. iyon filtreye kendisi girmiştir. İki iyon PMF işlemi sırasında sistem tekrar dengeye getirilmiştir. Tek iyon PMF hesabından farklı olarak burada 1. iyon filtredeyken 2. iyon aşağı yönde (intracellüler sıvıya doğru) çekilmek suretiyle PMF yapılmıştır (Şekil 3.13 (b) sol taraf). Sonrasında 2. iyon filtredeyken 1. iyon yukarı yönde (ekstraselüler sıvıya doğru) çekilmek suretiyle PMF yapılmış (Şekil 3.13 (b) sağ taraf) ve bütün yapılan PMF hesapları WHAM ile birleştirilmiştir. Şekil 3.13 (b)’de 1. iyon z ekseninde 8.3 Å civarında bir minimum yapmış ve 2. iyon z ekseninde 3.0 Å civarında bir minimum yapmıştır. Bu sonuçlar PMF hesabımız ile Şekil 3.7’de verilen MD hesabının tam bir uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. Yine daha önce yaptığımız MD hesaplarından kanal içinde 3 adet sodyum iyonunun kaldığı görülmektedir (Şekil 3.8). 3 iyon için de PMF hesabı yapılması gerekliliği ortaya çıkmış ve 6 ns için yapılmıştır. MD simülasyonlarında 1. iyon olarak tabir edilen iyon yukarı (ekstraselüler sıvıya doğru) doğru çekilirken 2. ve 3. iyonlar kanal

içinde serbest bırakılarak PMF grafiğinin sağ tarafı oluşturulmuştur. 3. iyon olarak isimlendirilen iyon ise aşağı (intraselüler sıvıya doğru) doğru çekilirken 1. ve 2. iyon kanal içinde serbest bırakılmış ve PMF grafiğinin sol tarafı oluşturulmuştur. Tüm bu yapılan PMF hesapları WHAM ile birleştirilmiş ve Şekil 3.13 (c) ile gösterilmiştir. İyon pozisyonlarının Şekil 3.13 (b)'de görüldüğü bir miktar kaydı olduğu ancak MD hesaplarında verilen ve 3 iyonun kanal içinde durduğu Şekil 3.8'e bakıldığında son derece uyumlu olduğu görülmektedir. Şekil 3.13 (c)'de PMF hesabında enerji bariyerinin 3-4 kcal/mol çıkması, yapıda üç iyonun olması gerektiğini vererek doğru yolda olduğumuzun bir kanıtı olarak gösterilebilir.

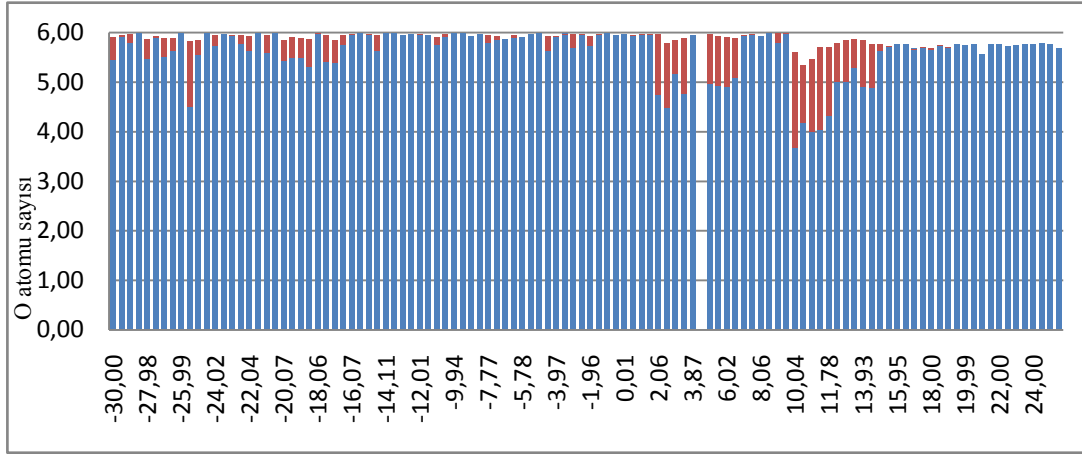


Şekil 3.14 : Bir iyon PMF hesabı için iyon etrafındaki su miktarlarının değişimi.

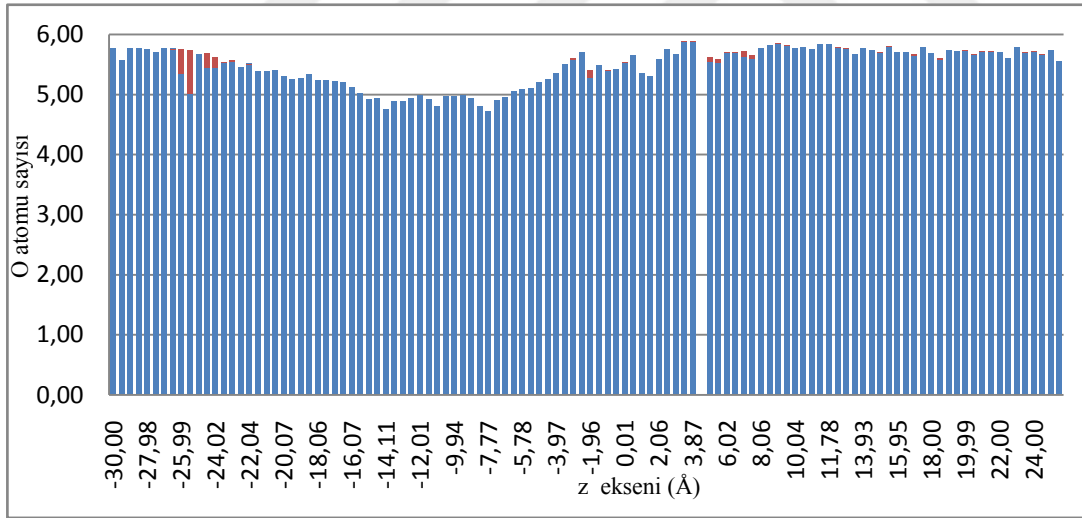
PMF hesaplarını daha derinlemesine incelemek ve kanalın aktif bölgesini daha iyi anlamak amacıyla bazı analizler yapmak uygun olacaktır. Bunlardan bir tanesi yapılan tüm PMF'ler boyunca sodyum iyonları etrafındaki su sayılarını incelemektir. Literatürde sodyum iyonu etrafında birinci su kabuğu olarak adlandırılan bölgede yaklaşık 6 adet oksijen iyonu bulunmalıdır. Tek iyon PMF hesabı için sodyum iyonu etrafındaki oksijen miktarları Şekil 3.14'de verilmiştir. Bu grafikler ile sodyum iyonlarının su kabuğunun oluşmasında etkili olan O atomlarının hangi moleküllerden kaynaklandığı açıkça görülebilmektedir. Grafikte verilen mavi kısım sudan, turuncu kısım proteinden kaynaklı oksijen miktarlarıdır.

2 iyon PMF hesabı için sodyum iyonu etrafındaki oksijen miktarları Şekil 3.15'de verilmiştir. Şekil 3.15 (a)'da 1. iyon, Şekil 3.15 (b)'de 2. iyon etrafındaki su

miktarları verilmektedir. 2. iyon aşağı yönde ( $-30 \text{ \AA}$ ,  $+4 \text{ \AA}$ ) çekilirken 1. iyon kanal içinde durmaktadır. ( $+5 \text{ \AA}$ ,  $+30 \text{ \AA}$ ) aralığında 2. iyon kanalda durmakta ve 1. iyon yukarı doğru çekilmektedir. Grafikte verilen mavi kısım su moleküllerinden gelen O atomlarının sayısını ifade ederken, turuncu ile gösterilen kısımlar NavMs kanalının rezidülerindeki O atomlarının miktarıdır.



(a)

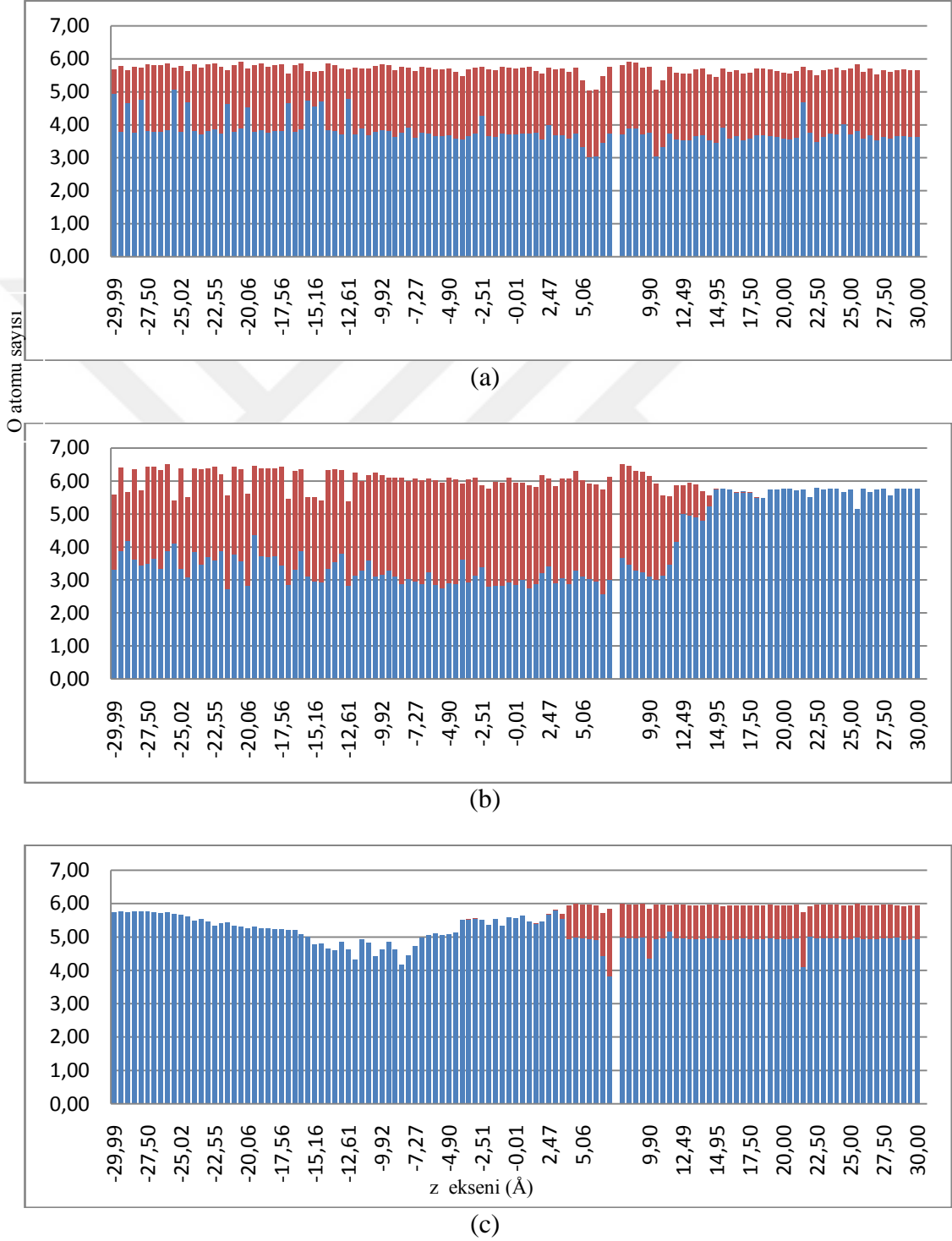


(b)

Şekil 3.15 : (a) 1. iyon (b) 2. iyon için etrafındaki su miktarlarının değişimi. 2. iyon aşağı yönde ( $-30 \text{ \AA}$ ,  $4 \text{ \AA}$ ) çekilirken, 1. iyon kanalda durmaktadır. 2. iyon kanalda iken 1. iyon yukarı doğru ( $5 \text{ \AA}$ ,  $+30 \text{ \AA}$ ) çekilmektedir.

3 iyon PMF hesabı için sodyum iyonu etrafındaki oksijen miktarları Şekil 3.16'da verilmiştir. Şekil 3.16 (a)'da 1. iyon, Şekil 3.16 (b)'de 2. iyon ve Şekil 3.16 (c)'de 3. iyon etrafındaki su miktarları verilmektedir. 2. iyon sürekli kanal içinde kalmaktadır.

1. iyon üstte duran iyondur ve (-30 Å, 6 Å) aralığında kanalda durmakta ve (8 Å, 30 Å) aralığında yukarı doğru çekilmektedir. 3. iyon en altta duran iyondur ve (-30 Å, 6 Å) aralığında aşağı doğru çekilmektedir (8 Å, 30 Å) aralığında kanalda durmaktadır. Grafikte verilen mavi kısım sudan, turuncu kısım proteinden kaynaklı oksijen miktarlarıdır.



Şekil 3.16 : 3 iyon PMF hesabında (a) 1. iyonun (b) 2. iyonun (c) 3. iyonun etrafındaki su miktarlarının değişimi.

2 iyon her zaman kanal içinde bulunurken, 1. iyon kanalın üst kısmında duran iyondur ve (-30 Å, 6 Å) aralığında kanalda durmakta ve (8 Å, 30 Å) aralığında yukarı doğru çekilmektedir. 3. iyon kanalın en altında duran iyondur ve (-30 Å, 6 Å) aralığında aşağı doğru çekilmektedir.

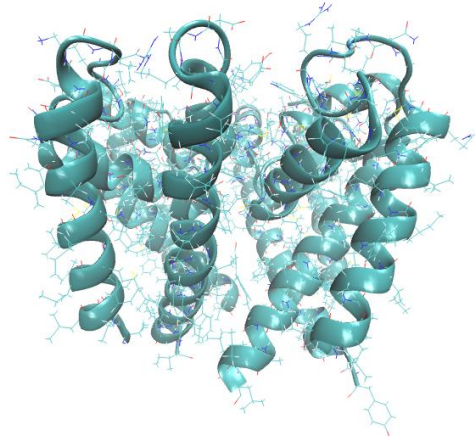




## 4 Nav1.4 KANALININ HOMOLOJİ MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

### 4.1 NavMs Kanalından Nav1.4 Kanalının Modellenmesi

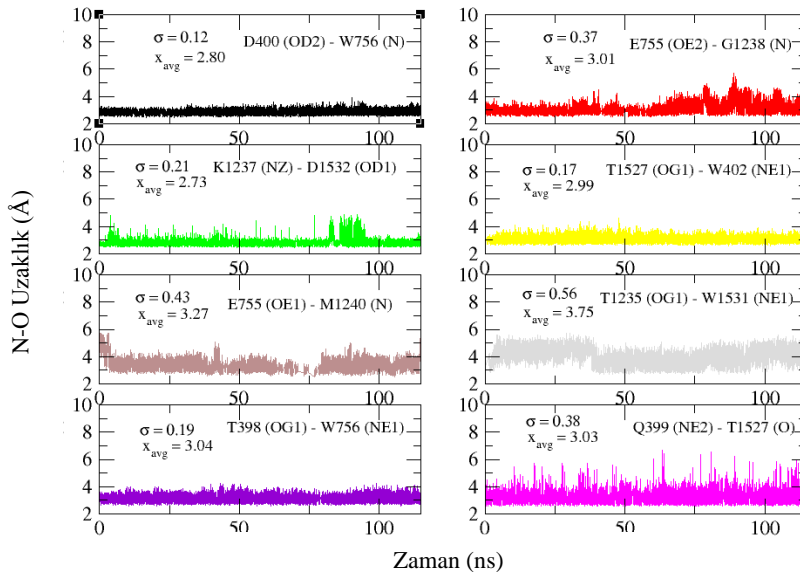
Homoloji modellemesi kristal yapısı bulunmuş olan yapıların şablon olarak kullanılıp literatürde kristal yapısı bilinmeyen ancak sadece protein sekansına dair bilgi bulunan yapıların üç boyutlu yapısının modellenmesidir. Bu çalışmalar sodyum kanallarındaki işlevsel verileri yorumlamak ve bunların nasıl çalıştığını anlamak için gereklidir. Bu çalışmada Nav1.4 memeli voltaj kapılı sodyum (Nav) kanallarının homoloji modelinin geliştirilmesi NavMs kristal yapısından türetilerek yapılmıştır. Nav1.4 kanalının sekansı Uniprot data bankasından (P15390) alınmıştır. NavMs ve Nav1.4 kanalları arasındaki aminoasit benzerliğinin tayini ve doğru bir homoloji modeli yapılabilmesi için kanalların aminoasit dizilimleri her bir domain için alt alta getirilerek seçici filtre (SF) bölgesi etrafında ClustalW programı ile hizalanmıştır. Yapılan bu işlem Tablo 4.1’de verilmiştir. Homoloji modelinin oluşturulması MODELLER (Sali ve ark., 1993) programı yardımıyla yapılmıştır. Oluşturulan modelin görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 : NavMs kanalından modellenen Nav.1.4 kanalı.

Model oluşturulurken korunan aminoasitler aynen kalırken, korunmayan aminoasitler mutasyona uğratılmaktadır. Bu nedenle seçilen şablon oldukça önem arz etmekte ve hizalama işlemi de doğru bir model oluşturulması için en önemli basamak haline gelmektedir. Nav kanallarında domainlerdeki aminoasitler kendi arasında bağ

yaparken, domainler arası bağ oluşumu da daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mahdavi ve ark., 2015) MODELLER programında model oluşturulurken NavMs kanalında var olan bu bağlar ve uzunlukları tespit edilip Nav1.4 kanalında da korunanlar ile eşleştirilmiştir ve MODELLERprogramına kısıtlama olarak verilmiştir. Böylece Nav1.4 için baz olarak kullanılan kanalın yapısına uygun bir model ortaya çıkarılmıştır. Modelin oluşturulmasından sonra moleküler dinamik simülasyonları yapılmıştır. MD prosedürü NavMs sisteminin kurulmasıyla aynıdır. Burada yapılan simülasyondaki farklılık sadece konstraint bilgisidir. Başlangıçta omurga atomlarına ve filtredeki bağ yapan Asp 400, Glu755, Lys 1237, Thr 1527, Gly 1238, Trp 402, Asp 1532, Thr 1235, Trp 1531, Thr 398, Trp 756, Gln 399, Met 1240 aminoasitlerin her bir atomuna 10 kcal/mol'lük bir konstraint uygulanmıştır. Omurga atomlarında bulunan kısıtlama ilk 10 ns boyunca her 1 ns'de 1 kcal/mol azaltılarak 11.ns 'de sıfırlanmıştır. Bağ yapan aminoasitlerde bulunan atomlardaki kısıtlamalar da ilk 9 ns boyunca her 1 ns' de 1 kcal/mol azaltılarak 10.ns'de 1 kcal/mol, 11.ns'de 0.5 kcal/mol konstraint olacak şekilde bırakılmıştır. 12.ns'den itibaren bağ yapan aminoasitlerde bulunan atomlardaki kısıtlama da kaldırılmıştır ve bu zamandan sonra sistemde hiçbir kısıtlama uygulanmamıştır.



Şekil 4.2 : Seçici filtrede bulunan rezidülerin kendi aralarında yaptıkları bağ uzunlukları ve zamanla değişiminin gösterilmesi.

Şekil 4.2'de ilgili aminoasitlerdeki N-O atomlarının bağ uzunluklarının 115 ns boyunca zamanla değişimi görülmektedir. Burada sigma ile verilen standart sapma

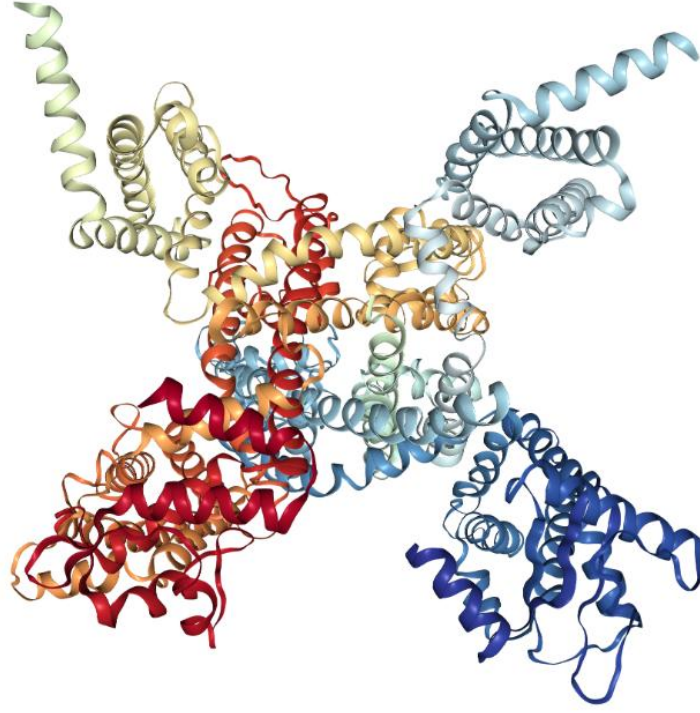
ve  $x_{avg}$  ortalama ile gösterilen ise bağ uzunluğunu göstermektedir. Bağ yapan Asp 400 (OD2), Glu 755 (OE2), Lys 1237 (NZ) ve Thr 1527 (OG1) aminoasitleri Mahdavi (2015) çalışmasında da gösterilmiştir. Bunlara ek olarak konstraint verilerek başlanan prosedür uygulandığında Glu 755 (OE1) ile Met 1240 (N), Thr 1235 (OG1) ile Trp 1531 (NE1), Thr 398 (OG1) ile Trp 756 (NE1) ve Gln 399 (NE2) ile – Thr 1527(O) bağlarının da kararlı bir davranış oluşturduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.1: NavMs ve Nav1.4 kanalları arasındaki sekansların hizalanması.

	P1 Heliks	SF	P2 Heliks
<b>Domain I</b>			
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
<b>Domain II</b>			
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
<b>Domain III</b>			
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-IHYAAVD
<b>Domain IV</b>			
NavMs	SLYTLFQVM	TLESW	SMGIVRPVMN
Nav1.1	SMICLFQIT	TSAGW	D-GLLAPILN
Nav1.2	SMICLFQIT	TSAGW	D-GLLAPILN
Nav1.3	SMICLFQIT	TSAGW	D-GLLAPILN
Nav1.4	SIICLFQIT	TSAGW	D-GLLNPILN
Nav1.5	SMLCLFQIT	TSAGW	D-GLLSPILN
Nav1.6	SMICLFQIT	TSAGW	D-GLLLPILN
Nav1.7	SMICLFQIT	TSAGW	D-GLLAPILN
Nav1.8	SMLCLFQIT	TSAGW	D-GLLSPILN
Nav1.9	SMLCLFQIS	TSAGW	D-SLLSPMLR

## 4.2 NavPas Kanalı ile Yapılan Çalışmalar

Tez çalışması sırasında yeni bir sodyum iyon kanal türü olan ve Periplaneta americana'dan izole edilen NavPas kanalının yapısının bulunması (Şekil 4.3) ve insan kanalları ile olan benzerliğinin bakteriyel kanallara oranla daha fazla olması bu kanallar üzerine de bir çalışma yapılması gereği ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.3 : NavPas iyon kanalı (Shen ve ark., 2017).

NavPas, seçici filtresi üzerinde önemli etkisi olan DEKA rezidülerinin aynı olması ve yüksek oranda korunmuş transmembran segmentler ile birlikte memeli kanallarından Nav1.1-1.9 ile %36-%43 oranlarında aminoasit sekanslarının benzerliği vardır. Varyasyonlar çoğunlukla tekrarlar arasındaki hücre içi bağlayıcılarda bulunur. 1553 aminoasitten oluşan NavPas, sekans uzunlukları 1800 ve 2050 arasında değişen memeli ve diğer böcek homologlarına kıyasla oldukça kısa DI-DII ve DII-DIII bağlayıcılarına sahiptir. NavPas'ın DIII-DIV bağlayıcısı, memeli kanallarınıninkilerle aynı uzunluktadır, ancak hızlı inaktivasyon için kritik olan Ile / Phe /Met / Thr (IFMT) veya benzer rezidüleri içermez. NavPas kanalı seçici filtre (SF) bölgesinin üst kısmında Asp 375, Glu 701, Lys1061, Ala 1353 rezidülerini içermektedir ve her bir zincirde bu rezidüleri kendisinden sonra gelen iki aminoasitin karbonil oksijenleri takip etmektedir. DEKA'nın üstünde, Glu 378 ,Glu 704 , Gln 1065 , Asp 1356'dan oluşan dış negatif halka SF vestibülünün girişini koruyan bir yapı oluşturmaktadır. Memeli kanallarında da korunan bu yapıda Gln 1065 yerine Asp aminoasiti karşılık gelmektedir.

Bakteriyel bir Nav kanalının SF vestibülü ayrıca dış bölge için yan gruplar ve iç bölge için sekiz karbonil oksijen atomu içermektedir. Bununla birlikte ökaryotik Nav

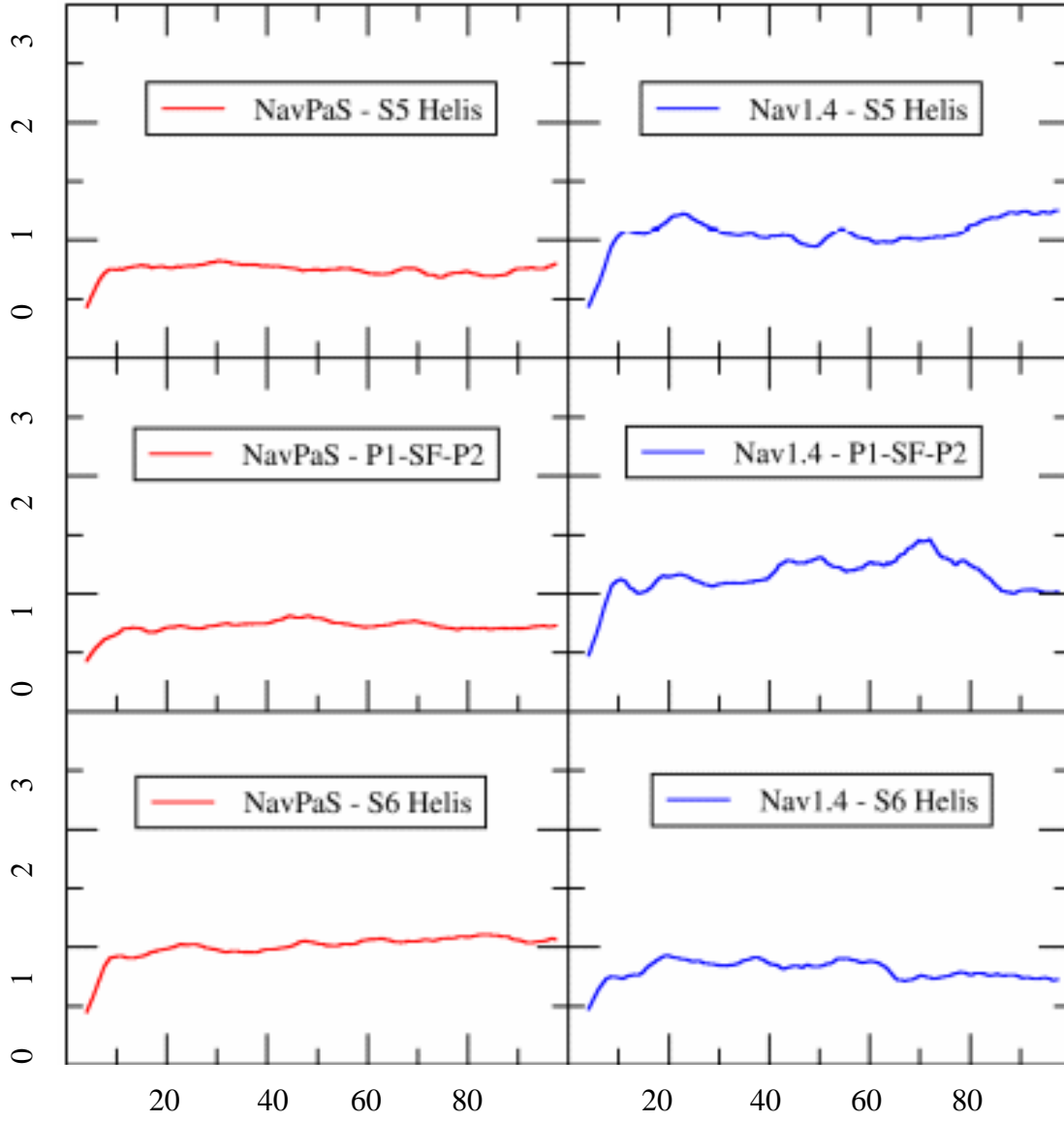
kanalı SF vestibülü bakteriyel muadillerinden yapısal konformasyon ve kimyasal bileşim açısından farklıdır. Bu farklılık bakteriyel ve ökaryotik kanallar arasındaki seçicilik mekanizmasının araştırılması için moleküler temel sağlar. Bu amaçla Nav kanallarının çalışma mekanizmalarında etkili olan tüm parametrelerin ortaya çıkarılması için farklı kanalların üzerinde çalışılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Nav1.4 proteini ve Navpas kanalları arasındaki yapı benzerliği proteinin tamamı için %75'ten fazladır. Toksin bağlanma mekanizmasında etkin olduğu düşünülen (S5-S6 heliks) bölgelerinde benzerlik oranı ise %90'dan fazladır. NavPas ve Nav1.4 kanalları arasında yapılan hizalama işlemi Şekil 4.5'de verilmiştir. Domain 1 bölgesinde seçici filtrede yalnızca bir tane aminoasit farklıdır. NavPas ve NavMs yapısından elde edilen Nav1.4 kanallarının aralarındaki zincir uzunluğu ve benzerliklerin yanı sıra önemli iki fark daha bulunmaktadır. Birincisi Domain I'de filtre bölgesinde bulunan tirosin aminoasitinin yönelişi ikincisi ise hücre dışı bölge olarak adlandırılan kısmın modellenmiş olmasıdır.

NavMs yapısının şablon olarak kullanıldığı modelden farklı olarak, NavPas yapısının daha uzun protein zinciri içeriyor olması nedeniyle, bu homoloji modelinde hücre dışında bulunan bölgenin modellenmesi de mümkün olmuştur. Nav1.4 yapısında bu bölge, Navpas yapısından daha uzun bir protein zincirine sahip olduğu için bu bölgeyi modellerken ITASSER (Zhang ve ark., 2008) programı kullanılmış ve bu bölge MODELLER programı ile oluşturulan Nav1.4 yapısına eklenmiştir.

Elde edilen Nav1.4 homoloji modeli ve NavPas yapısı arasında RMSD hesabı yapılmıştır. Şekil 4.4 ile verilen grafiklerde en fazla RMSD değeri 3.36 Å ile Domain I'in hücre dışı bölgesinde olduğu tespit edilmiştir.

Bu değerlerin fazla olmasındaki en önemli parametreler bölgenin hücre dışında ve hareket edebilme yeteneğinin fazla olması ve Nav1.4 ile NavPas yapılarının sekanslarında en fazla farklılığın bu bölgede bulunuyor olmasıdır. Bu bölge dışında kalan bölgelerde RMSD değerleri yaklaşık 1 Å'dur ve hücre zarı içerisinde kalan kısımda RMSD değerleri daha da azalmaktadır.

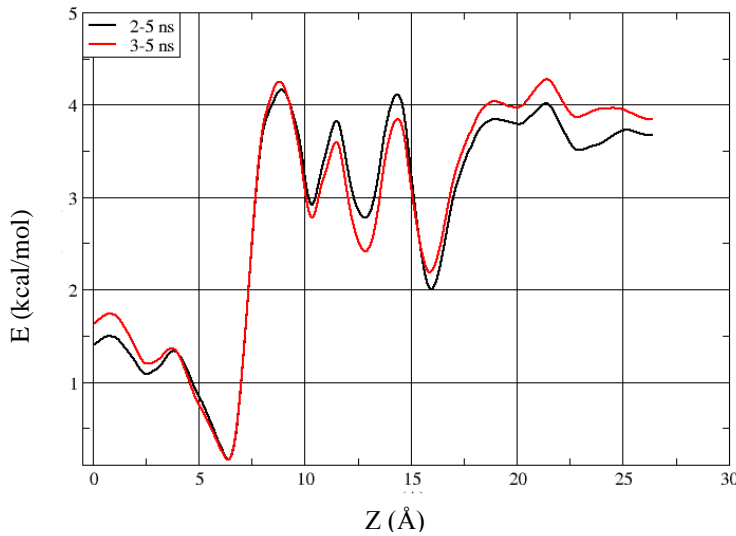


Şekil 4.4 : NavPas ve Nav.14 kanalları arasında yapılan RMSD hesabı.

NavPas Rezidü No	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	
NavPAS	L	V	M	L	L	L	T	V	F	S	L	V	F	F	A	V	L	G	L	O	L	F	M	G	N	L	Q	K	C	V	K	R	H	F	P	A	D	S	W	G
Nav1.4	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Nav1.4Rezidü No	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	
NavPAS Rezidü No	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337		
NavPAS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Nav1.4	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
Nav1.4Rezidü No	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337		
NavPAS Rezidü No	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
NavPAS	P	P	G	Y	T	C	L	Q	G	G	G	N	P	N	P	N	Y	G	Y	T	S	D	F	G	W	A	F	L	S	V	F	R	L	T	D	Y	W	E	N	
Nav1.4	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	
Nav1.4Rezidü No	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377
NavPAS Rezidü No	388	389	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	
NavPAS	I	V	F	Y	G	T	F	C	F	L	N	F	L	L	A	V	V	M	S	N	V	M	Y	V	M	F	L	L	F	I	F	A	I	G	M	Q	L	F		
Nav1.4	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	
Nav1.4Rezidü No	388	389	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	
NavPAS Rezidü No	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	
NavPAS	R	W	H	M	H	D	F	L	S	F	M	L	V	F	R	A	L	C	G	E	W	I	E	S	M	W	D	C	M	L	V	.	G	D	W	S	C			
Nav1.4	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	
Nav1.4Rezidü No	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	
NavPAS Rezidü No	740	741	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019			
NavPAS	L	V	I	L	V	G	I	F	F	W	L	V	F	A	I	M	G	V	Q	L	F	A	G	K	F	Y	K	C	V	D	E	N	S	T	V	L	S			
Nav1.4	318	319	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373			
Nav1.4Rezidü No	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074			
NavPAS	E	N	S	P	M	N	F	D	H	V	G	N	A	Y	L	S	L	Q	V	A	T	F	K	G	W	L	Q	I	M	D	A	I	D	S	R	E	V			
Nav1.4	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433			
Nav1.4Rezidü No	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074			
NavPAS	L	N	V	K	V	N	Y	D	N	Y	D	N	V	G	L	G	Y	L	Q	V	A	T	F	K	G	W	L	Q	I	M	D	A	I	D	S	R	E			
Nav1.4	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433			
Nav1.4Rezidü No	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074			
NavPAS	F	G	S	F	F	L	K	L	F	E	I	C	G	V	I	I	G	L	L	F	V	M	F	Y	A	V	F	F	M	E	F	H	R	D	A	G	A			
Nav1.4	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493			
Nav1.4Rezidü No	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074			
NavPAS	F	G	S	F	F	L	K	L	F	E	I	C	G	V	I	I	G	L	L	F	V	M	F	Y	A	V	F	F	M	E	F	H	R	D	A	G	A			
Nav1.4	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493			
Nav1.4Rezidü No	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074			
NavPAS	F	O	L	A	T	S	A	G	W	D	G	V	F	A	A	N	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
Nav1.4	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	54																							

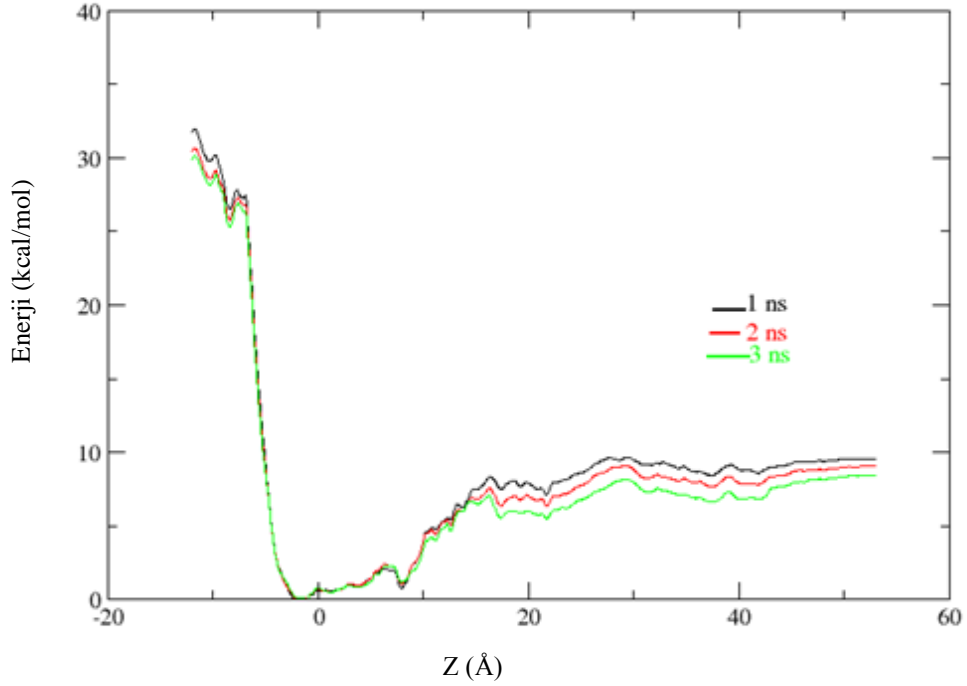
### 4.3 NavPas ve Nav1.4 Kanalları için Yapılan PMF Hesaplamaları

Nav1.4 kanalı için şablon olarak kullanılan NavPas kanalının mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve simülasyon boyunca nasıl bir davranış gerçekleştirdiğini anlayabilmek için NavPas kanalı için de VMD programı ile palmitoylcholine (POPC) lipitleri seçilerek  $100 \times 100 \text{ \AA}^2$  boyutunda xy düzleminde bir lipit zincirinden oluşan bilayer elde edildi ve protein bu yapının içerisine gömüldü. Membran içine gömülü yapıyı fizyolojik ortama benzetmek için sisteme su molekülü eklemek suretiyle membran protein sistemi oluşturuldu ve sistemi nötralleştirmek ve fizyolojik değeri sağlamak amacıyla 0.15 Molarlık bir iyon konsantrasyonu eklendi ( 34  $\text{Na}^+$ , 24  $\text{Cl}^-$  atomu) ve NavMs sistemi gibi yapılan  $100 \times 100 \times 100 \text{ \AA}^3$  bir sistem kurulmuş MD simülasyonunun basamakları tekrarlandı. 100ns MD simülasyonu yapıldı. MD simülasyonunda bir sodyum iyonunun simülasyonun ilk basamaklarında kanal içine girdiği ve sürekli orada bulunduğu gözlemlendi. z koordinatı 6  $\text{\AA}$ 'da bulunan bu iyon için, NavMs 'de kullanılan prosedürün aynısı kullanılarak filtre içindeki iyon kanal boyunca 0  $\text{\AA}$ 'dan 26.5  $\text{\AA}$ 'a kadar 0.5  $\text{\AA}$  aralıklarla şemsiye örnekleme simülasyonu metodu ile z yönünde 0.15 kcal/mol 'lük bir konstraint ile çekilerek PMF hesabı yapılmıştır. PMF hesabı 9 ns boyunca tekrarlanmış ve kümülatif bir grafik çizilmiştir. PMF hesabı Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 : NavPas tek iyon PMF.





Şekil 4.7 : Nav1.4 tek iyon PMF grafiği.

Yapılan PMF hesabından görüldüğü üzere iyonun filtre içinde bulunduğu bölgedeki potansiyel kuyusunun derinliği yaklaşık 4 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Nav.14 kanalı için de  $100 \times 100 \times 120 \text{ \AA}^3$  lük bir sistem oluşturulmuş ve NavPas sistemi ile aynı prosedür olacak şekilde MD yapılmıştır. 100ns yapılan MD sonucunda Nav1.4'ün filtre kısmında bulunan tek iyon için de PMF hesabı yapılmıştır. Kanal boyunca z yönünde  $-11 \text{ \AA}$  'dan  $53 \text{ \AA}$  'a kadar iyon üzerine uygulanan z yönünde 0.15 kcal/mol'lük bir konstraint ile PMF hesabı yapılmıştır. Hesaplama 9 ns boyunca tekrarlanmıştır ve kümülatif bir grafik çizilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.7'de verilmiştir. Yapılan PMF hesabından z yönünde  $-2 \text{ \AA}$  ve  $0 \text{ \AA}$  konumlarında potansiyel kuyuları olduğu ve derinliklerinin de yaklaşık olarak 7 ile 8 kcal/mol olduğu bulunmuştur.

#### 4.4 Sonuç ve Tartışma

NavPas yapısı üzerine kurulu Nav1.4 kanalından elde edilen PMF ile NavPas PMF kıyaslandığında enerji bariyerlerinin birbirlerine oldukça yakın olması kanalların birbirleriyle olan benzerliğini bir kez daha ortaya koymuştur. Nav1.4 kanalının

homoloji modellenmesi için çalışılan NavMs ve NavPas kanallarından elde edilen sonuçlar göstermiştir ki filtre yapısı iyon geçişinde ki en önemli bölgedir. Doğru bir homoloji modelinin elde edilmesi ve doğruluğunun tespitindeki en önemli basamak da yine bu bölgenin yapısının ve aminoasitlerin yönelişlerinin tespitinden geçmektedir. İyonların filtre kısmına yönelmesinde ve kanalın aktif duruma geçişinin kontrolü için sadece filtredeki aminoasitler değil iyonları bu bölgeye çeken kimyasal çevre dolayısıyla kanalın filtre kısmının dışında kalan diğer bölgeler de önem arz etmektedir. Bu nedenle NavPas yapısı hem ökaryotik bir kanal olması nedeniyle hem de Nav1.4 kanalı ile benzerliğinin NavMs kanalına göre daha fazla olması hasebiyle homoloji modeli oluşturulmasında ve daha gerçekçi bir memeli kanalının ortaya konulmasında daha başarılıdır. Bu da modellemede seçilen ve şablon olarak kullanılan kanalın önemini bir kez daha göstermiş ve yapılan çalışmada doğru yolda olunduğunun göstergesi olmuştur.

## 5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Nav kanalları biyolojik sistemlerde birçok fonksiyonun çalışmasında etkili olan protein yapılarıdır. Bu yapılardaki herhangi bir işlev bozukluğu birçok hastalığın meydana gelmesine neden olmaktadır. İlaç tasarımıdaki ilk basamak, hastalığa neden olan hedef yapının belirlenmesidir. Potansiyel ilaç tasarımı yapılacak olan bileşiklerin moleküler yapısının belirlenmesi için hedef yapının analizi önemlidir. Bu yapıların çalışma mekanizmalarının aydınlatılması ve ilaç bağlanmasında etkili olan rezidülerin belirlenmesi doğru bir ilaç tasarımı için gereklidir.

Bu tez çalışmasında, birçok hastalıkla ilintili olan memeli Nav kanallarının yapılarının belirlenmesi ve çalışma mekanizmalarının aydınlatılması için Nav kanallarında iyon geçişinin incelenmesi ve ligand bağlanması üzerine çalışılmıştır. Memeli Nav kanallarının kristal yapılarının olmayışı bu kanalların öncelikle homoloji modelinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Modelleme yapılmadan önce şablon olarak kullanılan bakteriyel kanalların da incelenmesi yapılmış ve iyon geçişi ile ligand bağlanması üzerine çalışılmıştır. Bu bilgiler ışığında NavMs kanallarında filtre kısmının 3 sodyum iyonu barındırabildiği anlaşılmış, 4. iyonun filtre kısmında karalı olarak bağlanamayacağı gösterilmiştir. NavMs ve TTX kompleksinin kararlı konformasyonu bulunmuş ve TTX bileşiğinin bağlanmasında etkili olan rezidüler belirlenmiştir. Komplekse dair elde edilen sonuçların deneysel çalışmalarla uyumlu olduğu bulunmuştur.

Tezin asıl hedefi olan memeli Nav kanallarının modellenmesi için bir başka kristal yapı olan NavPas kanalı için de serbest enerji hesaplamaları yapılmıştır. NavMs ve NavPas kanallarından modellenen Nav1.4 kanalları karşılaştırılarak, memeli Nav kanallarında şablon olarak kullanılacak yapının doğru seçiliminin önemi vurgulanmıştır. Modellerin karşılaştırılmasıyla elde edilen sonuç homoloji modellemesinde baz olarak kullanılacak yapının, modellenmesi yapılacak olan kanalla benzerliğinin en önemli parametre olduğudur. Bu sonuçlar ışığında, mevcut kristal yapılar arasında NavPas kanal yapısının memeli Nav kanallarının homoloji

modellemesinde şablon olarak kullanılması doğru bir modelin ortaya çıkması için oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasının Nav kanalları üzerine yapılacak olan çalışmalara; yapıların mekanizması, aktif rezidülerinin belirlenmesiyle deneysel çalışmaları yorumlayabilmede ve ilaç adayı olabilecek bileşiklerin tasarlanmasında teorik çalışmalara başlangıç teşkil etmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir. Son olarak tüm bilimsel çalışmalarda, teorik ve pratik bilginin birlikte kullanılmasının doğru ve nitelikli sonuçlara daha çabuk götüreceği vurgulanmak istenmiştir.



## KAYNAKLAR

- Al-Sabi,A.; McArthur, J.; Ostroumov, V.; French, R.J.** Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Mar. Drugs*(2006), 4, 157-192.
- Alonso, H., Bliznyuk, A.A., Gready, J.E.,** Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* (2006) 26, 531-568.
- Ashcroft, F.M.,** Ion Channels and Disease: Channelopathies, *Academic Press, San Diego*,(2000).
- Bagneris, C., Decaen, P.G., Naylor, C.E., Pryde, D.C., Nobeli, I., Clapham, D. E., Wallace, B.A.,** Prokaryotic Navms Channel as a Structural and Functional Model for Eukaryotic Sodium Channel Antagonism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2014). 111:8428.
- Bastug, T., Chen, P.C., Patra, S.M., Kuyucak, S.,** Potential of mean force calculations of ligand binding to ion channels from Jarzynski's equality and umbrella sampling. *J. Chem. Phys.* (2008),128.
- Bean, B.P., Cohen C.J., Tsien R.W.,** Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J Gen Physiol.* (1983) May; 81(5):613-42.
- Brunklaus, A., Ellis, R., Reavey E., Semsarian, C., Zuberi, S.M.,** Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *J Med Genet.* (2014), 51,650-8.
- Catterall, W.A., Goldin., A.L., Waxman S.G.,** International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium sodium channels. *Pharmacol Rev* (2005), 4, 397-409.
- Caterall W.A.,** From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, (2000), 26, 1325.
- Catterall W.A.,** Sodium channels, nherited epilepsy, and antiepileptic drugs.*Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (2014), 54, 317-38.
- Chang, G., Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T., Rees, D.C.** Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: A gated Mechanosensitive ion channel. *Science*, (1998), 282, 2220-2226.
- Chen, P.C., Kuyucak, S.,** Developing a comparative docking protocol fort he prediction of peptide selevtivity proles: investigation of potassium channel toxins. *Toxins*, (2012), 4, 110-138.
- Chen, P.C., Kuyucak, S.,** Mechanism and energetics of charybdotoxin unbinding from a potassium channel from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* (2009), 96, 2577-2588.
- Christ, C., Mark, A.E., van Gunsteren, W.F.,** Basic ingredients of free energy calculations. *J. Comput. Chem.* (2010), 31, 1569-1582.
- Clare, J.J., Tae, S.N., Nobbs M., Romanos, M.A.,** Voltage-gated sodium channel as therapeutic targets. *Drug Discov Today.* (2000), 5, 506, 52.
- Clare, J.J.,** Targeting voltage-gated sodium channels for pain therapy. *Expert Opin Investig. Drugs*, (2010), 19, 45-62.

- Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz Jr., K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., and Kollman, P.A.,** A second-generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* (1995), 117, 5179-5197.
- Deng, Y., Roux, B.,** Computations of Standard binding free energies with molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* (2009), 113, 2234-2246.
- Desaphy, J.F., Dipalma, A., Costanza, T., Bruno, C., Lentini, G., Franchini C., George A., Conte Camerino, D.,** Molecular determinants of state-dependent block of voltage gated sodium channels by pilsicainide. *Br J Pharmacol* (2010), 160(6):1521-1533.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R.,** The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, (1998), 280, 69-77.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R.,** X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, (2002), 415, 287-294.
- French, R.J., Terlau, H.,** Sodium channel toxins—receptor targeting and therapeutic potential. *Current Med. Chem.*, 2004, 11, 3053-3064.
- Gilson, M.K., Zhou, H.X.,** Calculation of protein-ligand binding energies. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2007), 36, 21-42.
- 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.
- Guvench, O., MacKerell, A.D. Jr.,** Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations methods. *Mol Biol.*, (2008), 443, 63-88.
- Hanck, D.A., Nikitina, E., McNulty, M.M., Fozzard, H.A., Lipkind, G.M., Sheets, M.F.,** Using lidocaine and benzocaine to link sodium channel molecular conformations to state-dependent antiarrhythmic drug affinity. *Circ Res.* (2009), 105(5):492-499.
- Hagen, N.A., Fisher, M., Lapointe, B., Souich, P., 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*, (2007), 34:171-182.
- Hille, B.,** Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug receptor reaction. *J Gen Physiol*, (1977), 69(4):497-515.
- Hille, B.,** Ionic Channels of Excitable Membranes. 3rd ed.: *Sinauer Assoc., Sunderland, MA, USA*, (2001).
- Hoeijmakers, J.G., Faber, C.G., Merkies, I.S., Waxman, S.G.,** Painful peripheral neuropathy and sodium channel mutations. *Neurosci Lett.* (2015), 596, 51-59.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.,** VMD- Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, (1996), 14, 33-38.
- Jensen, A.A., Frolund, B., Liljefors, T., Krosgaard-Larsen, P.,** Neuronal nicotinic Acetylcholine receptors: Structural revelations, target identification and therapeutic inspirations. *J. Med. Chem.* (2005), 48, 4705-4745.

- Jiang, Y.X., Lee, A., Chen, J.Y., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R.,** X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel, *Nature*, (2003), 243, 33-41
- Jin, L., Wu, Y.,** Molecular mechanism of dendrotoxin potassium channel recognition explored by docking and MD simulations. *J Mol. Recogn.* (2011), 24, 101-107.
- Jin, L., Wy, Y.,** Molecular mechanism of the sea anemone toxin ShK recognizing the Kv1.3 channel explored by docking and MD simulations. *J Chem. Inf. Model* (2007), 47, 1967-1972.
- Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., and Tirado-Rives, J.,** Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* (1996), 118, 11225-11236.
- Jurkat-Rott, K., Holzherr, B., Fauler, M., Lehmann-Horn, F.,** Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Muscle Nerve* (2010), 46, 239-48.
- Kale, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajan, K., Schulten, K.,** NAMD2 Greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comput. Phys.*(1999)- 151, 283-312.
- Kao C.Y.,** Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol Rev.*(1966), 18(2): 997-1049.
- Khabiri, M., Nikouee, A., Cwiklik, L., Grissmer, S.R., Ettrich, R.,** Charybdotoxin unbinding from the mKv1.3 potassium channel : a combined computational and experimental study. *J Phys. Chem. B* (2011), 115, 11490-11500.
- King, G.F., Escoubas, P., Nicholson, G.M.,** Peptide toxins that selectively target insect Nav and Cav channels, *Channels*, (2008), 2, 100-116.
- Klint, J.K., Sen, S., Rupasinghe, D.B., Er, S.Y., Herzig, V., Nicholson, G.M., King, G.F,** Spider venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads, *Toxicon*, (2012), 15, 478-91.
- Knapp, O., McArthur, J.R., Adams, D.J.,** Conotoxins targeting neuronal voltage gated sodium channel subtypes: potential anesthetic? *Toxins(Basel)*, (2012), 8, 1236-60.
- Kumar, S., Bouzida, D., Swensen, R.H., Kollman, P.A., Rosenberg, J.M.,** The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. *J. Comp. Chem.* (1992), 13, 1011-1021.
- Lee, S., Goodchild, S.J., Ahern, C.A.,** Local anesthetic inhibition of a bacterial sodium channel. *J Gen Physiol*, (2012), 139(6):507-516.
- Lewis R.J., Duterte, S., Vetter, I., Christie, M.J.,** Conus venom peptide pharmacology, *Pharmacol Rev.*, (2012), 64, 259-98.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., MacKinnon, R.,** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K channel. *Science*, (2005), 309, 897-903.
- MacKerell, A.D. Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Jr., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fisher, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S.,** All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys. Chem. B* (1998), 102- 3586-3616.

- Mahdavi, S., Kuyucak, S.,** Mechanism of ion permeation in mammalian voltage-gated sodium channels. *Plos One* (2015), 10(8):e133000.
- Masetti, M., Cavali, A., Recanatani, M.,** Modeling the hERG potassium channel in a phospholipid bilayer: Molecular dynamics and drug docking studies. *J Comput Chem.* (2008),29, 795-808.
- Morris, G., M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. and Olson, A.J.,** Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Computational Chemistry*, (2009), 16:2785-91.
- Miller, C.,** The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides, *Neuron*, (1995), 15, 5-10.
- Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., Sabatier, J.M.,** Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Desin*, (2008), 14, 2503-2518.
- Norton, R.S.,** mu-conotoxins as leads in the development of new analgesics, *Molecules*, (2010), 15, 2825-2844.
- Nurani, G., Radford, M., Charalambous, K., O'Reilly, A.O., Cronin, N.B., Haque, S., Wallace, B.A.,** Tetrameric bacterial sodium channels: Characterization of structure, stability, and drug binding, *Biochemistry*, 2008, 47 (31) : 8114-21.
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A.E., and Van Gunsteren, W.F.,** A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6, *J Computational Chem.* (2004), 25, 1656-1676.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. And Catterall, W.A.,** The crystal structure of a voltage-gated sodium channel, *Nature*, (2011), 475:353-359.
- Pearlman, D.A., Case, D.A., Caldwell, J.W., Ross, W.S., Cheatham, T.E., DeBolt, S., Ferguson, D., Sebel, G., Kollman, P.A.,** AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics, and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* (1995), 91, 1-41.
- Pennington, M.W., Rashid, M.H., Tajhya, R.B., Beeton, C., Kuyucak, S., Norton, R.S.,** A C-terminally amidated analogue of ShK is a potent and selective blocker of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *FEBS Lett.* (2012), 586, 3996-4001.
- Phillips, J., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R., Kale, L., Schulten, K.,** Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.*, (2005), 26, 1781-1802.
- Qiu, S., Yi, H., Liu, H., Cao, Z., Wu, Y., Li, W.,** Molecular information of charybdotoxin blockade in the large conductance calcium-activated potassium channel. *J. Chem. Inf. Model.* (2009), 49, 1831-1838.
- Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, T., Catterall, W.A.,** Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, *Proc. Natl Acad Sci., USA*, (1996) , 93(17):9270-9275.
- Rashid, M.H., Kuyucak, S.,** Affinity and selectivity of ShK toxin for the Kv1 potassium channels from free energy simulations. *J.Phys. Chem. B.* (2012), 116,4812-4822.



- Rashid, M.H., Kuyucak S.**, Free energy simulations of HsTx1 toxin binding to Kv1 potassium channel complexes: the basis of Kv1.3 selectivity. *J. Phys. Chem. B* (2014), 23, 707-19.
- Remme, C.A., Wilde A.A.:**, Targeting sodium channels in cardiac arrhythmia. *Curr Opin Pharmacol.* (2014), 15, 53-60.
- Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi Q., Clapham, D.E.**, A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science*, (2001), 294(5550):2372-2375.
- Rodriguez de La Vega, R.C., Possani, L.D.**, Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 2004,43, 865-875.
- Sali, A., Blundell, T.L.**, Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 1993, 234, 779-815.
- Shen, H., Qiang, Z., Pan, X., Li, Z., Wu, J., Yan, N.**, Structure of eukaryotic voltage-gated sodium channel at near atomic resolution, *Science* 2017, 355, 924.
- Steinbrecher, T., Labahn, A.**, Toward accurate free energy calculations in ligand protein binding studies. *Curr. Med. Chem.* (2010), 17, 767-785.
- Steinlein, O.K.**, Mechanisms underlying epilepsies associated with sodium channel mutations. *Prog Brain Res.* (2014), 213, 97-111.
- Terlau, H., Olivera, B. M., Conus Venoms:** A rich source of novel channel targeted peptides, *Physiol. Rev.* (2004), 84, 41-68.
- Twede, V.D., Miljanich, G., Olivera, B.M., Bulaj, G.**, Neuroprotective and cardioprotective conopeptides : an emerging class of drug leads. *Curr Opin Drug Discov Devel.* (2009), 12, 231-239.
- Torrie, G.M., Valleau, J.P.**, Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: umbrella sampling, *J Comp. Phys.* (1977), 23, 187-199.
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P, Vorobyov, I., Mackerell, Jr., A.D.**, CHARMM general force field: a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force field, *J. Comput. Chem.*, (2010), 31, 671-690.
- Wang, G.K., Quan, C., Wang S.Y.**, Local anesthetic block of batrachotoxin resistant muscle Na<sup>+</sup> channels. *Mol Pharmacol*, (1998), 54(2):389-396.
- Waxman S.G., Merkies, I.S., Gerrits, M.M., Dib-Hajj, S.D., Lauria, G., Cox, J.J., Wood, J.N., Wood, C.G., Drenth, J.P., Faber, C.G.**, Sodium channel genes in pain related disorders: phenotype-genotype associations and recommendations for clinical use. *Lancet Neurol.* (2014), 13, 1152-60.
- Wul, H., Castle, N.A., Pardo, L.A.**, Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2009), 8, 882-1001.
- Yarov-Yarovoy, V., Brown, J, Sharp, E.M., Clare, J.J., Scheuer, T., Catterall, W.A.**, Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment III S6 of the Na<sup>+</sup> channel alpha subunit. *J Biol Chem*, 2001, 276 (1):20-27.
- Yi, H., Qiu, S., Cao, Z.J., Wu, Y.L., Li. W.X.**, Molecular basis of inhibitory peptide maurotoxin recognizing Kv1.2 channel explored by ZDOCK and molecular dynamic simulations. *Proteins*, (2008), 70, 844-854.

- Yi, H., Qiu, S., Wu, Y., Li, W., Wang, B.,** Differential molecular information of maurotoxin peptide recognizing IKCa and Kv1.2 channels explored by computational simulation. *BMC Struct. Biol.*, (2011), 11, 3.
- Yu., F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., William A.,** A Catterall Overview of Molecular Relationships in the Voltage- Gated Ion Superfamily *Pharmacological Reviews*, (2005), 57(4)387-395
- Zarrabi, M., Naderi-Manesh, H.,** The investigation of interactions of k-Hefutoxin 1 with the voltage-gated potassium channels: a computational simulation. *Proteins*, (2007), 71, 144-1449.
- Zhang, Y.,** I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*,9:40 (2008).
- Zuliani, V., Fantini, M., Rivara, M.,** Sodium channel blockers as therapeutic target for treating epilepsy: recent updates. *Curr Top Med Chem*, (2012), 12, 962-70.
- Zuliani, V., Rapalli, A., Patel, M.K., Rivara, M.,** Sodium channel blockers: a patent review (2010-2014). *Expert Opin Ther Pat.*, (2015), 25, 279-90.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** :Esra Körpe  
**Uyruğu** :T.C.  
**Doğum Tarihi ve Yeri** :1992, Delice  
**E-posta** :esrkrpe@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yüksek Lisans** :2017, TOBB ETÜ, Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

**YABANCI DİL:** İngilizce

### TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Murat Cavus, **Esra Körpe**, Ali Osman Acar, Serdar Kuyucak, Turgut Bastug “Characterizations of Ion Permeability in NavMs Channel”,Book of Abstract, 1st International Underground Resources And Energy Conference,6-8 Oct.2016.
- Ali Osman Acar, **Esra Körpe**, Murat Cavuş, Serdar Kuyucak, Turgut Baştuğ, “Homology model of mammalian Nav1.4”, 4th International Bahcesehir University (BAU) Drug Design Congress, 13-15 Oct. 2016 Besiktas, İstanbul.
- **Esra Korpe**, Ali Osman Acar, Murat Cavus, Serdar Kuyucak, Turgut Bastug, “Mechanism and Energetics of ion and Tetrodotoxin binding to NavMs Channel” Biophyscial Society 61th Annual Meeting, 11-15 February 2017, New Orleans,Louisiana.
- Ali Osman Acar, **Esra Korpe**, Murat Cavus, Serdar Kuyucak, Turgut Bastug, “Homology model of mammalian Nav1.4” Biophyscial Society 61th Annual Meeting, 11-15 February 2017, New Orleans,Louisiana.
- Turgut Bastug, **Esra Körpe**, Murat Cavus, Serdar Kuyucak, Ali Osman Acar,“Molecular Modelling of Sodium Channels” ,Electronic Structure: Therotical and experimental approaches 8th of April 2017, Cavid Erginsoy Seminar Room Department of Physics, METU, Ankara.

- Ali Osman Acar , **Esra Körpe**,Murat Cavus, Serdar Kuyucak, “Calculation of Affinity by Molecular Dynamic Simulation Methods” 11th National Affinity Techniques Congress, Adnan Menderes University, 15-17 June 2017,Kusadası, Aydın.

## **DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER**

- **Esra Korpe** , Yasemin Keskek , Vildan Adar Gursoy “ The Researching of interaction between mu-opioid receptor and thymoquinone which is in nigella sativa seed” , 2nd National Calculated Chemistry Congress,Kafkas University, 2-5 June 2015, Kars,Turkey.

