

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRAMİNİDAZ - OSELTAMİVİR ETKİLEŞİMİNİN HOMOLOJİ
MODELLEMESİ, MOLEKÜLER KENETLEME VE MOLEKÜLER DİNAMİK
TEKNİKLERİ İLE ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gizem GÖKÇE

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ersin Emre ÖREN

HAZİRAN 2019

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 161711029 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Gizem GÖKÇE**'nin ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**NÖRAMİNİDAZ - OSELTAMİVİR ETKİLEŞİMİNİN HOMOLOJİ MODELLEMESİ, MOLEKÜLER KENETLEME VE MOLEKÜLER DİNAMİK TEKNİKLERİ İLE ANALİZİ**" başlıklı tezi **26 Haziran 2019** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Ersin Emre ÖREN**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ (Başkan)**
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

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

Gizem Gökçe

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NÖRAMİNİDAZ - OSELTAMİVİR ETKİLEŞİMİNİN HOMOLOJİ MODELLEMESİ, MOLEKÜLER KENETLEME VE MOLEKÜLER DİNAMİK TEKNİKLERİ İLE ANALİZİ

Gizem Gökçe

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ersin Emre Ören

Tarih: Haziran 2019

Yeni bir ilaç molekülünün tasarlanması, sentezlenmesi ve onaylanıp piyasaya sürülmesi yıllar süren ve milyarlarca dolarlık maliyet gerektiren bir süreçtir. Bu sürecin hızlandırılması ve maliyetin azaltılması için bilgisayar destekli ilaç tasarımı çalışmaları kullanılmaya başlanmıştır. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı, ligand ile protein arasındaki bağlanma kinetiği ve ligandın bağlanma bölgesi bilgilerine dayanarak potansiyel ilaç moleküllerini belirlemek için kullanılır.

Bu tez kapsamında örnek olay incelemesi olarak influenza A virüsü seçilmiş ve bu virüs üzerinde bir yüzey proteini olan Nöraminidaz (NA) proteini kullanılmıştır. Mevsimsel H1N1 influenza A virüsü, insan sağlığını olumsuz yönde en çok etkileyen virüslerden bir tanesidir ve her yıl ciddi oranda hastalık ve ölüme neden olmaktadır. Günümüz dünyasındaki jenerik antiviral ilaçlar (oseltamivir (OTV), zanamivir (ZMR), peramivir (PRV) ve laninamivir (LNR)), Nöraminidaz enziminin aktivitesini engellemek üzere tasarlanmıştır. Ancak, virüslerde meydana gelen mutasyonlar, virüslerin ilaçlara karşı direnç kazanmalarına ve bu nedenle antiviral ilaçların

etkilerini yitirmelerine neden olabilmektedir. Bu nedenle, ilaçların hedef aldığı yapılardaki direnç mekanizmalarının anlaşılması, günümüzde kullanılan ilaçların verimliliğini belirleyebilmek ve yeni ilaç tasarımları yapabilmek için büyük önem taşımaktadır.

Bu amaç doğrultusunda, çalışmada öncelikle, ilaç direnci gösterdiği bilinen mutant NA proteinlerinin, kristal yapısı mevcutsa PDB (Protein Data Bank)'den, kristal yapısı mevcut değilse de homoloji modellemesi ile moleküler yapıları elde edilmiştir. Daha sonra, protein-ligand etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla bu yapılar kullanılarak NA ve ilaç molekülü için moleküler yerleştirme (docking) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar ile, ilaç moleküllerinin NA proteini üzerindeki bağlanma bölgesi ve konformasyonları belirlenmiş ve mevcut deneysel kristal yapılarla karşılaştırmaları yapılmıştır. Son olarak, şemsiye örnekleme (umbrella sampling) yöntemi ile, ligand ile kompleks halinde kristal yapısı bilinen NA'lar kullanılarak ligandın proteinden minimum enerjiye sahip yollar üzerinden uzaklaştırılması sırasındaki kuvvetler hesaplanmış, deneysel ve diğer hesaplamalı yöntemlerle karşılaştırmalar yapılmıştır. Böylelikle, bilgisayar destekli çalışmalar kullanılarak bir protein-ligand sistemi için gerçek hayata en yakın ve doğru sonuçları veren yöntem ve simülasyon parametreleri belirlenmiştir.

Bu çalışmaların, ilaçların etki mekanizmalarının anlaşılmasında ne tür bilgisayar destekli yöntemlerin kullanılması gerektiği konusunda yol göstererek, olası mutasyonlar sonucunda karşılaşılan yeni tip virüslere var olan ilaçların etkilerinin belirlenmesinde ve/veya yeni ilaçların geliştirilmesinde yardımcı olması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: H1N1 influenza virüsü, İlaç direnci, Homoloji modellemesi, Moleküler kenetleme, Moleküler dinamik simülasyonları, Şemsiye örnekleme

ABSTRACT

Master of Science

ANALYSIS OF NEURAMINIDASE - OSELTAMIVIR INTERACTIONS VIA HOMOLOGY MODELING, DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS TECHNIQUES

Gizem Gokce

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Programme

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ersin Emre Oren

Date: June 2019

Designing, synthesizing and approving a new drug molecule and driving it to the market is a process that takes years and costs billions of dollars. Computer aided drug design studies have begun to be used to accelerate this process and reduce costs. Computer aided drug design is mainly used to identify potential drug molecules based on the binding kinetics between ligand and protein, and the binding site of the target protein. In this study, Neuraminidase (NA), which is a surface protein on influenza A virus, was selected as a case study. The seasonal H1N1 influenza virus is one of the viruses that affects human health in a negative way, causing serious morbidity and mortality rates every year. In today's world, generic antiviral drugs are designed to inhibit the activity of NA, such as oseltamivir (OTV), zanamivir (ZMR), peramivir (PRV) and laninamivir (LNR). However, mutations that occur in viruses can cause them to gain resistance to drugs and thus antiviral drugs may lose their effects. For this reason, understanding of the protein-ligand binding kinetics is of great importance for determining the efficacy of drugs and further designing new drugs.

The structures of various NA proteins have been obtained either directly from the Protein Data Bank (PDB) if the structure has experimentally solved or predicted with homology modeling if no structure available. Then, docking studies for NA and drug molecule, which is OTV, were performed to observe protein-ligand interactions. With docking, conformations of OTV with different energy levels that bind to various regions on NA were determined and compared to the crystal structures if exists. On the other hand, since docking studies alone may not be sufficient in protein-ligand interaction tests, we also carried out molecular dynamics simulations to navigate the optimal direction for oseltamivir to find a proper way out of the NA binding pocket without any or with minimum steric hindrance and then pull this small molecule from NA via umbrella sampling pulling simulations. The rationale behind umbrella sampling is that the more force OTV needs to be pulled, the more tightly it binds to NA.

As a result, we developed methods that will enable us to understand/predict the efficacy of drug molecules using computer aided studies. This study may give us a chance for understanding the severity of viral epidemics and will be a guide for discovering new drugs that may be urgently needed for upcoming life-threatening viral infections.

Keywords: H1N1 influenza virus, Drug resistance, Homology modeling, Molecular docking, Molecular dynamics simulations, Umbrella sampling.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Dr. Öğretim Üyesi Ersin Emre Ören'e, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine, TRUBA kaynaklarının kullanımında kıymetli yardımları ile bana yol gösteren Prof. Dr. Turgut Baştuğ'a, tüm hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bana güç ve mutluluk veren canım anneme ve canım babama, 10 yılı aşkın süredir sevgisi, desteği, anlayışı ve bilimsel bakış açısı ile yanımda olan hayat arkadaşım Ahmet Mesut Alpkılıç'a ve Biyonanotasarım Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu araştırmada yer alan kısmi nümerik hesaplamaların gerçekleştirildiği TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'ne (TRUBA kaynaklarına) ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak, yüksek lisans eğitimim boyunca sağladıkları burs imkanları için TOBB ETÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ BİLDİRİMİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xiv
SEMBOL LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı.....	2
1.2 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı.....	3
1.3 İnfluenza A Virüsü.....	4
1.3.1 İnfluenza A virüsünün yaşam döngüsü.....	5
1.3.2 Nöraminidaz proteini.....	6
1.3.2.1 NA inhibisyon mekanizması ve aktif bölge yapısı.....	9
1.3.2.2 Aktif inhibitörler.....	11
1.4 Literatür Özeti.....	12
2. TEORİK MODEL VE YÖNTEM	15
2.1 Sistemin Genel Tanımı.....	15
2.1.1 Protein – ligand bağlanma kinetiği ve termodinamik ilişkiler.....	15
2.1.2 NA referans ve mutant yapıları.....	18
2.2 Homoloji Modellemesi.....	20
2.3 Moleküler Kenetleme.....	22
2.3.1 Arama algoritması ve skora fonksiyonu.....	22
2.3.2 Kullanılan moleküler kenetleme yazılımları.....	22
2.3.3 Deneysel akış ve parametreler.....	25
2.3.4 Moleküler kenetlemenin limitasyonları.....	27
2.4 Moleküler Dinamik.....	27
2.4.1 Teori.....	29
2.4.2 Kuvvet alanları.....	30
2.4.3 Şemsiye örnekleme (umbrella sampling) yöntemi.....	31
2.4.4 Simülasyon sisteminin kurulması, akışı ve MD parametreleri.....	32
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR	37
3.1 Moleküler Kenetleme ile NA-OTV Etkileşimlerinin Analizi.....	37
3.2 Oseltamivir Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları.....	44
3.2.1 Moleküler kenetleme ile bağlanma enerjilerinin hesaplanması.....	46
3.2.2 Moleküler dinamik ile bağlanma enerjilerinin hesaplanması.....	51
3.2.2.1 Oseltamivir yük etkisi.....	51

3.2.2.2	Farklı kuvvet alanları etkisi.....	54
3.2.2.3	Moleküler pozisyon kısıtlaması etkisi.....	57
3.3	NA Proteininin Detaylı Yapısal Analizi.....	59
3.3.1	Aktif bölge kavitesinin MD simülasyonları ile analizi	59
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
	KAYNAKLAR.....	65
	ÖZ GEÇMİŞ.....	75



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: İlaç tasarımı, aşamaları ve maliyeti (Url-2).....	2
Şekil 1.2: İnfluenza virüsü ve yüzey proteinleri (Url-3).....	5
Şekil 1.3: İnfluenza virüsü yaşam döngüsü.....	6
Şekil 1.4: (a) N1 Nöraminidaz tetramerinin 3 boyutlu yapısı (PDB kodu: 2hu4) ve (b) viral zarfa bağlanmasını sağlayan kök bölgesi ile birlikte gösterimi (Amaro vd., 2016).....	7
Şekil 1.5: Nöraminidaz polipeptidinin bazı spesifik özelliklerini gösteren diyagram (Garman vd., 2005).....	8
Şekil 1.6: İnfluenza NA kristalleri; (a) N2, (b) N6, (c) N8, (d) N9, (e) N1, (f) N3, (g) N5 ve (h) N9. Kristal boyutları en büyük (N9) 0,6 mm ile 0,15 mm (N6) arasında değişmektedir (Garman vd., 2005).	8
Şekil 1.7: NA aktif bölgesindeki kaviteler.....	9
Şekil 1.8: (a) Açık ve (b) kapalı konformasyondaki 150-kavite yapıları.....	10
Şekil 1.9: Virüsün enfekte ettiği konak hücre üzerinde NA'nın aktif bölgesine bağlanan sialik asit yapısı (Schauer vd., 2001).	11
Şekil 1.10: NA aktivitesini bloke etmek için kullanılan ilaç molekülleri ve tıbbi ürünlerinin piyasadaki isimleri.	12
Şekil 2.1: S2, S1, R1 ve R2 NA sekanslarının bir kısmının hizalanmış gösterimi. ...	19
Şekil 2.2: S2, S1, R1 ve R2'nin bağlanma affinitesi ve antiviral dirençlerinin sıralama olarak gösterimi.	20
Şekil 2.3: Homoloji modellemesinin aşamaları (Url-5).....	21
Şekil 2.4: 2001-2011 yılları arasında en çok alıntı yapılan 7 adet moleküler kenetleme programının ortalama yıllık atıf sayılarının yüzdeler dilim olarak gösterimi. .	23
Şekil 2.5: AutoDock 4.2.6'nın stokastik arama algoritması (a) ve AutoDock Vina'nın gradyan tabanlı arama algoritmasının (b) şematik gösterimi.	24
Şekil 2.6: AutoDock 4.2.6 kullanılarak yapılan moleküler kenetleme için hazırlanmış OTV molekülü (a) ve Hydrated AutoDock 4.2.6 kullanılarak yapılan moleküler kenetleme için hazırlanmış OTV molekülü (b).	24
Şekil 2.7: Moleküler kenetleme deneyleri için gerçekleştirilen iş akış şeması.....	25
Şekil 2.8: Moleküler kenetleme sırasında kullanılan alan kutusunun gösterimi.....	26
Şekil 2.9: Kenetleme alanı içerisinde Nöraminidaz yüzeyini tarayan oseltamivirden birkaçı.	26
Şekil 2.10: Toplam potansiyel enerji fonksiyonunu tanımlayan bağlı ve bağlı olmayan etkileşimler.	29
Şekil 2.11: Reaksiyon koordinatı boyunca örnekleme gösterimi (Url-7).	32
Şekil 2.12: Şemsiye örnekleme simülasyonlarında kullanılan örnekleme aralıklarının gösterimi (Açık pembe daire: NA, koyu pembe daire: OTV).	33
Şekil 2.13: Periyodik kutunun tanımlanması, çözelti ve iyonların eklenmesi.	34

Şekil 2.14: OTV'nin z ekseninde 1 ns çekme simülasyonu sonucundaki yapılarının bir kısmı.....	34
Şekil 2.15: Örnek PMF eğrisi.....	35
Şekil 3.1: OTV'nin S1, R1 ve R2 yapılarına bağlanma konformasyonları.....	38
Şekil 3.2: Kristal S1-OTV (a) kristal R1-OTV (b) ve kristal R2-OTV etkileşimleri (c) ve sırasıyla üç boyutlu gösterimleri (d) (e) (f).	39
Şekil 3.3: Kristal S1-OTV (a) (b) (c) etkileşimleri ile sırasıyla ADT Vina (d), ADT (e) ve Hydrated ADT (f) ile bulunan S1-OTV etkileşimlerinin karşılaştırılması. .	41
Şekil 3.4: Kristal R1-OTV (a) (b) (c) etkileşimleri ile sırasıyla ADT Vina (d), ADT (e) ve Hydrated ADT (f) ile bulunan R1-OTV etkileşimlerinin karşılaştırılması. .	42
Şekil 3.5: Kristal R2-OTV (a) (b) (c) etkileşimleri ile sırasıyla ADT Vina (d), ADT (e) ve Hydrated ADT (f) ile bulunan R2-OTV etkileşimlerinin karşılaştırılması. .	43
Şekil 3.6: ΔG ve Kb arasındaki logaritmik ilişki.....	45
Şekil 3.7: S1, R1 ve R2'nin kristal yapılarına kenetlenen oseltamivirin bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması.	47
Şekil 3.8: S2, S1, R2 ve R1'in I-TASSER homoloji modellemesi ile elde edilen yapılarına kenetlenen oseltamivirin bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması. .	48
Şekil 3.9: Kristal S1-OTV (a) etkileşimlerinin kenetleme sonucu elde edilen S1-OTV etkileşimleri (b) ile ve kristal R2-OTV (c) etkileşimlerinin kenetleme sonucu elde edilen R2-OTV etkileşimleri ile karşılaştırılması.	49
Şekil 3.10: S2, S1, R2 ve R1'in Pymol Mutagenesis ile elde edilen yapılarına kenetlenen oseltamivirin bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması.	50
Şekil 3.11: OTV molekülünün birleşik-atom modeline göre gösterimi ve NH ₃ 'ün Lewis yapısı.	52
Şekil 3.12: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarındaki OTV'nin formal ve fizyolojik yükünün bağlanma enerjilerine etkisi ve değerlerin karşılaştırılması.....	54
Şekil 3.13: S1, R1 ve R2 holo yapıları için GROMOS96 43a1, AMBER99sb ve CHARMM36 kuvvet alanlarının OTV bağlanma enerjilerine etkisi ve değerlerin karşılaştırılması.	56
Şekil 3.14: S1, R1 ve R2 holo yapıları üzerindeki pozisyon kısıtlamasının kaldırılmasının OTV bağlanma enerjilerine etkisi ve değerlerin karşılaştırılması.	58
Şekil 3.15: S1-150 (a) ve S1 (b) yapılarının kavite konformasyonlarının şematik olarak gösterimi.	60
Şekil 3.16: OTV kaynaklı 150-kavite dönüşümünün deneysel olarak karşılaştırılması (Wu et al., 2013).	60
Şekil 3.17: 150-kavite dinamiğinin MD simülasyonları ile holo ve apo yapılar üzerinde araştırılmasının şematik gösterimi.	61

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Aktif bölgedeki kavileri oluşturan amino asitler.....	10
Çizelge 4.1: S2, S1, R1 ve R2'nin farklı yapılarına moleküler kenetleme ile bağlanmış OTV'nin farklı kenetleme yazılımları ile hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.....	46
Çizelge 4.2: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarındaki OTV'nin formal ve fizyolojik yüküne göre hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.....	53
Çizelge 4.3: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarındaki OTV'nin GROMOS96 43a1, AMBER99sb ve CHARMM36 kuvvet alanlarına göre hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.....	55
Çizelge 4.4: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarının pozisyon kısıtlamalı ve kısıtlamasız simüle edilmeleri sonucunda hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.....	58

KISALTMALAR

CADD	: Bilgisayar-Tabanlı İlaç Tasarımı (Computer-Aided Drug Design)
SBDD	: Yapı-Tabanlı İlaç Tasarımı (Structure-Based Drug Design)
LBDD	: Ligand-Tabanlı İlaç Tasarımı (Ligand-Based Drug Design)
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
H	: Hemaglutinin
N / NA	: Nöraminidaz
PDB	: Protein Veri Bankası (Protein Data Bank)
SA	: Sialik asit
FDA	: Food & Drug Administration
OTV	: Oseltamivir
ZMR	: Zanamivir
PRV	: Peramivir
LNR	: Laninamivir
MD	: Moleküler Dinamik
MM-PBSA	: Moleküler Mekanik Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (Molecular Mechanics / Poisson-Boltzmann Surface Area)
CASP	: Protein Yapı Tahmini için Tekniklerin Kritik Değerlendirmesi (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction)
MC	: Monte Carlo
GA	: Genetik Algoritma
LGA	: Lamarckian Genetik Algoritma
QM	: Kuantum Mekanik
WHAM	: Ağırlıklı Histogram Analiz Metodu (Weighted Histogram Analysis Method)
COM	: Kütle Merkezi (Center of Mass)
PMF	: Ortalama Kuvvet Potansiyeli (Potential of Mean Force)
ADT	: AutoDock
NPT	: Partikül sayısı, Basınç ve Sıcaklık (Number of particles, Pressure and Temperature)

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
P	Protein
L	Ligand
k_{on}	Bağlanma kinetik hız sabiti
k_{off}	Ayrılma kinetik hız sabiti
PL	Protein-ligand kompleksi
$[]$	Konsantrasyon
K_b	Bağlanma sabiti
K_d	Ayrılma sabiti
ΔG^o	Standart serbest bağlanma enerjisi
ΔG	Serbest bağlanma enerjisi
R	Evrensel gaz sabiti
T	Sıcaklık
Q	Reaksiyon oranı
ΔH	Entalpi değişimi
ΔS	Entropi değişimi
K_r	Yay sabiti
r	Atomlar arası mesafe
r_{eq}	Denge uzaklığı
K_θ	Açısal sabit
θ	Üç atom arasındaki açı
θ_{eq}	Denge açısı
V_n	Enerji bariyeri
n	Periyodiklik sabiti
ϕ	İki düzlem arasındaki açı
γ	Faz kayması
A_{ij} ve B_{ij}	Potansiyel sıfırken iki atom arası uzaklık
R_{ij}	İki atom arası uzaklık
εR_{ij}	Dielektrik fonksiyonu

q_i ve q_j

\vec{F}

U

\vec{a}

Atomik yükler

Kuvvet

Potansiyel

İvme

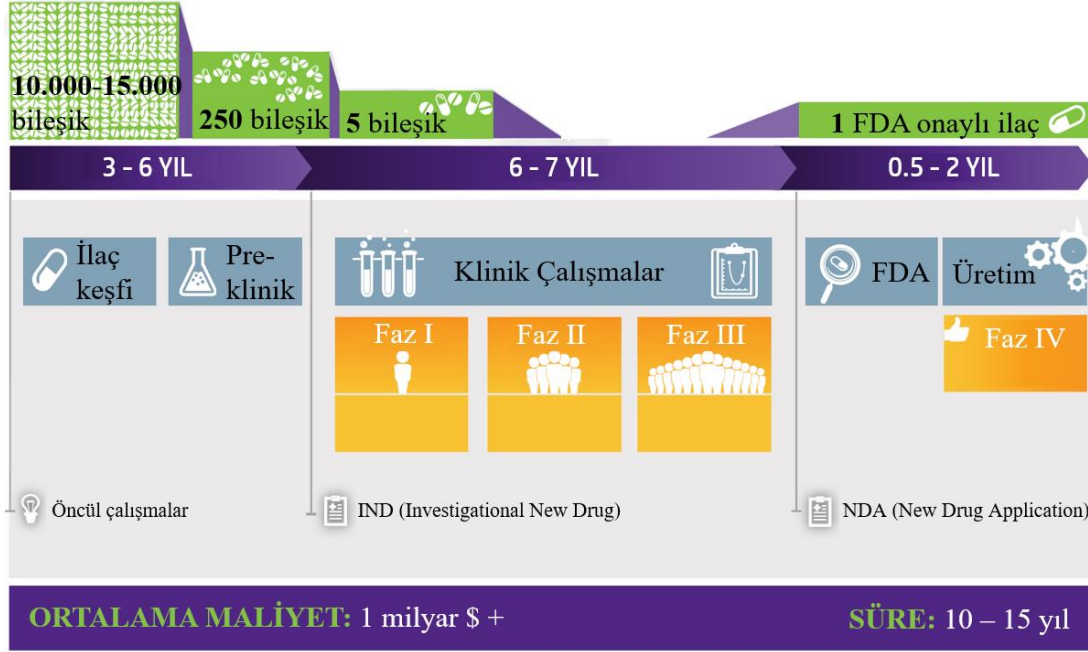


1. GİRİŞ

Virüsler, yalnızca konak olarak adlandırılan canlı bir hücrenin içerisinde yaşayıp çoğalabilen enfeksiyöz ajanlardır. İnfluenza “etkilemek” anlamına gelen İtalyanca bir kelimedir (Burgan, 2014). İnfluenza (grip) virüsü, her yıl dünya üzerindeki çeşitli bölgelerde ciddi salgınlara neden olmaktadır ve bu durum, insan sağlığını olumsuz yönde etkilemekte ve ölümlere sebebiyet vermektedir. Bunun en çarpıcı örneklerinden biri, 1918’de meydana gelen ve 50 milyondan fazla insanın ölümüne neden olan İspanyol gribidir (Taubenberger vd., 2006). O dönemlerde doktorlar, bu hastalığa tam olarak nasıl bir mikroorganizmanın neden olduğunu bilmiyorlardı. Bilim insanları, bu hastalığın sebebinin virüsler olduğunu keşfetmek için 15 yıl daha uğraşmışlardır. Günümüzde ise, dünya çapında her yıl 290.000-650.000 insan bu virüs sebebiyle hayatını kaybetmektedir (Url-1).

İnfluenza virüsünün A, B ve C olmak üzere 3 adet alt grubu bulunmaktadır. İnsanları enfekte ederek, tehlikeli boyutlardaki epidemi ve pandemilere sebebiyet veren alt tip İnfluenza A’dır. İnfluenza A virüsünün hızla geçirdiği yapısal değişimler, virüsün antiviral ilaçlara karşı direnç kazanmasına neden olmakta, piyasadaki jenerik ilaçlar yetersiz kalmakta ve ölüm oranları artmaktadır. Bu nedenle, virüslerin hızlı değişimine ayak uydurabilecek yeni ve etkili antiviral ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bir ilacın deneysel olarak üretimi ve onaylanıp piyasaya sürülmesi, çok aşamalı bir süreç olup, onlarca yıl ve milyar dolarlar gerektirmektedir (Şekil 1.1). Bu aşamada bilgisayar destekli ilaç tasarımı çalışmaları ile, doğru ilaçların keşfi hızlandırılmakta ve analizleri görece çok daha kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Büyük ligand kütüphanelerindeki binlerce olası aktif bileşik arasından deneysel çalışmalara geçilmeden önce hedefi inhibe etmeye en uygun bileşikler belirlenebilmektedir. Ek olarak, ilaçların hedef aldığı yapılardaki direnç mekanizmalarının bilgisayar destekli çalışmalar ile önceden anlaşılması, günümüzde kullanılan ilaçların verimliliğini belirleyebilmek ve yeni ilaç tasarımları yapabilmek için büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde hem deneysel çalışmalara analizler ile ışık tutulmakta, hem de zaman ve

maliyetten ciddi ölçüde kazanılmaktadır. Bu nedenle bilgisayar destekli ilaç tasarımı çalışmaları sahip olduğu avantajlardan dolayı günümüzde önemli, güçlü ve popüler bir alan haline gelmiştir.



Şekil 1.1: İlaç tasarımı, aşamaları ve maliyeti (Url-2).

1.1 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, virüslerdeki protein yapılarının ilaçlar ile etkileşimlerinin analiz edilerek, ilaçların etkinliklerini belirleyecek bir teknik geliştirmektir. Bu teknik ile, varolan ilaçların verimlilikleri anlaşılacak ve yeni ilaç tasarımları için bir yol belirlenecektir.

Bu çalışmada, bilgisayar destekli çalışmalar kullanılarak İnfluenza A virüsü Nöraminidaz proteininin farklı mutasyonlara sahip versiyonlarının piyasadaki antiviral bir ilaç olan oseltamivir ile etkileşimleri incelenerek, günümüz ilaçlarının virüsü bloke edebilme yeteneklerinin belirlenmesi ve böylece etkinliği daha yüksek yeni ilaçların tasarımı için gereken öncül metodun oluşturulması amaçlanmıştır. Bu metot, değişimi önceden tahmin edilmiş virüslerin ilaçlara verdiği tepkilerin doğru bir şekilde tespit edilmesini, gelecek mutant yapılara karşı önlem alınmasını ve ilaç direncinin tehlike seviyesinin anlaşılmasını sağlayacaktır.

1.2 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD), makromolekül-ligand arasındaki etkileşimleri simüle etmek için matematiksel modellere dayanan özel bir disiplindir. CADD teknikleri, yeni aktif bileşiklerin (keşif aşamasındaki ilaçlar) erken aşamadaki gelişimini yönlendirmek ve hızlandırmak amacıyla kimyasal kütüphanelerin hızlı ve doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. CADD, ligand ile protein arasındaki bağlanma kinetiği ve ligandın bağlanma bölgesi bilgilerine dayanarak potansiyel ilaç moleküllerini belirlemek için kullanılır. CADD yönteminde “Yapı bazlı ilaç tasarımı (SBDD)” ve “Ligand bazlı ilaç tasarımı (LBDD)” olmak üzere başlıca 2 yaklaşım türü vardır (Yu vd., 2018) (Chen vd., 2007).

LBDD yaklaşımında, bir ya da daha fazla ligandın bir makromoleküle bağlandığı bilinir, ancak bu makromolekülün 3 boyutlu kristalografik yapısı bilinmez. Bu nedenle yeni ilacın tasarımı, makromoleküle bağlandığı bilinen ligand moleküllerinin özellikleri baz alınarak gerçekleştirilir. Bu nedenle, LBDD yaklaşımına indirekt ilaç tasarımı da denilmektedir. Makromoleküle halihazırda bağlandığı bilinen ligandın boyutu, yükü, elektropozitivitesi/negativitesi, lipofilikliği, sp² hibrit oluşturma durumu, hidrojen bağı alıcısı ve vericisi olan bölgelerine göre makromolekülün aktif bölgesinin 3 boyutlu farmakofor modeli oluşturulur. Yani bir ligandın söz konusu makromoleküle bağlanması ve gerekli biyolojik cevabı oluşturması için gerekli özelliklere sahip olan atomik gruplar elde edilir. Elde edilen bu yapı üzerinden de ilacın tasarımı gerçekleştirilir.

SBDD yaklaşımında, LBDD'nin aksine makromolekülün (protein, RNA, DNA vb.) yapısı kristalografik olarak bilinir veya bu yapı NMR spektroskopisi ve X-ışını kristalografisi gibi yöntemlerle deneysel olarak elde edilmemişse, homoloji modellemesi yöntemi kullanılarak molekülün 3 boyutlu yapısı elde edilir. Potansiyel ligand moleküllerinin tasarımları veya var olan ligandların verimlilikleri, biyolojik hedefin yani makromolekülün 3 boyutlu yapısal bilgisi ve ligand ile olan etkileşimlerinin simülasyon teknikleri kullanılarak analiz edilmesi ile gerçekleştirilir. Yani, tasarım ve yöntemler makromolekülün yapısı baz alınarak oluşturulur.

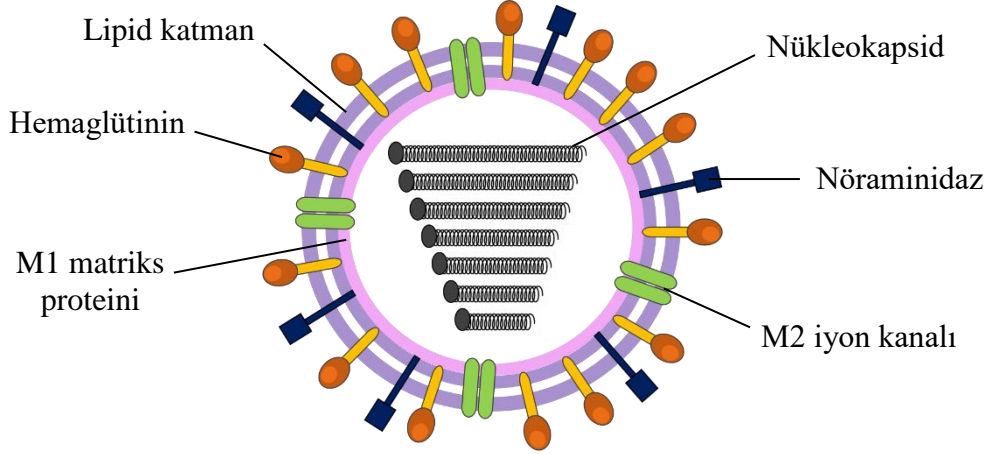
Bu tez kapsamında, makromolekülün yapısı bilinerek ligand verimliliği üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle kullanılan yaklaşım, SBDD yaklaşımıdır.

1.3 İnfluenza A Virüsü

İnfluenza virüsü, Orthomyxoviridae ailesine ait 80-120 nm çapında bir RNA virüsüdür. Bu virüs, İnfluenza A, İnfluenza B, İnfluenza C, Togotovirüs ve İsavirüs olmak üzere 5 adet alt türe sahiptir (Walker, 2009). Bu türlerden Togotovirüs ve İsavirüs'ün insanlar üzerinde enfekte edici özelliği yoktur. İnfluenza C alt türü, insanları enfekte edebilmesine rağmen herhangi bir semptomu neden olmamakta, veya belirtiler çok hafif kalmaktadır. Bu nedenle epidemiyeye yol açmazlar. Ancak, İnfluenza A ve B türleri (bilinen adı ile grip virüsleri) diğer alt türlerin aksine, insan sağlığında olumsuz etkiler yaratmakta ve özellikle A tipinin geçirdiği hızlı mutasyonlar tehlikeli boyutlarda epidemilere ve hatta pandemiye neden olabilmektedir. Mutasyonlar, birçok canlıda çeşitli sağlık sorunlarına ve hatta ölüme yol açarlar. Örneğin, insan DNA'sında meydana gelen tek bir bazın mutasyonu hatalı bir RNA'nın kodlanmasına, dolayısıyla da glutamik asit yerine valin amino asidinin sentezlenmesine sebep olarak orak hücreli anemi hastalığını oluşturur. Bazı mutasyonlarsa, kimi canlıların hayatta kalabilmeleri için daha iyi özellikler kazanmasına yardımcı olur.

İnfluenza virüsü, enfekte ettiği insan konakçıda özel bir antikor üretimine yol açar ve eğer aynı virüs, aynı ülkeye bir yıl sonra tekrar gelirse, yeni konakçılar bulması zorlaşacaktır. Bunun sebebi, virüsün önceden enfekte ettiği insanlardaki antikorların, virüsü tanıyarak öldürecek olmasındandır. İnfluenza virüsünün her yıl geçirdiği mutasyonlar sebebiyle virüs üzerindeki proteinlerin geçirdiği küçük değişimler ise, bu etkiyi yok etmekte, virüsün her yıl tekrar tekrar aynı insanı enfekte edebilmesine sebebiyet vermektedir. Genellikle, virüs kaynaklı hastalıkların çoğunda hastalığı atlatan insanlar hastalığa karşı ömür boyu doğal bir bağışıklık kazanmış olurlar. Ancak, influenza virüsünün yukarıda bahsedilen bu hızlı değişim özelliği karşısında, bu virüse karşı tamamen bağışıklık kazanabilmek, neredeyse imkansız hale gelmiştir (Burgan, 2014). Bu nedenle, günümüzde önlem alınması gereken hastalıklar arasında grip büyük bir öncelik kazanmıştır. Bu konudaki antiviral ilaç tasarımı çalışmaları ve bu çalışmalara verilen destekler de günden güne artmaktadır.

İnfluenza virüsünün üzerinde, virüsün yaşam döngüsünü devam ettirebilmesi için rol oynayan önemli proteinler vardır. Bunlar; M1 matriks proteini, M2 iyon kanalı, Hemagglütinin ve Nöraminidaz proteinleridir (Şekil 1.2) (Gubareva vd., 2000).



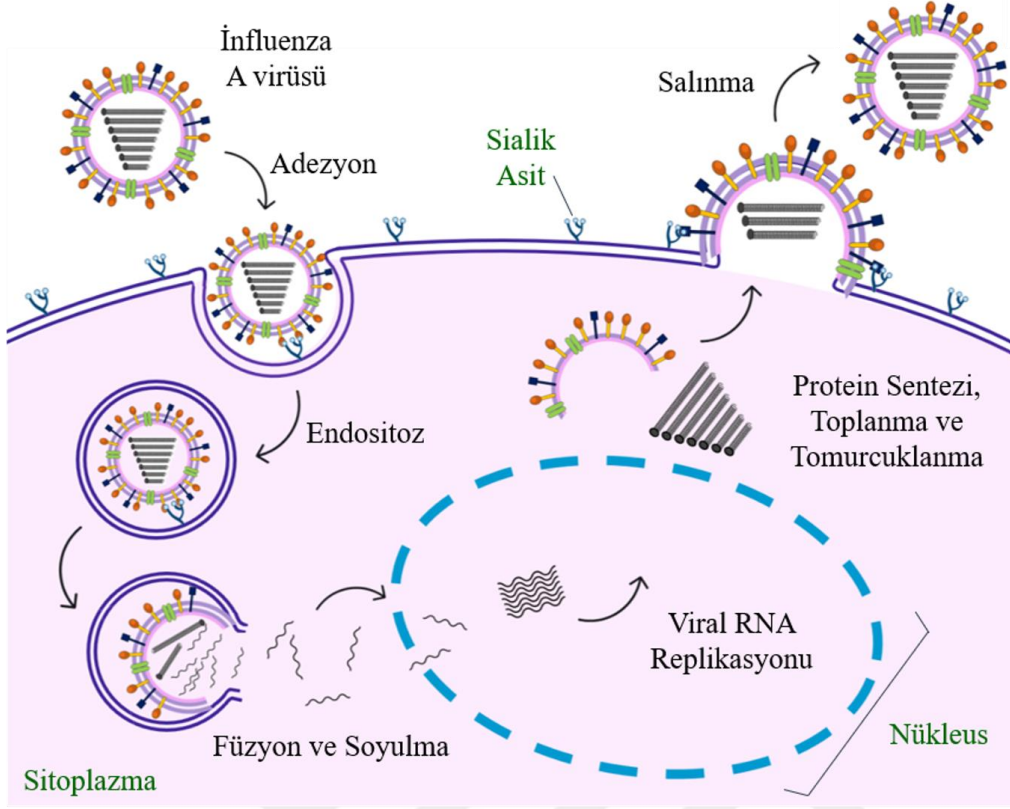
Şekil 1.2: İnfluenza virüsü ve yüzey proteinleri (Url-3).

Hemaglütinin ve Nöraminidaz, influenza virüsünün alt tiplerini ve virüs patojenitesini belirleyen antijenik glikoproteinlerdir. Hemaglütininin 18 (H1-H18), Nöraminidazın ise 11 (N1-N11) adet alt tipi vardır (Jagadesh vd., 2016). Örneğin, 2009 yılında pandemiye neden olan influenza alt tipi H1N1'dir. Son yıllarda ise bu alt tiplerden H3N2 ve yine H1N1 aktif olarak insanları enfekte etmekte ve etkilerini sürdürmektedirler.

1.3.1 İnfluenza A virüsünün yaşam döngüsü

Virüslerin yaşayabilmeleri ve çoğalabilmeleri için mutlaka canlı hücrelere ihtiyaçları vardır. İnfluenza A virüsü, insandaki somatik hücreleri enfekte ederek hızla çoğalma yeteneğine sahip bir virüstür. Bu virüs üzerindeki zarf proteinleri ve iyon kanalları, virüsün yaşam döngüsünü devam ettirebilmesinde büyük bir role sahiptir.

Bir influenza virüsünün yaşam döngüsü, virüsün Hemaglütinin proteinini kullanarak sağlıklı konak hücre üzerindeki sialik asitlere tutunup, reseptör vasıtalı endositoz yolu veya mikropinositoz yolu ile hücre içine girmesi ile başlar (Şekil 1.3). Bu sağlıklı konak hücreler, genellikle influenza virüsünün başlıca hedefi olan burun ve akciğerleri kapsayan solunum sistemindeki hücrelerdir. Virüs konak hücreye girdikten sonra, ortamdaki pH değişiminin etkisi ile virüsün bulunduğu endozom parçalanarak viral RNA segmentleri açığa çıkarılır. RNA segmentleri, nükleusu hedef alır ve hücre çekirdeğine girerek, mRNA sayesinde çok sayıda viral RNA kopyası oluşturulur. Hücre çekirdeğinde sentezlenen viral RNA segmentleri ve proteinler, hücre membranına doğru ilerleyerek tomurcuklanma için bir araya gelirler. Yeni virüsler, konak hücrenin membranını kullanarak tomurcuklanma ile hücre dışına çıkarlar.



Şekil 1.3: İnfluenza virüsü yaşam döngüsü.

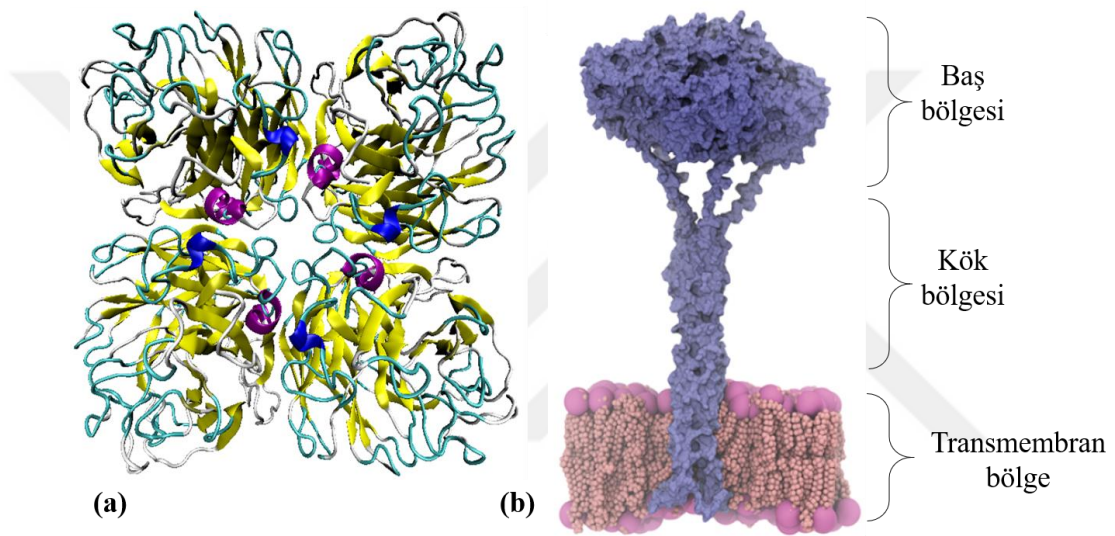
Ancak yeni virüsler, hücreye konak membranı üzerindeki sialik asitlerinden hala bağlı konumdadırlar. Virüs üzerindeki bir diğer membran glikoproteini olan Nöraminidaz, bu bağlantıyı sağlayan sialik asitleri keserek bir çeşit biyolojik makas görevi görür. Böylece, virüslerin tamamen serbest kalmasına, yeni konak hücreleri enfekte ederek çoğalmalarına ve yaşam döngülerini devam ettirmelerine yardımcı olur. Bu nedenle, Nöraminidazın virüsün yaşam döngüsündeki temel doğası, günümüz çalışmaları için onu ideal bir ilaç keşif hedefi yapmıştır.

1.3.2 Nöraminidaz proteini

NA proteininin keşfi 1940'lı yıllara, ilk insan influenza virüsünün izole edilmesinin yaklaşık 10 yıl sonrasına dayanır. New York Rockefeller Enstitüsü'nden George Hirst, influenza virüsü tarafından enfekte edilmiş tavuk embriyolarında yaptığı deneylerle, virüste konak hücre üzerindeki reseptörleri ortadan kaldıran bir enzim olduğunu keşfetmiştir. Bu nedenle Hirst, NA'yı "Reseptör tahrip edici enzim (receptor destroying enzyme)" olarak adlandırılmıştır. 1957 yılında Melbourne Walter ve Eliza Hall Enstitüsü'nden Alfred Gottschalk bu enzimin konak hücre üzerindeki sialik asidi kestiğini keşfederek, enzimin bugünkü bir diğer adı olan sialidaz adını almasına vesile

olmuştur. Daha sonraları da sialidazların doğada oldukça yaygın olduğu keşfedilmiştir. Diğer virüsler, bakteriler, memeli hücreleri ve bazı parazitlerin de kendi sialidaz enzimleri vardır (Garman vd., 2005).

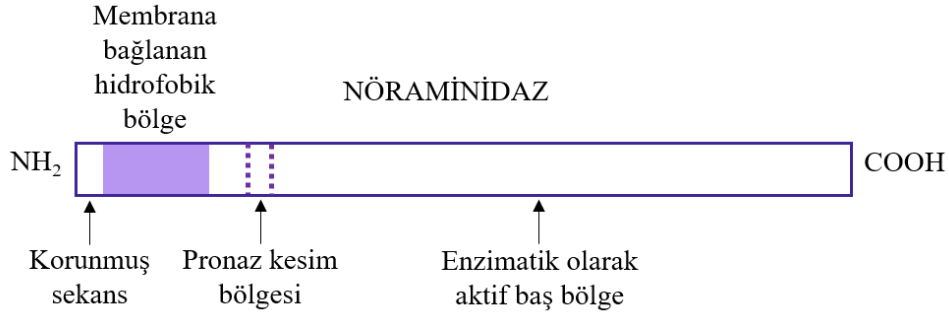
NA, viral zarfta homotetramerik formda bulunan tip II membran proteinidir. Her bir monomeri, 4 ana bölümden oluşur: 6 amino asit uzunluğunda bir sitoplazmik kuyruk, 7 ile 29 amino asit arasında değişen hidrofobik transmembran bölge, 19 ile 45 amino asit arasında değişen bir kök bölgesi (stalk region) ve karboksiterminal küresel kafa (baş bölgesi). Monomerler, kök bölgesinde disülfid köprüleri ile dimerlere bağlanır (Şekil 1.4). (Varios, 2008).



Şekil 1.4: (a) N1 Nöraminidaz tetramerinin 3 boyutlu yapısı (PDB kodu: 2hu4) ve (b) viral zarfa bağlanmasını sağlayan kök bölgesi ile birlikte gösterimi (Amaro vd., 2016).

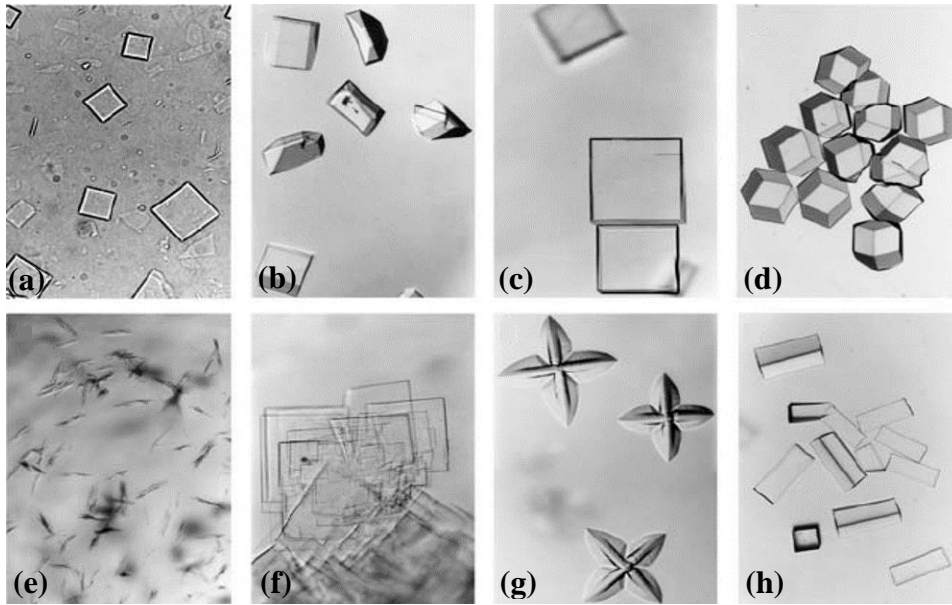
NA'nın baş bölgesi, bazı grip virüsü suşlarından pronaz ve tripsin gibi proteolitik enzimlerle muamele edilerek serbest bırakılabilir. Bu enzimler, NA'nın tüm enzimatik ve antijenik aktivitesini taşıyan bu baş bölgenin tek başına eldesini NA'yı yaklaşık olarak 75.-80. rezidüleri arasında keserek ve kök bölgesinden tamamen kurtulmasını sağlayarak gerçekleştirirler. NA'nın N-terminal'indeki sitoplazmik kuyruk bölgesi, en az 8 alt tipinde de korunmuş olarak birebir aynı sekanslar halinde bulunmaktadır. Hidrofobik transmembran bölge ise tüm alt tiplerde aynı değildir ancak bu bölgenin hidrofobikliği tüm yapılarda mutlaka korunur.

Şekil 1.5'te görülen pronaz kesim bölgesi, yukarıda bahsedilen proteolitik enzimlerin belirli bir rezidü aralığından NA'yı keserek enzimatik olarak aktif olan baş bölgenin açığa çıkarıldığı alanı göstermektedir.



Şekil 1.5: Nöraminidaz polipeptidinin bazı spesifik özelliklerini gösteren diyagram (Garman vd., 2005).

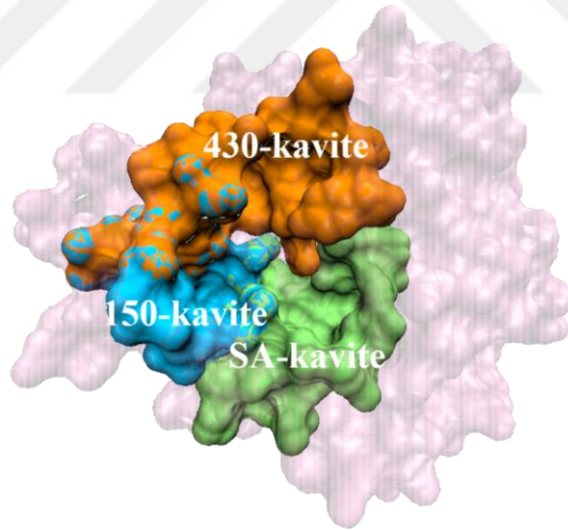
NA'nın 9 adet ana alt tipi bulunmaktadır (N1-N9) ve geçtiğimiz yıllarda da yarasalarda NA benzeri 2 protein yapısı keşfedilmiş ve NA alt tip kategorisine (N10 ve N11) girmiştir (Sun vd., 2014). Bu nedenle NA'nın aslen toplamda 11 adet alt tipi vardır. Önceki yıllarda bu proteinin bazı alt tipleri (N4 ve N7 gibi) X ışını kristalografisi için uygun olmadıklarından kristalleştirilememişlerdir ancak günümüz teknolojisi ile bu yapıların baş bölgelerinin tümü kristalleştirilebilmiş ve üç boyutlu yapılar halinde Protein Veri Bankası'nda (Protein Data Bank (PDB)) tüm dünyadan erişime açık halde bulunmaktadır. Kristalleştirilmiş NA yapılarından bazıları Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6: İnfluenza NA kristalleri; (a) N2, (b) N6, (c) N8, (d) N9, (e) N1, (f) N3, (g) N5 ve (h) N9. Kristal boyutları en büyük (N9) 0,6 mm ile 0,15 mm (N6) arasında değişmektedir (Garman vd., 2005).

1.3.2.1 NA inhibisyon mekanizması ve aktif bölge yapısı

NA'nın baş bölgesinin merkezinde, hem yapısal ve konumsal olarak, hem de sekans özelliği açısından yıllarca büyük oranda korunmuş derin bir cep yapısı bulunmaktadır. İnfluenza virüsünün yaşam döngüsündeki son basamak olan virüsün serbest kalışı, konak hücredeki sialik asidin bu katalitik cep yapısına bağlandıktan sonra NA'nın sialik asidi kesmesi ile gerçekleşir. Bu nedenle aktif bölge veya ilaç bağlanma bölgesi adını alan bu cep, hem virüsün konak hücreden salınmasında önemli bir yere sahip olduğundan hem de NA'nın diğer bölgelerine oranla evrimsel anlamda daha stabil olduğundan yapı tabanlı ilaç tasarımı için ideal bir hedef haline gelmiştir. İnfluenza A ve B alt tiplerinin NA sekansları %75'e kadar farklılık gösterebilir. Ancak aktif bölge tüm alt tiplerde aynı amino asit rezidülerini içerdiğinden tüm suşlar arasında tamamen korunmuş olarak bulunan tek bölgedir. Aktif bölge oluklu bir yapıya sahiptir ve 3 ana kısımdan oluşur: Sialik asit kavitesi (SA-kavite), 150-kavite ve 430-kavite. Bu kavitelerin üç boyutlu yapıları da Şekil 1.7'de NA üzerinde gösterilmiştir. 430-kavite turuncu, 150-kavite mavi ve SA-kavite yeşil renktedir.



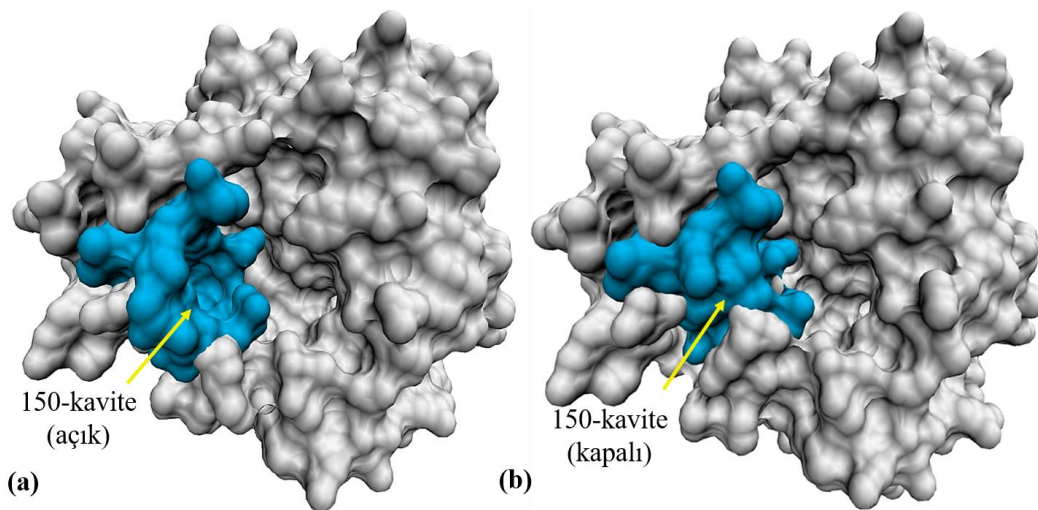
Şekil 1.7: NA aktif bölgesindeki kaviteler.

Bu kaviteyi oluşturan aminoasitler ise Çizelge 1.1'de verilmiştir. Bu tezde kullanılan NA yapısındaki (N1) aktif bölge 49 amino asitten meydana gelmektedir. Bu amino asitlerden çizelgede altı çizili olanlar, bunların konumsal olarak birden fazla kavitenin içerisinde yer aldığını, yıldızlı olanlar ise bu amino asit rezidülerinin sadece 150-kavitenin kapalı konformasyonda olduğu durumlarda 150-kaviteye ait olduğunu belirtmektedir.

Çizelge 1.1: Aktif bölgedeki kaviteyi oluşturan amino asitler.

<i>Aktif bölge kavite rezidüleri</i>	
<i>SA – kavite</i>	<u>R118</u> , E119, <u>L134</u> , V149*, K150*, <u>D151</u> , R152, S153, P154, <u>R156</u> , W178, S179, S195, G196, I222, R224, T225, E227, S246, E276, E277, R292, N294, <u>Y347</u> , <u>R371</u> , <u>Y406</u>
<i>150 – kavite</i>	V116, I117, <u>R118</u> , <u>L134</u> , T135, Q136, S145, G147, T148, V149*, K150*, <u>D151</u> , <u>R156</u> , <u>R430</u> , <u>P431</u> , <u>I437</u> , <u>W438</u> , <u>T439</u>
<i>430 – kavite</i>	N325, P326, <u>Y347</u> , N369, S370, <u>R371</u> , W403, S404, <u>Y406</u> , I427, R428, G429, <u>R430</u> , <u>P431</u> , K432, E433, <u>I437</u> , <u>W438</u> , <u>T439</u>

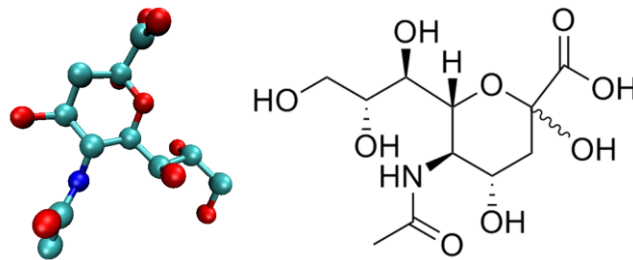
NA'nın farklı alt tiplerinde bu kaviteyi konformasyonel olarak açıklıkları yani oluklanma dereceleri farklıdır. Örneğin, Şekil 1.8'de gösterildiği gibi, kristal yapısı mevcut bir N1 yapısında (PDB kodu: 2hu0) 150-kavite açık konformasyonda yani oluklu yapıda iken, tamamen aynı sekansa sahip bir diğer kristalleştirilmiş yapıda (PDB kodu: 2hu4) kapalı konformasyonda yani oluksuz yapıda bulunur. Kavite yapısının aktif bölgeye bağlanan bir ilacın bağlanma yatkınlığında (affinitesinde) etkili olduğu literatürdeki bir çok çalışmada gözlemlenmiştir. Özellikle 18 rezidüye sahip 150-kavitesi bu anlamda önem taşımaktadır. Tezin ilerleyen kısımlarında kaviteyi açık ve kapalı konformasyonel yapılarının ilaç bağlanması ile ilişkisinden bahsedilecektir. Aktif bölgedeki bu üç kavite de ilaçların bağlanarak NA aktivitesini bloke edebileceği oluklardır. Ancak tüm NA alt tipleri için, konak hücre üzerindeki sialik asidin en çok sialik asit kavitesine bağlandığı deneysel ve simülasyon çalışmaları ile tespit edildiğinden, bu oluğa özellikle sialik asit kavitesi adı verilmiştir.



Şekil 1.8: (a) Açık ve (b) kapalı konformasyondaki 150-kavite yapıları.

1.3.2.2 Aktif inhibitörler

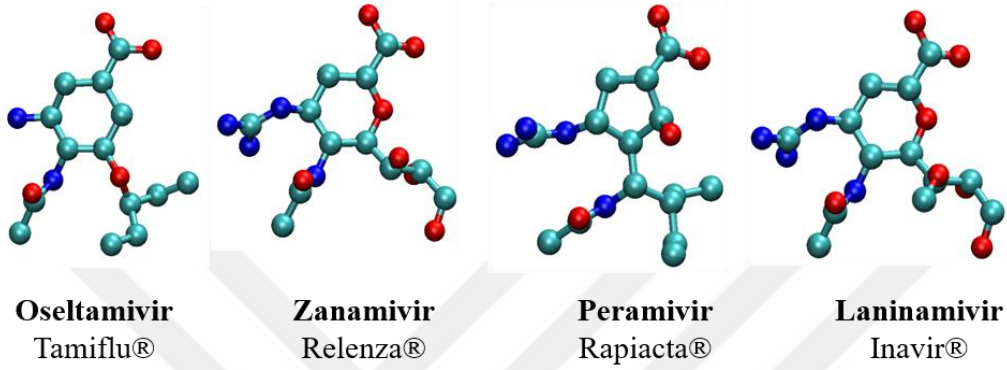
Aşı influenzadan korunmak için birincil strateji olsa da aşılamanın antiviral ajanlar kadar etkili olmadığı ve bir çok noktada yetersiz kaldığı bilinmektedir. Bu nedenle hastalığın etkili tedavisi için antiviral ajanlar geliştirilmiştir. İnfluenza virüs aktivitesini etkisiz hale getirmek için kullanılan iki adet ana antiviral sınıf vardır. Bunlar, M2 proton kanalı inhibitörleri ve NA inhibitörleridir. M2 proton kanalı inhibitörleri (adamantanlar - amantadin ve rimantadin), bu kanalı bloke ederek, viral RNA'nın konak hücre çekirdeğine salınımını engellerler. NA inhibitörleri ise, yukarıda anlatılan inhibisyon mekanizmasını kullanarak, NA'nın aktif bölgesine bağlanıp konak hücre içerisinde çoğalmış yeni virüslerin hücre dışına salınmasını önlerler. M2 proton kanalı inhibitörleri sadece influenza A tipi virüslere etki etmekte, insanlar üzerinde etkili olan B tipine karşı etkisiz kalmaktadır (Mckimm-breschkin, 2012). Nöraminidaz inhibitörleri ise influenzanın tüm alt tiplerine karşı etkilidir. Ayrıca adamantanların aksine, Nöraminidaz inhibitörleri toksisite anlamında daha güvenlidir ve ilaca dirençli influenza virüs gelişimini teşvik etme olasılığı çok daha düşüktür. Bu nedenle günümüzdeki antiviral ilaç çalışmaları daha çok NA inhibitörleri üzerine yoğunlaşmıştır ve M2 proton kanalı inhibitörleri çalışmalarında görece daha az gelişme kaydedilmiştir (Balgi vd., 2013). NA inhibisyonu için antiviral ilaçlar tasarlanırken esas alınan nokta, bunları NA'ya en iyi bağlanabilecekleri şekilde dizayn etmektir. Bu da ancak NA'ya halihazırda iyi bağlandığı bilinen konak hücre üzerindeki doğal sialik asit yapısının taklit edilmesi ile mümkündür. Aşağıda bahsedilen inhibitörlerin yapıları incelendiğinde, Şekil 1.9'da görülen doğal sialik asit yapısına çok yakın yapılar oldukları da rahatlıkla görülebilir.



Şekil 1.9: Virüsün enfekte ettiği konak hücre üzerinde NA'nın aktif bölgesine bağlanan sialik asit yapısı (Schauer vd., 2001).

Günümüzde NA aktivitesi inhibisyonu yolu ile piyasada influenza tedavisinde kullanılan dört adet antiviral ilaç bulunmaktadır. Bunlar oseltamivir (Tamiflu®),

zanamivir (Relenza®), peramivir (Rapiacta®) ve laninamivirdir (Inavir®) (Şekil 1.10). Bu ilaçlardan oseltamivir 2000 yılında, zanamivir 1999 yılında ve peramivir 2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Sağlık Bakanlığı'na bağlı FDA (Food & Drug Administration) tarafından onaylanmıştır. Ancak, laninamivire yalnızca Japonya tarafından 2010 yılında lisans verilmiş olup, bu ilaç molekülü üzerinde yapılan çalışmalar halen günden güne artarak devam etmektedir (Url-4).



Şekil 1.10: NA aktivitesini bloke etmek için kullanılan ilaç molekülleri ve tıbbi ürünlerinin piyasadaki isimleri.

Şimdiye kadar NA aktivitesini inhibe etmek için geliştirilen ilaçların, hem deneysel olarak hem de modelleme çalışmalarında en çok bağlandığı bilinen aktif bölge kavitesi SA-kavite'dir. İnhibitörler bu bölgeye bağlanarak konak hücre yüzeyindeki sialik asidin doğasını taklit eder ve bu şekilde NA'nın gerçek sialik aside bağlanmasını engelleyerek NA aktivitesini bloke etmiş olurlar (Moscona, 2005).

Tezde yapılan çalışmalarda NA inhibitörü olarak ilaç piyasasında en çok kullanılan ilaçlardan biri olan oseltamivirin etkinliği üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

1.4 Literatür Özeti

Literatürde, şimdiye kadar influenza virüsünün ilaç direncinin araştırılması üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. 2008 yılında yapılan çalışma ile antiviral ilaçlara karşı direnç gösteren ve göstermeyen NA kristal yapıları elde edilerek bu yapılar PDB veri bankasına eklenmiştir (Collins vd., 2008). Yapılan deneysel çalışma ile, bu NA yapılarına OTV'nin bağlanma ilgisini ölçülerek, ilacın deneysel bağlanma değerleri elde edilmiştir. Farklı NA yapıları üzerinde OTV'nin bağlanma enerjilerinin deneysel olarak bilinmesi, bu alandaki bilgisayar destekli çalışmalara da büyük ölçekte öncülük etmiştir.

İlaçların etkinliklerinin araştırılması ve yeni ilaç tasarımı çalışmalarında moleküler dinamik simülasyonlarının (MD) güçlü bir yöntem olduğu bilinmektedir. Bu nedenle literatürde özellikle MM-PBSA (molecular mechanics / Poisson-Boltzmann surface area) metodu başta olmak üzere farklı MD yöntemleri ile bir çok NA-OTV çalışması gerçekleştirilmiştir. Wang ve arkadaşları, MM-PBSA yöntemini kullanarak iki mutant ve iki mutant olmayan NA yapısına OTV'nin bağlanma enerjilerini hesaplamışlardır (N. X. Wang vd., 2009). Ancak, iki mutant yapı için hesapladıkları bağlanma enerjileri pozitifdir ve deneysel veriler dahil olmak üzere kararlı sistemlerde bağlanma enerjisinin negatif olduğu görülmektedir. Pozitif bağlanma enerjisi, nükleonların çekirdekten uzaklaşarak sistemin kararsız yapıda bulunduğunu gösterir. Bu durum, 6 ns olan simülasyon sürelerinin MM-PBSA yöntemi için yeterli olmadığı sonucunu doğrulamaktadır.

Nguyen ve arkadaşları, aynı şekilde PDB'de bulunan dirençli ve dirençsiz kristal NA yapıları üzerinde MM-PBSA yöntemi ile OTV'nin bağlanma enerjilerini elde etmişlerdir (T. T. Nguyen vd., 2011). Bunun yanında enerji hesaplamalarında farklı kuvvet alanları etkisini de inceleyerek, NA-OTV sistemi için en uygun parametre setini araştırmışlardır. Yaptıkları bu çalışmaya göre AMBER ve CHARMM kuvvet alanları deneysel çalışmalar ile korelasyon gösterirken, GROMOS kuvvet alanında bu korelasyon gözlenmemiştir. Bu tez kapsamında şemsiye örnekleme yöntemi ile gerçekleştirilen MD simülasyonları ise, bu konuda AMBER ve GROMOS kuvvet alanlarının daha başarılı olduğunu göstermektedir.

Cheng ve arkadaşları, NA proteinin aktif bölgesi üzerinde araştırmalar gerçekleştirmiş, kavite rezidüleri ve kavitelelerin esnekliği konusunda çalışmalar yapmışlardır (Cheng et al., 2008). Lawrenz ve arkadaşları ise, kalsiyum iyonlarının NA-OTV bağlanmasındaki etki üzerine çalışmış, yine MM-PBSA yöntemini kullanarak bağlanma enerjisi hesaplamalarını gerçekleştirmişlerdir (Lawrenz et al., 2010).

Literatürde, şemsiye örnekleme yöntemi ile başka moleküler sistemler için gerçekleştirilmiş çalışmalar da mevcuttur (W. Cui et al., 2013). Ancak NA-OTV sistemi için şemsiye örnekleme çalışmaları bulunmakla beraber, sayıca MM-PBSA, LIE (Linear Interaction Energy), termodinamik integrasyon ve serbest enerji pertürbasyonu yöntemlerine göre çok daha azdır. Karthick ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, moleküler kenetleme yöntemleri ile birlikte şemsiye örnekleme yöntemi kullanılarak dirençli ve dirençsiz NA yapılarına OTV bağlanma enerjileri

hesaplanmıştır (Karthick vd., 2014). Ancak çalışmanın sonucunda elde ettikleri PMF (Potential of Mean Force) eğrisi incelendiğinde, örnekleme yeterli olarak gerçekleştirilemediği bu eğrideki eksik veri noktalarında yaşanan ani keskin düşüşlerden rahatlıkla anlaşılabilir. Bu nedenle elde edilen bağlanma enerjilerinin doğruluğundan şüphe duyulmuştur.

NA yapılarında OTV ilaç direncinin araştırılması çalışmaları güncelliğini günümüzdeki çalışmalarla sürekli olarak devam ettirmektedir. Lina ve arkadaşları, OTV direncinin hastalar üzerinde araştırılması amacıyla influenza virüsü tarafından enfekte edilmiş hasta gruplarında deneysel çalışmalar yapmışlar ve belirli yaş gruplarında ilaç direnci etkisinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Lina et al., 2018). Benzer şekilde bir çalışmada, antiviral dirence sahip H1N1 pandemik influenza virüsü bir lösemi hastasında virolojik olarak izlenerek tedavinin etkinliği araştırılmıştır (Salata vd., 2018).

2. TEORİK MODEL VE YÖNTEM

2.1 Sistemin Genel Tanımı

2.1.1 Protein – ligand bağlanma kinetiği ve termodinamik ilişkiler

Biyolojik makromoleküllerin birbirleriyle veya çeşitli küçük moleküller ile etkileşime girerek yüksek bir spesiflik ve afinite ile belirli bir kompleks oluşturmak için etkileşmesi anlamına gelen moleküler tanıma, canlı organizmalardaki tüm işlevlerin temelini oluşturur. Biyolojik makromoleküllerin önemli bir sınıfı olan proteinler, işlevlerini kendi gibi proteinlere veya diğer moleküllere bağlanarak gerçekleştirir. Protein-ligand etkileşimlerinin detaylı olarak anlaşılması, biyolojiyi moleküler seviyede anlamak için çok önemlidir. Bu nedenle, protein-ligand sisteminin ve bağlanmalarından sorumlu mekanizmaların bilgisi, ilaçların keşfedilmesini, tasarlanmasını ve geliştirilmesini de kolaylaştıracaktır. Moleküler tanımanın daha iyi anlaşılması için, protein-ligand etkileşiminin altında yatan fizikokimyasal mekanizmaların anlaşılması gerekir. Bu bölümde, bağlanma kinetiği, temel termodinamik kavramlar ve protein-ligand bağlanmasındaki itici güçler, faktörler ve entalpi-entropi ilişkisi anlatılacaktır.

Protein-ligand bağlanma kinetiği, özellikle bu iki molekülün birbirine bağlanma hızına odaklanan, protein ve ligand arasındaki ilişkinin altında yatan süreci ifade eder. Basit bir durumda, bir protein molekülü (P) ve karşılıklı afiniteye sahip bir ligand molekülü (L) bir çözelti içinde karıştırıldığında, bunlar arasındaki zamana bağlı ilişki Denklem 2.1'deki gibi formüle edilebilir. Bu denklemde, PL protein-ligand kompleksi, k_{on} ve k_{off} ise sırasıyla bağlanma ve ayrılma kinetik hız sabitleridir. k_{on} ve k_{off} 'un birimleri sırasıyla $M^{-1}s^{-1}$ ve s^{-1} 'dir.



Denge halinde, ileri yöndeki $P + L \rightarrow PL$ bağlanma reaksiyonu ile ters yöndeki $PL \rightarrow P + L$ ayrılma reaksiyonun hızları birbirine eşittir. Bu durumda Denklem 2.2

yazılabilir (Du vd., 2016). Burada köşeli parantez içerisinde gösterilmiş olan biyolojik moleküller denge konsantrasyonunu ifade eder.

$$k_{on} [P][L] = k_{off} [PL] \quad (2.2)$$

Denge halindeki denkleme göre bağlanma sabiti K_b Denklem 2.3'teki (Du vd., 2016) gibi ifade edilir ve birimi M^{-1} 'dir. Bu denklemde K_d ayrılma sabitidir ve birimi M 'dir.

$$K_b = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad (2.3)$$

Bağlanma sabiti değerinin yüksek olması durumunda ayrılma sabiti değeri düşüktür ve bu durum bağlanma affinitesinin yüksek olduğu anlamına gelir. Tam tersi durumda, ayrılma sabiti yüksek olduğundan bağlanma affinitesi düşüktür.

Protein-ligand bağlanma affinitesi deneysel olarak ölçülebilir ve teorik yöntemlerle de hesaplanabilir. Deneysel yöntemlerden birkaçı, izotermal titrasyon kalorimetresi, yüzey plazmon rezonans ve floresans polarizasyondur (Du vd., 2016). Teorik yöntemler ise, protein-ligand kenetleme, serbest enerji hesaplamaları, yolak örnekleme ve bitiş noktası yöntemleri olarak dört ana grupta toplanabilir. Bunlardan moleküler kenetleme ve yolak örnekleme NA-OTV bağlanma enerjisinin hesaplanması için bu tez kapsamında kullanılmış ve ileriki bölümlerde açıklanmıştır.

Bir protein-ligand-çözücü sistemi, çözünen (protein ve ligand molekülleri) ve çözücünden (su ve tampon iyonları) oluşan bir termodinamik sistemdir. Böyle bir sistemde, maddeler arasında karmaşık etkileşimler ve sistemde ısı değişimi vardır. Bu etkileşimler ve ısı transferinin enerji değişimi ile arasındaki ilişki termodinamik yasaları tarafından belirlenir. Yani, protein ve ligandlar arasındaki ilişkiyi belirleyen itici kuvvetler, protein, ligand, su ve tampon iyonları arasındaki çeşitli etkileşimlerin ve enerji değişimlerinin bir sonucudur. Bir sistemin sabit sıcaklık ve basınçta (izotermal ve izobarik) maksimum veya tersinir iş yapma kapasitesini ölçen termodinamik bir potansiyel olan Gibbs serbest enerjisi (ΔG), itici kuvvetlerin karakterizasyonu için en önemli termodinamik niceliklerden biridir (Gilson vd., 2007). Herhangi bir spontan sürece benzer bir şekilde, protein-ligand bağlanması, sadece sistemin sabit basınç ve sıcaklıkta bir denge durumuna ulaştığı zaman, sistemin ΔG 'sindeki değişiklik negatif olduğunda meydana gelir. Protein ligand birleşme

derecesi, negatif ΔG 'nin büyüklüğü ile belirlendiğinden, ΔG 'nin verilen herhangi bir protein-ligand kompleksinin stabilitesini veya bir diğer deyişle bir ligandın verilen bir alıcıya bağlanma afinitesini belirlediği söylenebilir (Gibbs, 1873).

1 atm basınç, 298 Kelvin sıcaklık ve reaktan (protein ve ligand) konsantrasyonlarının 1 M olduğu koşullar altında serbest enerji değişimini ifade eden standart serbest bağlanma enerjisi (ΔG^o), bağlanma sabiti K_b ile Denklem 2.4'teki gibi ilişkilidir (Du vd., 2016). Bu denklemde R , evrensel gaz sabiti ($1.9872036 \times 10^{-3} \text{ kcal. K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T ise Kelvin cinsinden sıcaklıktır.

$$\Delta G^o = -RT \ln(K_b) \quad (2.4)$$

K_b bağlanma sabitinin değeri ne kadar yüksek ise, serbest bağlanma enerjisinin değeri o kadar negatiftir. Yani k_{on} ve k_{off} 'un birbirine oranı olan K_b kinetik parametresi, sistemdeki kompleksin stabilitesi ve protein-ligand bağlanma affinitesi gibi termodinamik özelliklerini belirleyen bir parametredir.

Herhangi bir zamanda, standart durum koşulları olmadan gerçekleşen bağlanma durumundaki serbest bağlanma enerjisi ΔG ise Denklem 2.5'teki gibi ifade edilir (Du vd., 2016). Bu denklemde Q , protein-ligand kompleksi konsantrasyonunun sadece protein ve sadece ligand konsantrasyonlarının çarpımına oranı olan reaksiyon oranını ifade eder.

$$\Delta G = \Delta G^o + RT \ln Q \quad (2.5)$$

Denklem 2.4'teki gibi $Q = K_b$ olduğunda $\Delta G = 0$ olur. Ayrıca ΔG , entalpi ve entropi cinsinden de Denklem 2.6'daki gibi ifade edilebilir (Du vd., 2016). Bu eşitlikte ΔH ve ΔS sırasıyla proteine bir ligand bağlanması durumunda sistemdeki entalpi ve entropi değişikliğini ve T 'de Kelvin cinsinden sıcaklığı gösterir.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.6)$$

Entalpi, bir termodinamik sistemin toplam enerjisinin yani çözünen ve çözücünün iç enerjilerinin toplamının bir ölçüsüdür. Burada ifade edilen bağlanma entalpisi, genel olarak bağlanma arayüzündeki kovalent olmayan etkileşimlerin (Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları, iyon çiftleri ve diğer polar & apolar etkileşimler) oluşumlarından kaynaklanan enerji değişiklikleri olarak kabul edilir. Entropi ise, ısı

enerjisinin genel termodinamik sisteme nasıl eşit bir şekilde dağıtılacağına bir ölçüsüdür. Termodinamiğin ikinci yasası, ısının her zaman yüksek sıcaklıktaki bölgelerden düşük sıcaklıktaki bölgelere kendiliğinden aktığını ifade eder. Bu nedenle entropi, bir sistemdeki atomlarda ve moleküllerdeki düzensizliğin veya rastgeleliğin bir ölçüsü olarak da değerlendirilebilir.

2.1.2 NA referans ve mutant yapıları

Günümüzde NA aktivitesini inhibe etmek için en çok kullanılan ilaçlardan bir tanesi olan oseltamivirin NA üzerindeki aktivitesinin, bilgisayar destekli modelleme ve simülasyon çalışmaları ile incelenebilmesi için öncelikle proteinin üç boyutlu yapısının bilinmesi gerekir. Literatürdeki deneysel ve teorik çalışmalar sonucunda OTV'ye karşı yüksek antiviral ilaç direncine sahip olduğu bilinen ve aksine herhangi bir direnç göstermediği de bilinen NA proteini kristal yapıları PDB'de mevcuttur.

OTV'nin antiviral dirence sahip olan ve olmayan yapılar üzerindeki ilaç kinetiğinin incelenebilmesi için, bu tez kapsamında iki adet mutant NA yapısı (PDB kodu: 3cl2 ve 3cl0) ve iki adet mutant olmayan yapı (biri için PDB kodu: 2hu4) olmak üzere toplam dört adet N1 alt tipine ait yapı üzerinde deneyler ve analizler gerçekleştirilmiştir.

PDB'de bu yapılar kompleks halinde, yani OTV ile bağlanmış şekilde bulunmaktadır. NA yapısı OTV ile bağlı ise holo, tek başına kullanıldığında apo olarak isimlendirilmiş ve tezin bundan sonraki kısmında bu şekilde bahsedilecektir.

Bu yapılardan mutant olmayan ve PDB'de kristal yapısı bulunan NA yapısı S1 (susceptible 1), diğer mutant olmayan ve kristal yapısı mevcut olmayan NA yapısı S2 (susceptible 2) olarak adlandırılmış ve tezin bundan sonraki kısmında bu şekilde bahsedilecektir.

S1, OTV'ye karşı antiviral direnç göstermeyen ve enzimatik aktivitesi yeterli doz ile başarılı bir şekilde inhibe edilebilen NA yapısıdır. Bu yapının antiviral direnç göstermemesinin nedeni herhangi bir mutasyona sahip olmaması değildir, aksine S1 yapısında 252. sekanstaki Histidin, Tirozin'e dönüşerek tekli mutasyona sebep olmuştur. Ancak bu mutasyon, OTV'nin bağlandığı aktif bölge başta olmak üzere, bağlanma kinetiğini etkileyecek herhangi bir etki yaratmadığından, antiviral ilaç direnci gelişmemiştir. Bu nedenle S1 yapısı mutant olmayan yapı olarak

değerlendirilecektir. Bu mutasyonun antiviral dirence neden olmamasının araştırılması da S2 yapısı ile sağlanacaktır. S2 NA yapısında, S1 yapısındaki 252. sekanstaki Tirozin, ters dönüşüm yapılarak Histidin'e çevrilmiş ve böylece teoride hiç bir mutasyona sahip olmayan bir NA yapısı oluşturulmuştur. S2 yapısının kristal yapısı PDB'de mevcut değildir. Bu nedenle üç boyutlu yapısının oluşturulma yöntemi tezin homoloji modellemesi kısmında detaylı olarak anlatılacaktır.

S1 ve S2 yapılarının aksine, OTV'ye yüksek oranda direnç gösterdiği bilinen mutant NA yapılarından bir tanesinde 294. sekanstaki Asparajin amino asidi Serin'e, diğerinde ise 274. sekanstaki Histidin amino asidi Tirozin'e dönüşmüştür. S1 ile aynı şekilde her ikisinde de 252. sekansta Tirozin amino asidi bulunmaktadır. Tezin bundan sonraki kısmında bu iki mutant yapı sırasıyla R1 (resistant 1) ve R2 (resistant 2) olarak adlandırılacaktır. Şekil 2.1'de yaklaşık 390 amino asit uzunluğundaki dört NA sekansının bir kısmı verilmiş ve mutasyonların bulunduğu rezidüer sarı renk ile gösterilmiştir. Alt kısımdaki yıldız işareti (*) sekansların tamamen aynı olduğu bölgeleri, iki nokta (:) ise mutasyonların bulunduğu sarı renkteki 252., 274. ve 294. sekansları göstermektedir.

```

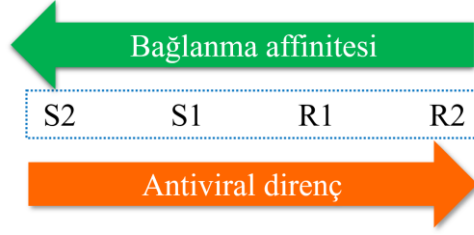
                210.         220.         230.         240.         250.         260.
S2 VAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQASHKIFKMEKG
S1 VAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQASYKIFKMEKG
R1 VAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQASYKIFKMEKG
R2 VAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQASYKIFKMEKG
*****.*****

                270.         280.         290.         300.         310.         320.
S2 VVKSVELDAPNYHYEECSCYPNAGEITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICSGVF
S1 VVKSVELDAPNYHYEECSCYPNAGEITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICSGVF
R1 VVKSVELDAPNYHYEECSCYPNAGEITCVCRDSWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICSGVF
R2 VVKSVELDAPNYHYEECSCYPNAGEITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICSGVF
*****.*****

```

Şekil 2.1: S2, S1, R1 ve R2 NA sekanslarının bir kısmının hizalanmış gösterimi.

Literatürdeki bir çok deneysel ve teorik çalışma 274. ve 294. amino asitlerin yukarıda bahsedilen dönüşümü yaşamaları durumunda OTV'nin bağlanma kinetiğini ciddi ölçüde etkileyerek antiviral ilaç direnci geliştiğini kanıtlamıştır (Yusuf vd., 2016). Buna göre, OTV'nin bağlanma affinitesi çoktan aza doğru sırasıyla S2, S1, R1 ve R2'dir. Yani, antiviral direnç çoktan aza doğru R2, R1, S1 ve S2 şeklindedir (Şekil 2.2). Yeşil ok yönünde gidildikçe OTV'nin bağlanma affinitesi artarken, turuncu ok yönünde gidildiğinde antiviral direnç artar.



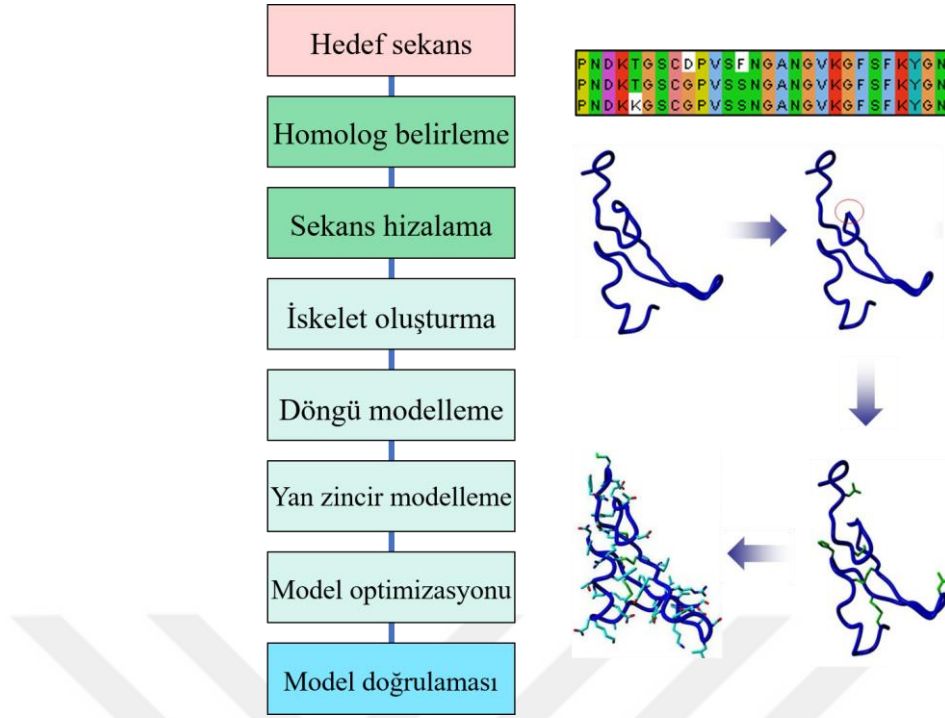
Şekil 2.2: S2, S1, R1 ve R2'nin bağlanma affinitesi ve antiviral dirençlerinin sıralama olarak gösterimi.

2.2 Homoloji Modellemesi

Protein karşılaştırmalı modelleme olarak da bilinen homoloji modellemesi, bir proteinin birincil yapısından (amino asit sekansından), üç boyutlu yapısının oluşturulmasıdır (Chothial vd., 1986). Kısaca bu yöntemin amacı, yapısı bilinmeyen bir proteinin yapı tahminini gerçekleştirerek üç boyutlu bir modelini oluşturmaktır.

Homoloji modellemesinde öncelikle verilen sekansa (hedef) göre homolog olan protein (şablon) tespit edilir. Şablon protein ve hedef protein sekansları (rezidüleri) eşlenerek bir hizalama gerçekleştirilir. Bu hizalama işlemi sonucunda şablon protein yapısı baz alınarak ilk olarak proteinin iskeleti (backbone) oluşturulur (Baker & Sali, 2001). Homolog protein ile hizalama esnasında eşleşmeyen rezidüler için ise yapı tahmini, Monte Carlo yaklaşımı kullanılarak döngü modellemesi (loop modeling) yöntemi ile ab initio olarak gerçekleştirilir. Bu aşama, modelleme hatalarına en duyarlı olan aşamadır. Hedef ve şablon sekans eşleşmesi yeterli seviyede (sekans benzerliği en az %30) olmadığında bu hatalar daha yüksek sıklıkta meydana gelir (Zhang, 2011) (Sensoy vd., 2017). Daha sonra proteinin yan zincirleri modellenir, model optimizasyonu ve doğrulaması yapılarak hedef sekansın üç boyutlu yapısı homoloji modellemesi yöntemi ile oluşturulmuş olunur. Şekil 2.3'te homoloji modellemesinin aşamaları sırasıyla gösterilmiştir.

Günümüzde homoloji modellemesi için geliştirilmiş yüzlerce yazılım mevcuttur. Bunlardan bazıları I-TASSER, QUARK, Modeller, LOMETS, MPACK, ProModel, SCRWL, Biskit, ModPipe, RaptorX, Prime, ProSide, CABS, SWISS-MODEL, Robetta ve FoldX'tir (Url-6).



Şekil 2.3: Homoloji modellemesinin aşamaları (Url-5).

Bu yazılımlardan protein yapı tahminini en iyi şekilde yapabilenlerin belirlenmesi, ilerlemelerin tespit edilmesi ve böylece bu alanın gelişimine katkı sağlanabilmesi amacıyla 1994'ten beri her iki yılda bir CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction - Protein Yapı Tahmini için Tekniklerin Kritik Değerlendirmesi) deneyleri yapılmaktadır. Özetle CASP, protein yapısı tahminlerinin test edilmesine yönelik dünya çapında bir yarışmadır. Deney sonuçlarına göre, şimdiye kadar gerçekleştirilen 13 CASP deneyinden 7. (2006), 8. (2008), 9. (2010) ve 10. (2012) deneylerin sonucunda I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBLY Refinement) 1. sırada yer almıştır (Roy vd., 2010). Bu nedenle I-TASSER, protein yapı tahmini için geliştirilmiş en iyi yöntemlerden bir tanesidir. (Ben-david vd., 2009) Bu nedenle tez kapsamında yapısı bilinmeyen proteinlerin yapı tahmini için I-TASSER'ın web-tabanlı sunucusu kullanılmıştır.

Homoloji modellemesine ek olarak, kullanılan NA yapıları tek bir mutasyona sahip olduğundan tüm sistemi modellemek yerine tek bir rezidüde değişiklik yapmak için Pymol 1.7.4.5 Mutagenesis (Ballard vd., 2002) modülü kullanılmıştır. Böylelikle, kristal yapı ile neredeyse aynı yapıya sahip NA yapıları elde edilmiştir. Tezde kullanılan S2'nin kristal yapısı bulunmadığından, S1 kristal yapısına yakınsamak için bu modül ile yukarıda bahsedilen 252. rezidü dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

2.3 Moleküler Kenetleme

Moleküler kenetleme (docking), bir ligandın makromoleküle olan bağlanma enerjisini ve ligandın kovalent olmayan etkileşimler ile makromoleküle bağlandığı durumdaki konformasyonunu tahmin etmek için kullanılır. Biyolojik etkileşimlerin ve mekanizmaların anlaşılmasında yaygın olarak yapı tabanlı ilaç tasarımı alanında kullanılan bir yöntemdir. Tipik olarak bir moleküler kenetleme işlemi yapılabilmesi için, öncelikle makromolekülün yapısının kristalografik olarak bilinmesi gerekir. Daha sonra bu yapı üzerine bağlanması istenen ligand molekülünün minimum enerjiye sahip konformasyonunun belirlenmesi ve bu konformasyondaki bağlanma enerjisinin belirli fonksiyonlar kullanılarak hesaplanması için moleküler kenetleme işlemi gerçekleştirilir. Hedef makromolekülün işlevinin anlaşılması ve büyük bileşik kütüphanelerindeki ligand moleküllerinin sanal taramasının yapılarak yeni inhibitörlerin keşfedilmesi için moleküler kenetleme günümüzde ilaç tasarımı çalışmalarında büyük bir önem taşımaktadır.

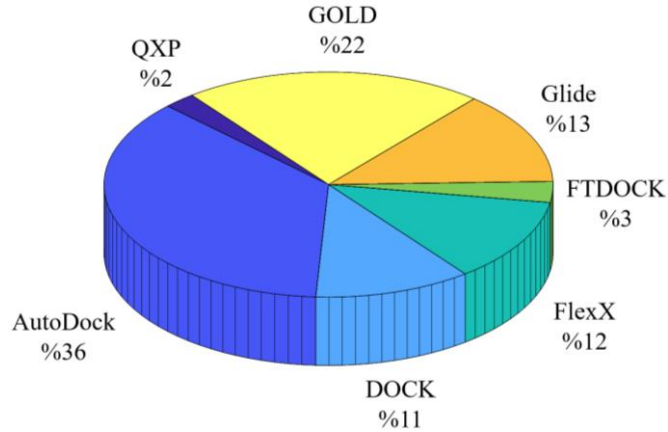
2.3.1 Arama algoritması ve skortlama fonksiyonu

Protein-ligand kenetleme yöntemi arama algoritmaları ve skortlama fonksiyonları olmak üzere iki temel bileşen içerir. Arama algoritmaları, belirli bir hedef protein içindeki ligand geometrisini ve konformasyonunu (pozu) tahmin etmek için kullanılır. Bu algoritmalarından bazıları Monte Carlo (MC), Genetik Algoritma (GA) ve hibrit GA olarak da bilinen Lamarckian Genetik Algoritma (LGA)'dır. Bu algoritmalarından LGA, diğerlerine göre daha başarılı sonuçlar vermektedir (Morris vd., 1998). Skortlama fonksiyonları ise protein-ligand bağlanma enerjisini tahmin etmek için kullanılır. En yaygın skortlama fonksiyonları, kuvvet alanı tabanlı, ampirik, bilgi tabanlı (istatistiksel potansiyel) ve makine öğrenmesi tabanlı fonksiyonlardır. Bu algoritma ve fonksiyonların her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Bu nedenle de genel uygulanabilirlik açısından en doğru yaklaşım bunların kombinasyonlarının kullanılmasıdır.

2.3.2 Kullanılan moleküler kenetleme yazılımları

Moleküler kenetleme için geliştirilmiş birbirlerinden farklı algoritmalar kullanan yüzlerce yazılım mevcuttur. Bunlardan en önemlileri, AutoDock Suite, Gold, DOCK, Glide ve FlexX yazılımlarıdır. 2001-2011 yılları arasında baz alarak yapılan bir

çalışmaya göre (Sousa, 2013), literatürde en çok atıf alan moleküler kenetleme yazılımları Şekil 2.4'te yüzde dilim olarak gösterilmiştir.

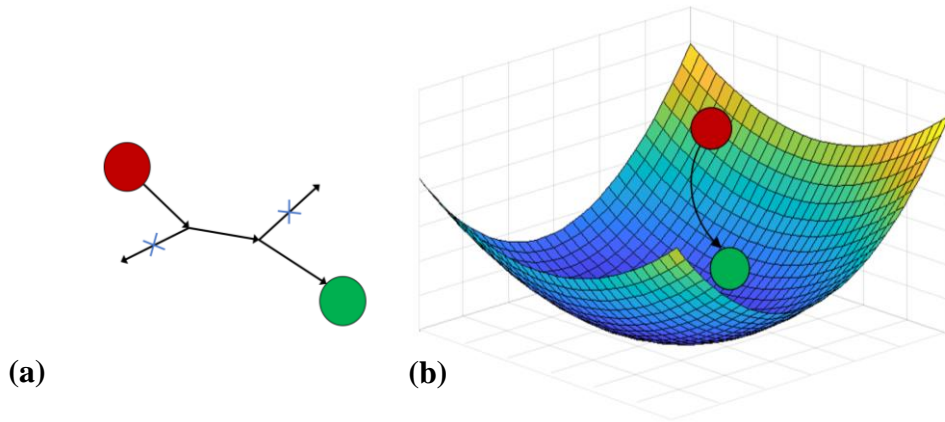


Şekil 2.4: 2001-2011 yılları arasında en çok alıntı yapılan 7 adet moleküler kenetleme programının ortalama yıllık atıf sayılarının yüzdelik dilim olarak gösterimi.

Bu çalışmada, popüler kenetleme programlarının performansları karşılaştırılmıştır. Ulaşılan sonuca göre farklı yazılımlar, belirli hedeflere bağlı olarak farklı başarı oranlarına ulaşabilir, yani performans protein-ligand sistemine göre değişiklik gösterebilir. Ancak genel olarak en çok kullanılan kenetleme programlarının hepsi bir dizi farklı protein-ligand kompleksi üzerinde de test edildiklerinde, benzer şekilde ligandın deneysel yapıya uygun bağlandığı yönünde performans gösterdikleri görülmüştür. Ligandlar, reseptörlerinde önemli bir fleksibilite olmaması koşuluyla düşük bağlanma enerjisi hata payları ile sonuç vermiştir. Bu bilgiler ışığında, bu tez kapsamındaki moleküler kenetleme çalışmaları için literatürde halen en çok atıfa sahip olan AutoDock programı kullanılmıştır.

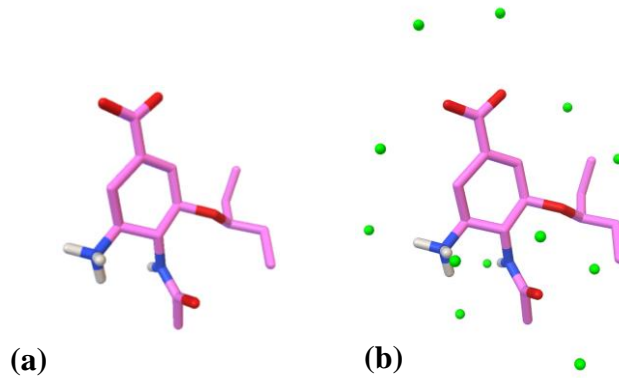
Moleküler kenetleme analizlerinin doğruluk seviyesinin artırılması ve deneysel verilerle anlamlı bir karşılaştırmanın yapılabilmesi için AutoDock'un üç farklı yazılım paketi kullanılmıştır. Bunlar, AutoDock 4.2.6 (Morris vd., 2010), Hydrated AutoDock 4.2.6 (Forli vd., 2012) ve AutoDock Vina (Trott vd., 2011)'dir. Her üç yazılım paketi de esnek olmayan protein ve esnek ligandı tanımlayan aynı tipte giriş dosyalarını kullanır. Ancak skorlama fonksiyonları ve arama algoritmalarında bazı benzer parametrelere sahip olsalar da önemli farklara sahiptirler. Örneğin, AutoDock 4.2.6 stokastik (rastlantısal) bir arama algoritması ve AMBER kuvvet alanının birleşik atom modeli tabanlı bir skorlama fonksiyonu kullanırken, AutoDock Vina yerel optimumu

bulmak için gradyan tabanlı arama algoritması ve ampirik & bilgi-tabanlı bir skorlama fonksiyonu kullanır (Chang vd., 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: AutoDock 4.2.6'nın stokastik arama algoritması (a) ve AutoDock Vina'nın gradyan tabanlı arama algoritmasının (b) şematik gösterimi.

Hydrated AutoDock 4.2.6 ise, AutoDock 4.2.6'daki ile aynı arama algoritması ve skorlama fonksiyonunu kullanır ancak AutoDock 4.2.6'dan farkı biyolojik ortamın mimetiğinin daha iyi yapılabilmesi için ligand molekülünün etrafına su molekülleri eklenerek işlemin gerçekleştirilmesidir. Buradaki su molekülleri modelleme hassasiyetinden ödün vermeden su özelliklerinin basit bir tanımını sağlamak için tasarlanmış özelliklere sahip bir monoatom ile temsil edilir (Şekil 2.6). Bu atomlar ligandın intramoleküler etkileşimlerine herhangi bir etkide bulunmaz. İntermoleküler etkileşimler için ise, hidrojen bağı alıcısı ve donörü özelliklerinin bir kombinasyonu olarak davranır.



Şekil 2.6: AutoDock 4.2.6 kullanılarak yapılan moleküler kenetleme için hazırlanmış OTV molekülü (a) ve Hydrated AutoDock 4.2.6 kullanılarak yapılan moleküler kenetleme için hazırlanmış OTV molekülü (b).

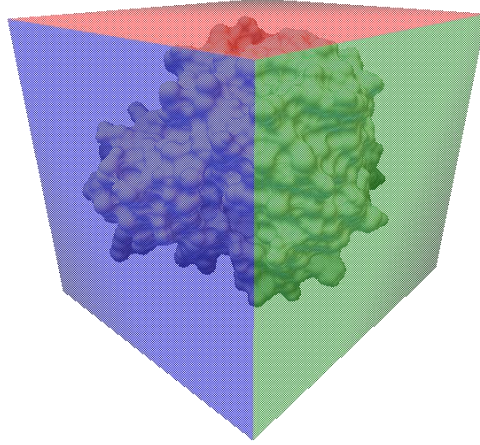
2.3.3 Deneysel akış ve parametreler

Tez kapsamında gerçekleştirilen moleküler kenetleme deneyleri sonucunda oseltamivirin Nöraminidaz'a olan bağlanma enerjilerini, konformasyonlarını, geometrisini ve etkileşim haline olduğu rezidüleri belirleyebilmek için Şekil 2.7'de gösterilen akış şeması izlenmiştir.



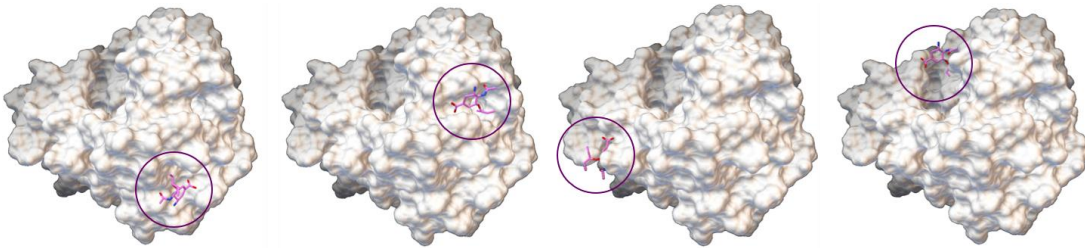
Şekil 2.7: Moleküler kenetleme deneyleri için gerçekleştirilen iş akış şeması.

Öncelikle yapılar tüm hidrojenler eklenmiş, Gasteiger yükleri hesaplanmış ve polar olmayan hidrojen atomları yapıya kaynaştırılarak kenetleme için gerekli giriş dosyaları oluşturulmuştur (.pdbqt). Burada polar hidrojen atomları oksijen ve nitrojen gibi elektronegatif atomlara bağlanan atomları temsil ederken, polar olmayan hidrojenler karbon atomlarına bağlı olanları ifade etmektedir. Polar olmayan hidrojen atomlarının yapıya kaynaştırılması, AutoDock'un birleşik atom modelini kullanarak hesaplama yapmasından kaynaklanmaktadır. Pdbqt giriş dosyası, yapıdaki tüm atomların koordinatları, kısmi yükleri ve atom tipleri bilgilerini içerir. Daha sonra moleküler kenetlemenin gerçekleştirileceği alanın belirlenmesi gerekir. Bunun için Nöraminidaz üzerinde oseltamivirin bağlanması için arama yapılması istenen bölgeyi temsil eden bir kutu oluşturulur. Oseltamivirin Nöraminidaz üzerinde olası olarak bağlanabileceği tüm bölgelerin belirlenmesi için bu kutu Nöraminidaz'ı bütünüyle kapsayacak şekilde yaklaşık olarak 6 x 6 x 6 nm boyutlarında bir küp şeklinde oluşturulmuştur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Moleküler kenetleme sırasında kullanılan alan kutusunun gösterimi.

Bu aşamadan sonra gerekli parametre dosyası oluşturularak AutoGrid ile sistem haritalarının hesaplanmasına geçilir. Elektrostatik ve desolvasyon potansiyelleri, hidrojen bağı alıcısı oksijen, hidrojen bağı vericisi hidrojen, alifatik / aromatik karbon, nitrojen ve sülfür gibi atom-spesifik affinite haritaları oluşturulduktan sonra ise kenetleme için gerekli parametrelerin belirlenmesi ile kenetleme hesaplamaları başlatılır. Burada kullanılan önemli parametrelerden olan “aralık parametresi” 0.2 Angstrom, “dielektrik sabiti” -0.1465 (mesafe-bağımlı) (Mehler vd., 1991), “LGA enerji evalüasyonu” 25,000,000 ve “konformasyon sayısı” 100 olarak kullanılmıştır. Kenetleme işlemi sırasında belirlenen kutunun sınırları içerisinde oseltamivir, Nöraminidaz üzerinde bağlanabileceği tüm alanı tarar (Şekil 2.9). Kenetleme sonucunda en iyi konfigürasyona sahip ligand, hem bağlanma bölgesi hem de bağlanma enerjisi anlamında en iyi sonucu veren ligand konformasyonudur.



Şekil 2.9: Kenetleme alanı içerisinde Nöraminidaz yüzeyini tarayan oseltamivirden birkaçı.

Yukarıda bahsedilen parametrelerle deneyler gerçekleştirilmeden önce, NA-OTV sistemi için optimum parametreleri belirleyebilmek adına yüzlerce test deneyi

yapılmıştır. Örneğin, konformasyon anlamında spesifiteyi, bağlanma enerjisi anlamında da doğruluğu artırmak amacıyla, kenetleme alanı kutusu yalnızca aktif bölge seçilerek deneyler yapılmıştır. Ancak, 6 x 6 x 6 nm boyutlarındaki kenetleme alanı kutusu ile yapılan deneyler arasında bir fark görülmemiştir. Bu nedenle hesaplama süresinin artmasına rağmen deneyler, oseltamivirin Nöraminidaz üzerindeki olası bütün bağlanma bölgelerini tespit edebilmek amacıyla büyük boyutta kullanılmıştır. Diğer parametreler de aynı şekilde optimize edilerek, en iyi sonuçları verecek şekilde (deneysel verilerle uyum) seçilmiştir.

2.3.4 Moleküler kenetlemenin limitasyonları

Moleküler kenetleme, bağlanma pozisyonu ve protein-ligand etkileşimlerini belirlemek için günümüzde halen çok kullanılan, güvenilir ve kısa süreler gerektiren bir yöntem olsa da, önemli bir limitasyonu vardır. Proteinler termodinamik olarak kararlı bir yapıya ulaşabilmek için konformasyonel anlamda sürekli hareket halinde olan biyolojik moleküllerdir. Moleküler kenetleme algoritmalarında karşılaşılan en önemli limitasyon da proteinin fleksibilitesidir. Bu limitasyonun en önemli nedeni, bir protein molekülü için göz önünde bulundurulması gereken çok sayıda serbestlik derecesinin olmasıdır (degrees of freedom). Moleküler kenetlemede, çoğunlukla serbestlik derecesi ihmal edilir. Yani protein tamamen hareketsiz, katı bir durumdayken ligand bağlanması gerçekleştirilir. Bu durum, ligandın bağlanma enerjisi ve konformasyonu açısından genellikle zayıf kenetleme sonuçlarına yol açar. Günümüzde, her ne kadar bazı moleküler kenetleme yazılımlarında gelişmeler ile birlikte esnek protein seçeneği sunulmuş olsa da (Pagadala vd., 2017), genellikle sadece belirli bir bölgenin fleksibilitesi ile limitlidir. Bir protein-ligand sisteminin mümkün olan en kararlı şekli ile araştırmalarının gerçekleştirilebilmesi, günümüzde ancak moleküler dinamik simülasyonları ile sağlanabilir. MD simülasyonları, sistemin fleksibilitesinde herhangi bir limitasyon yaratmadan kapsamlı örneklemeler yaparak doğruluğu ciddi oranda artıran ve gerçek hayata en yakınsayan teorik yöntemlerden bir tanesidir.

2.4 Moleküler Dinamik

1965 Nobel Fizik Ödülü'nün sahibi Richard Feynman şöyle demiştir: “Hayatı anlamlandırmak için şimdiye kadarki en güçlü varsayımı tanımlamak isteseydik, her

şeyin atomlardan oluştuğunu ve canlıların tüm davranışlarının bu atomların salınmaları ve titreşimleri ile anlaşılabilirliğini söyleyebilirdik.” Son 50 yılda biyofizikçiler kendilerini, atomların bu hareketlerinin doğasını daha iyi anlayabilmeye adanmışlardır. Günümüzde biyolojik moleküllerin doğasının teorik olarak çalışılmasında moleküler dinamik (MD) ve kuantum mekaniksel (QM) simülasyonlar kullanılır. Bu yöntemler, bir moleküler sistemdeki atomların zamana bağlı davranışlarını incelemek için hesaplamalar yaparak protein ve nükleik asit gibi moleküllerdeki yapısal katlanmalar ve dalgalanmalar, konformasyonel değişiklikler, sistemin stabilitesi ve termodinamiği hakkında detaylı bilgi sağlar. MD simülasyonları, atomik pozisyonlar ve hızlar dahil olmak üzere mikroskobik seviyede bilgi üretir. Mikroskobik dünyadaki hareketleri düzenleyen kuantum mekaniksel yasalar, bunlara bağlı makroskobik dinamiklerin elde edilmesinde yanıltıcı olabilirler. Kuantum mekaniğinde hareketler deterministik yasalarla değil, olasılık fonksiyonlarıyla yönetilir, yani kimyasal bağlar mekanik olarak değil, aynı anda dalga ve parçacık özelliği gösteren elektron bulutları olarak tanımlanır. Bu nedenle mikroskobik bilginin basınç, enerji, ısı kapasiteleri vb. gibi makroskopik sistemlerin gözlemlenebilen özelliklerine dönüştürülmesi için MD simülasyonları hesaplamalarında istatistiksel mekanik kullanılır. Yani istatistiksel mekanik, biyolojik sistemlerin MD simülasyonu ile matematiksel olarak incelenebilmesinde temel esastır (Kazemi vd., 2018). Ne yazık ki, kuantum mekaniksel simülasyonlar atom hareketlerini ve büyük moleküler sistemlerin kimyasal dinamiklerini tanımlamak için daha iyi bir yöntem olsa da, çoğu zaman en iyi süper bilgisayarlar için bile çok karmaşık ve yoğun hesaplamalar gerektirdiğinden, MD simülasyonları günümüzde QM simülasyonlarından daha önde gelmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır.

MD simülasyonları için kullanılan en popüler yazılım paketleri AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement) (Salomon-ferrer vd., 2012), GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) (Berendsen vd., 1995), NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) (Phillips vd., 2005) ve CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) (Brooks vd., 2009)’dır. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen MD simülasyonları GROMACS 5.1.4 yazılım paketi kullanılarak yapılmıştır.

2.4.1 Teori

Moleküler dinamik simülasyonlarında öncelikle sistemdeki atomların her birine Maxwell-Boltzmann dağılımına göre bir hız tanımlanır ve tüm atomlar üzerindeki kuvvetler potansiyel enerji fonksiyonu kullanılarak tahmin edilir. Bu kuvvetler, atomlar arasındaki bağlı ve bağlı olmayan etkileşimlerin etkileri ile oluşur. Sistemdeki toplam potansiyel enerji fonksiyonu Denklem 2.7’de verilmiştir. Burada K_r yay sabiti, r atomlar arasındaki mesafe, r_{eq} denge uzaklığı, K_θ açısal sabit, θ üç atom arasındaki açı, θ_{eq} denge açısı, V_n enerji bariyeri, n periyodiklik sabiti, ϕ iki düzlem arasındaki açı, γ faz kayması, A_{ij} ve B_{ij} potansiyel sıfırken iki atom arası uzaklık, R_{ij} iki atom arası uzaklık, q_i ve q_j atom yükleri ve ϵR_{ij} dielektrik fonksiyonunu ifade eder.

$$E_{toplam} = \sum_{bağlar} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{açılar} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedraller} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2.7)$$

Şekil 2.10’da ise bağlı olan ve olmayan etkileşimler görsel üzerinde gösterilmiştir. Kimyasal bağlar ve atomik açılar basit yaylar olarak, dihedraller (bir bağın etrafındaki rotasyonlar) sinüzoidal bir fonksiyon kullanılarak modellenir. Van der Waals etkileşimleri ile ortaya çıkan bağlı olmayan etkileşimler, Lennard-Jones potansiyeli kullanılarak, elektrostatik etkileşimler ise Coulomb yasası ile modellenir (Durrant vd., 2011).

$$E_{toplam} = \underbrace{\sum_{bağlar} \left[\text{Bağlı etkileşimler} \right]}_{\text{Bağlı etkileşimler}} + \underbrace{\sum_{açılar} \left[\text{Bağlı etkileşimler} \right]}_{\text{Bağlı etkileşimler}} + \underbrace{\sum_{dihedraller} \left[\text{Bağlı etkileşimler} \right]}_{\text{Bağlı etkileşimler}} + \underbrace{\sum_{i < j} \left[\text{Bağlı olmayan etkileşimler} \right]}_{\text{Bağlı olmayan etkileşimler}}$$

Şekil 2.10: Toplam potansiyel enerji fonksiyonunu tanımlayan bağlı ve bağlı olmayan etkileşimler.

Sistemdeki her bir i 'nci atoma etki eden kuvvet, skaler potansiyel enerji fonksiyonunun negatif gradyanı ile hesaplanır (Denklem 2.8). Burada r_i , \vec{F} kuvvetinin uygulandığı noktanın koordinatlarını belirtir ve U , bu kuvvetin oluştuğu potansiyeli ifade eder.

$$\vec{F}(r_i) = -\vec{\nabla}U(r_i) \quad (2.8)$$

Sistemdeki atomların zamana bağlı konumları ise, Newton'un ikinci hareket yasasının her bir zaman adımı için çözülmesi ile belirlenir (Denklem 2.9) (Monasse vd., 2014). Bu denklemde \vec{F} , m kütleli atoma uygulanan kuvvet, \vec{a} 'da ivmedir ve aynı zamanda zamana göre konum değişiminin ikinci türevi ile de ifade edilir.

$$\vec{F}(r_i) = m\vec{a}_i = m \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (2.9)$$

Her bir atomun konumu yukarıdaki denklemlere göre hesaplandıktan sonra, yeni zaman adımları için aynı denklemler kullanılarak önce atomlara etkiyen yeni kuvvetler, sonra da atomların yeni konumları hesaplanır. Tüm bu zaman adımlarındaki değişimler bir MD simülasyonunun çıktılarını oluşturur ve sistemin dinamik davranışlarını ifade eder.

2.4.2 Kuvvet alanları

Gerçek moleküllerin hareket halindeki gerçek davranışını incelemek için yukarıda açıklanan enerji terimleri, kuantum mekanik hesaplamalara ve deneysel (örneğin spektroskopik) verilere uyacak şekilde parametrelendirilir. Böylelikle, kimyasal bağ ve atomik açıları tanımlayan yayların ideal sertlik ve uzunlukları, elektrostatik etkileşim enerjilerini hesaplamak için kullanılan en uygun kısmi atom yükleri, en doğru van der Waals atom yarıçapları ve bunlar gibi benzer parametrelerin belirlenmesi sağlanır. Bu parametrelerin tümü “kuvvet alanları (force fields)” olarak adlandırılır çünkü MD simülasyonlarını kontrol eden çeşitli atomik kuvvetlerin sisteme olan katkılarını tanımlarlar.

Literatürde şimdiye kadar geliştirilmiş birden çok kuvvet alanı bulunmaktadır. Bunlardan MD simlasyonlarında en yaygın olarak kullanılan kuvvet alanları AMBER (Cornell vd., 1995) (Wang, vd., 2004), CHARMM (Brooks vd., 2009), GROMOS (Bakowies vd., 2005) ve OPLS (Jorgensen vd., 1996) kuvvet alanlarıdır. Kuvvet alanlarının hepsi genel anlamıyla yukarıda açıklanan parametrelendirme işlemini gerçekleştirmek için çeşitli hesaplamalar kullanır ancak bazı temel farklara sahiptirler. Örneğin, kuvvet alanları genel anlamıyla atomları temsil etme durumlarına göre tüm-atom (all-atom) modeli ve birleşik-atom (united-atom) modelini kullanan kuvvet alanları olarak ikiye ayrılır. AMBER, CHARMM ve OPLS tüm-atom modelini

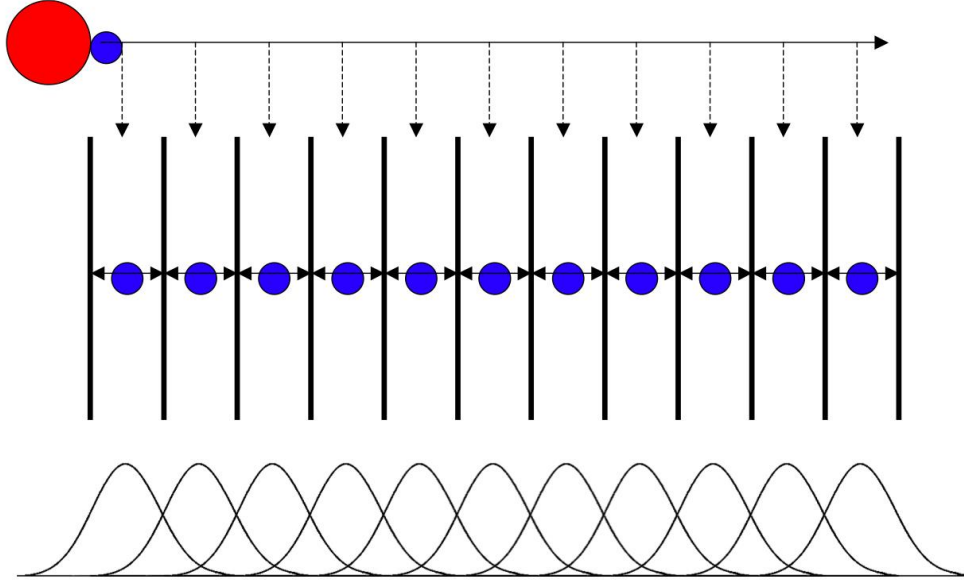
kullanarak hesaplamalar yaparken, GROMOS birleşik-atom modelini kullanarak hesaplama yapar. Bu iki atom-temsil modelinin arasındaki en önemli fark, tüm-atom modelini esas alan kuvvet alanlarının hidrojenler dahil olmak üzere sistemdeki her türlü atom için, birleşik-atom modelini kullanan kuvvet alanlarının ise alifatik hidrojenleri ve karbon atomlarını tek bir metil grubu olarak kabul ederek bunun için parametreler sağlamasıdır. Birleşik-atom modeli, hem serbestlik derecelerini azalttığından hem de sistemdeki atom sayısını kayda değer bir şekilde düşürdüğünden özellikle büyük sistemler için hesaplamaları hızlandırır ve simülasyon süresini kısaltır (Lemkul vd., 2010). Bu durum literatürdeki bazı kaynaklarda simülasyonun yeterliliği açısından bir dezavantaj olarak kabul edilse de (T. T. Nguyen vd., 2011), sistemin özelliğine göre kuvvet alanlarının etkisi çok değişkendir ve ancak sisteme özgü olarak anlamlandırılabilir.

Literatürde bu kuvvet alanlarının hangisinin/hangilerinin daha iyi olduğuna ilişkin çalışmalar mevcuttur (Ponder vd., 2003) (Martin, 2006) (P. H. Nguyen vd., 2011). Genel sonuç ise tek bir kuvvet alanının her zaman her koşulda diğerlerinden daha iyi bir sonuç vermeyeceğidir. Her biyolojik sistemin kendine özgü farklılıkları vardır ve bu nedenle farklı sistemlerin deneysel verilerle en uyumlu sonuçlarının farklı kuvvet alanları ile sağlanabilmesi mümkündür. Bu nedenle, MD simülasyonlarında en doğru sonuca ulaşabilmek ve gerçek hayata yakınsayabilmek için, farklı parametrelerle mümkün olduğu kadar fazla deney yapılarak kullanılan sistem için en uygun simülasyon durumu belirlenmelidir. Bu tez kapsamında farklı kuvvet alanları başta olmak üzere, sistemdeki basınç, sıcaklık, yük durumu değişikliklerinin de sonuçlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2.4.3 Şemsiye örnekleme (umbrella sampling) yöntemi

MD simülasyonlarının genel amacı, ilgilenilen molekülün termodinamik olarak mevcut olabileceği tüm muhtemel durumları örneklemeaktır. Ancak sıklıkla, molekülün bu termodinamik durumları, birbirlerinden yüksek enerji bariyerleri ile ayrılır (Johannes, 2011). Enerji bariyerlerinin aşılabilmesi, MD simülasyonlarında karşılaşılan önemli problemlerden biridir. Şemsiye örnekleme ile, bu enerji bariyerleri arasındaki alan düzleştirilerek aralarındaki farkın mümkün olduğu kadar azaltılması amaçlanır. Bu da, bir termodinamik durumdan diğerine geçişte ek bir harmonik potansiyelin kullanılması ile mümkündür. Böylelikle hem bariyerler

arasındaki geçiş yumuşatılır, hem de simülasyon hızlandırılmış olur. Bu geçişler reaksiyon koordinatı (ligandın çekilme yönü) boyunca örneklenerek (Şekil 2.11) ortalama kuvvet potansiyeli (PMF - Potential of Mean Force) elde edilir ve PMF eğrisinden ligandın serbest bağlanma enerjisi hesaplanır.



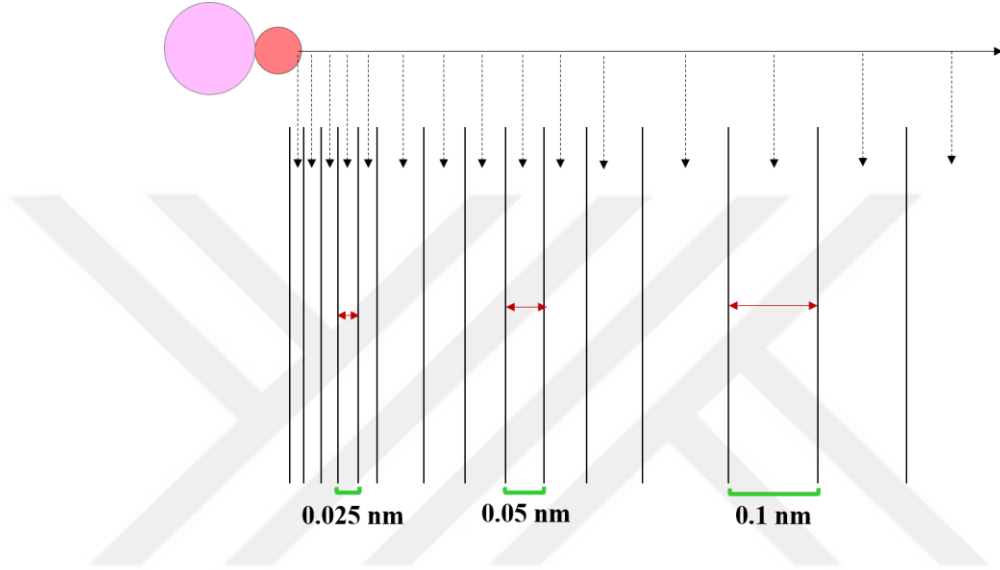
Şekil 2.11: Reaksiyon koordinatı boyunca örnekleme gösterimi (Url-7).

Eklenen harmonik potansiyelin sonuca olan etkisini minimize etmek amacıyla Ağırlıklı Histogram Analiz Metodu (WHAM) kullanılır (Rosenberg, 1992) ve ek potansiyel sistemden çıkarılır.

2.4.4 Simülasyon sisteminin kurulması, akışı ve MD parametreleri

MD simülasyonlarında parametrelerin uygun şekilde belirlenmesi bu çalışmaların en zor ve zaman alıcı aşamasıdır. Her biyolojik sistemin kendine özgü bir yapısı olduğundan, doğru MD parametrelerinin de bu sistemlere özgün olarak kullanılması önem taşımaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında gerçekleştirilen şemsiye örnekleme çalışmalarını sisteme özgü ve mümkün olan en uygun şekilde gerçekleştirebilmek için çeşitli parametre ve durumların optimizasyonu yapılmıştır. Bu doğrultuda, ligandın yük durumu ve topolojisi, kullanılan su modeli, şemsiye örnekleme aralığı, pozisyon kısıtlaması, sıcaklık ve basınç grupları ve toplam simülasyon süresi dikkate alınarak sistemin uygun bir zaman aralığında doğru şekilde simüle edilmesi sağlanmıştır. Örneğin, şemsiye örnekleme yönteminde OTV'nin aktif bölgeden çekilmesi, öncelikle OTV için sterik engel oluşturan girintili-çıkıntılı bölgenin aşılması

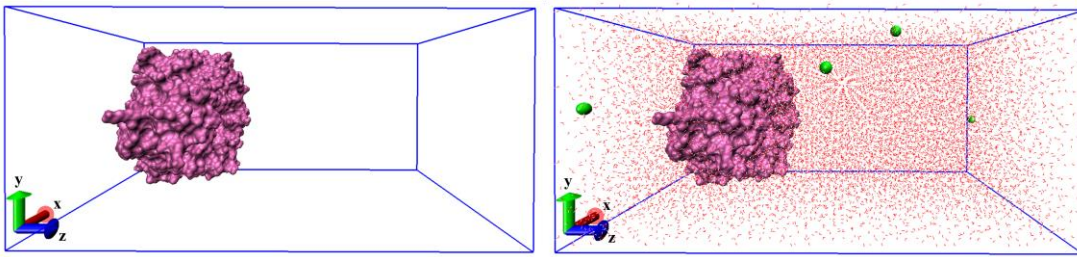
problemini beraberinde getirir. Yani, bağlanma enerjisinin doğru tespit edilmesi, OTV'nin bu bölgeden koparılması sırasında protein üzerindeki herhangi bir rezidüye takılmadan çıkması ile mümkündür. Bu nedenle, tezde kullanılan 5nm'lik COM mesafesinde özellikle ilk 1 nm'nin detaylı simüle edilmesi çok önemlidir ve sonucun kesinliği açısından daha net bilgi sağlar. Tez çalışmasında ilk 1 nm'ye kadar örnekleme aralığı 0.025 nm, 1-2 nm aralığında 0.5 nm ve geri kalan kısım için 0.1 nm olarak kullanılmış ve Şekil 2.12'de temsilen gösterilmiştir.



Şekil 2.12: Şemsiye örnekleme simülasyonlarında kullanılan örnekleme aralıklarının gösterimi (Açık pembe daire: NA, koyu pembe daire: OTV).

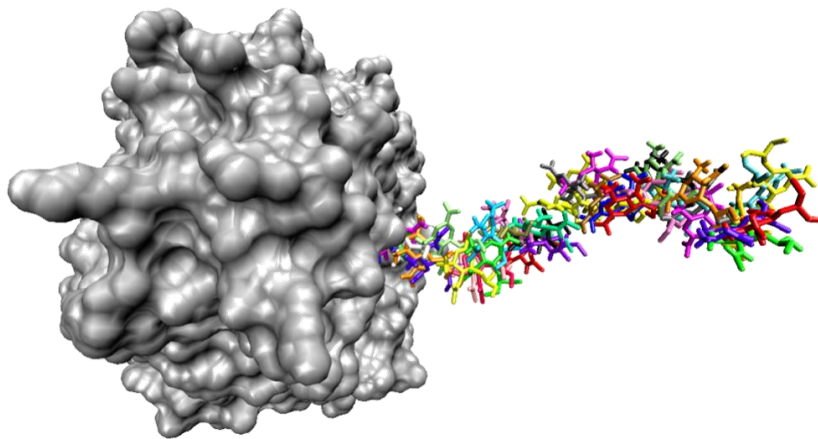
Örnekleme aralıklarının doğru kullanılmasının kontrolü deneyler sonucunda elde edilen histogramlar ile yapılır. Reaksiyon koordinatı boyunca elde edilen histogramların başlangıç ve bitişleri en az %5 oranında örtüşüyorsa, örnekleme pencereleri doğru belirlenmiş demektir. Tezde yapılan deneyler sonucunda elde edilen histogramlar da örnekleme aralığı seçiminin doğruluğunu güçlendirmiştir. Bunun dışında bir örnek de kullanılan su modeli için verilebilir. Literatürde yapılan bir çalışmaya göre (T. T. Nguyen, vd., 2014), AMBER kuvvet alanı için en uygun su modeli TIP3P, GROMOS ve CHARMM için SPC ve OPLS için TIP4P'dir. Tezde yapılan çalışmalarda da su modelleri, her bir kuvvet alanı için uygun olan su modeli seçilerek gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde farklı parametrelerin bu sisteme özel olarak en uygun değerleri ve durumları seçilmiş ve simülasyonlar bu şekilde gerçekleştirilmiştir.

Şemsiye örnekleme simülasyonlarında holo NA yapıları kullanılmış ve reaksiyon koordinatı z eksenini seçildiğinden, öncelikle OTV'nin bulunduğu aktif bölge pozitif z eksenini yönünde konumlandırılmıştır. Daha sonra ligand için kullanılan kuvvet alanına uygun topoloji dosyası oluşturulmuştur (GROMOS kuvvet alanı için PRODRG (Schu, 2004), AMBER için ACEPYPE (Sousa Da Silva vd., 2012) ve CHARMM için CGenFF (Vanommeslaeghe vd., 2012)). NA için de gerekli topoloji ve girdi dosyaları oluşturulduktan sonra yapı 7 x 6 x 13 nm boyutlarındaki periyodik kutu içerisine yerleştirilmiştir. Kutu içerisine çözelti olarak su molekülleri ve sistemin yüküne göre 4 adet sodyum (Na^+) iyonu eklenmiştir (Şekil 2.13).



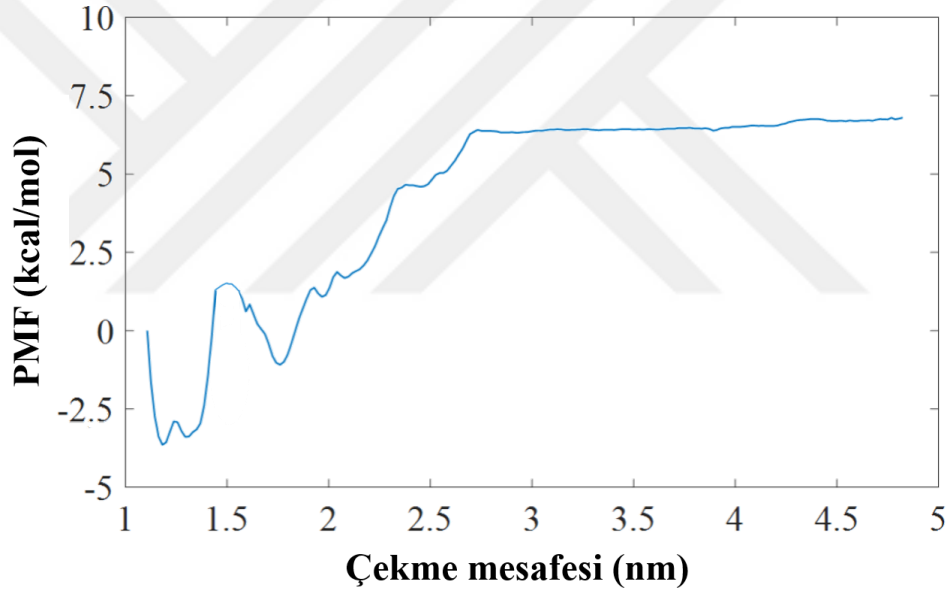
Şekil 2.13: Periyodik kutunun tanımlanması, çözelti ve iyonların eklenmesi.

Bu aşamadan sonra sırasıyla minimizasyon ve NPT (Partikül sayısı, basınç ve sıcaklık) dengeleme adımları yapılmıştır. Sıcaklık eşleşme grupları için 300 K'de V-rescale algoritması, basınç için ise Berendsen algoritması kullanılmıştır (Bussi vd., 2007)(Berendsen vd., 1984). Daha sonra 1 ns'lik çekme simülasyonu yapılmış ve OTV, NA'dan minimum enerjili esnek yolak üzerinden uzaklaştırılmıştır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: OTV'nin z eksenini yönünde 1 ns çekme simülasyonu sonucundaki yapılarının bir kısmı.

Bu simülasyon sonucunda, her bir zaman adımı için NA'dan uzaklaştırılan OTV yapılarının kütle merkezleri (COM) ölçülmüştür. Bu konumların NA'nın COM'u ile aralarındaki uzaklık hesaplanarak, örnekleme aralıkları oluşturulmuş ve bu şekilde yaklaşık 60 pencere simülasyonlar için hazır duruma getirilmiştir. Bu pencereler için ayrıca NPT dengeleme aşaması gerçekleştirilmiş ve son olarak da her biri için 5 ns MD simülasyonları yapılmıştır. Bu simülasyonlarda sıcaklık eşleşme grupları için 300 K'de Nose-Hoover algoritması, basınç için ise Parinello-Rahman algoritması kullanılmıştır (Bussi vd., 2007). Simülasyonlar sonucunda elde edilen PMF eğrilerinden ise bağlanma enerjileri iki yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. İlk yöntemde bağlanma enerjisi değerleri PMF eğrisinin maksimum ve minimum noktaları arasındaki fark hesaplanarak elde edilmiştir. Şekil 2.15'te örnek bir PMF eğrisi verilmiştir.



Şekil 2.15: Örnek PMF eğrisi.

Bağlanma enerjisinin PMF eğrisinden elde edilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise integrasyon yöntemidir. Denklem 2.10'da gösterildiği gibi öncelikle PMF ($W(z)$), reaksiyon koordinatı (z yönü) boyunca integre edilerek bağlanma sabiti hesaplanır. Burada πR^2 bağlanma bölgesinin ortalama kesit alanı, k_B Boltzmann sabiti ve T Kelvin cinsinden sıcaklıktır (Chen ve Kuyucak, 2011).

PMF eğrileri maksimum noktaları 0'a denk gelecek şekilde ötelenmiştir. İntegrasyon işlemi her bir PMF eğrisinin minimum değeri ile plato bölgesine kadar olan aralıkta

gerçekleştirilmiştir. NA bağlanma bölgesi için ortalama kesit alanı hesabında R değeri 7.5 Angstrom alınmıştır.

$$K_b = \pi R^2 \int_{z_1}^{z_2} e^{-W(z)/k_B T} dz \quad (2.10)$$

Daha sonra Denklem 2.11 kullanılarak bağlanma sabitinden bağlanma enerjisi elde edilir. Bu denklemde C_0 standart konsantrasyon olup 1 M 'dir.

$$\Delta G^o = -k_B T \ln(K_b C_0) \quad (2.11)$$

Bağlanma enerjisi değerleri her iki yöntemle de hesaplanmış ve ilk yöntem ile hesaplanan ΔG değerleri ΔG_1 , ikinci yöntem ile hesaplanan ΔG değerleri ise ΔG_2 olarak bir sonraki bölümde verilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

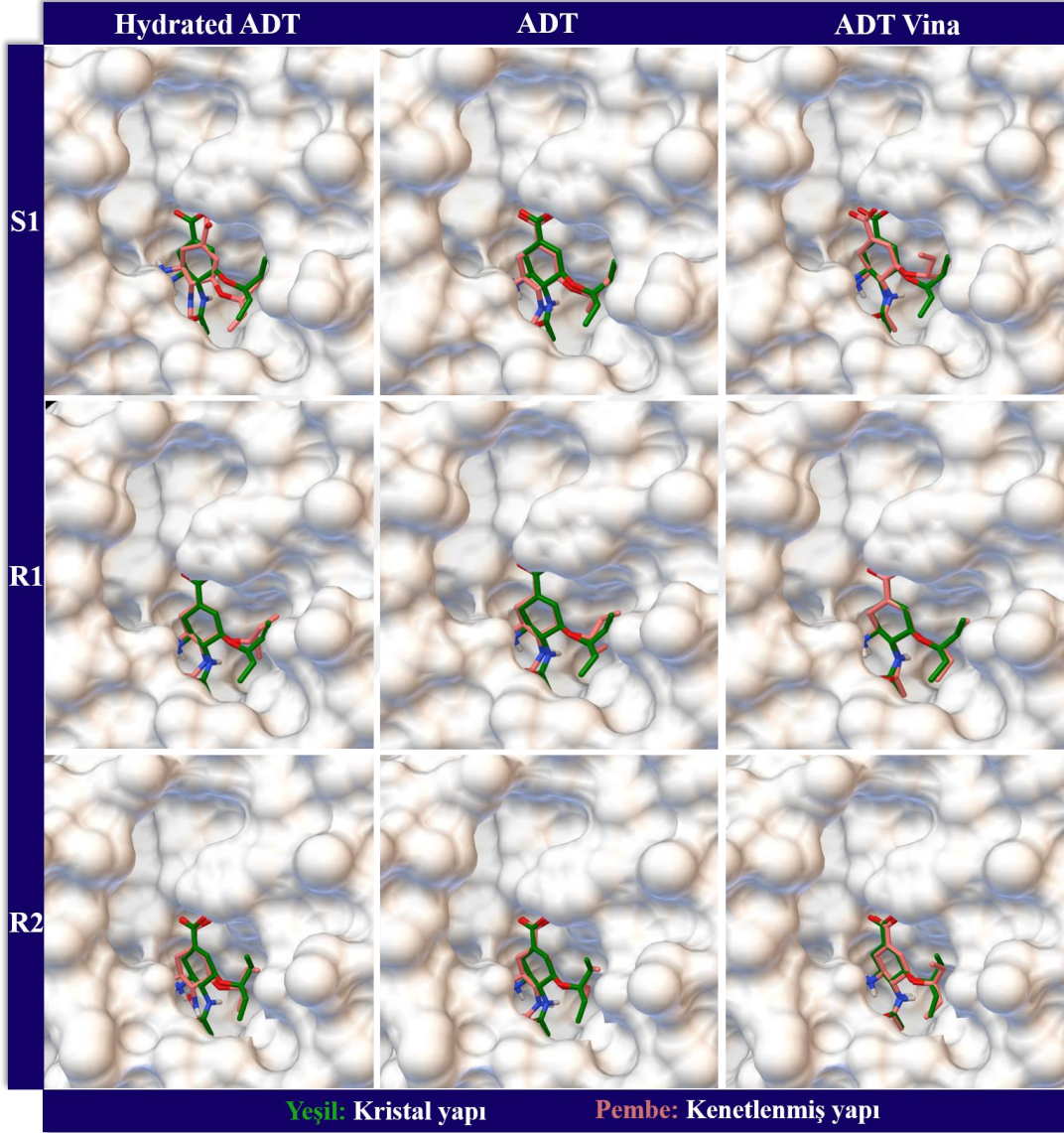
3.1 Moleküler Kenetleme ile NA-OTV Etkileşimlerinin Analizi

Bölüm 3.3'te açıklandığı gibi moleküler kenetleme yaklaşımı, ligandların hedef makromoleküllere olan bağlanma enerjilerini hesaplamının yanı sıra, ikisi arasındaki etkileşimleri atomik seviyede modellemek için kullanılır. Bu anlamda en önemli kullanım alanlarından biri ligand konformasyonunun öngörülmesi, yani bağlanma bölgesinde ligandın geometrisi, pozisyon ve oryantasyonunun belirlenmesidir. Özellikle kristal yapısı bilinmeyen sistemler için ligandın makromolekül üzerindeki başlangıç konformasyonunun belirlenmesinde moleküler kenetleme çalışmaları büyük önem taşımaktadır (M. Cui vd., 2011). Böylece, kenetleme çalışmaları sonrasında sistemin en kararlı yapısını elde edebilmek için gerçekleştirilecek MD simülasyonları için uygun başlangıç konfigürasyonları da elde edilmiş olur.

Bu amaç doğrultusunda, bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi moleküler kenetleme deneyleri üç farklı yazılım paketi ile gerçekleştirilmiş ve öncelikle S1, R1 ve R2 kristal yapılarının her biri için kenetleme deneyleri yapılmıştır. Bu bölümde S2 yapısının kullanılmamasının nedeni PDB'de kristal yapısının olmaması ve bu nedenle OTV konformasyonu ve etkileşimlerinin deneysel anlamda bilinmemesidir. S2 yapısı ile karşılaştırılmaların yapılması için ayrıca deney setleri hazırlanmıştır ve ilerleyen bölümlerde bahsedilecektir. OTV'nin S1, R1 ve R2 yapılarına bağlanma konformasyonları Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Yeşil konformasyonlar deneysel olarak NA'ya bağlandığı tespit edilmiş kristal OTV yapılarını temsil etmektedir. Pembe yapılar ise kenetleme sonucunda belirlenen OTV yapılarıdır.

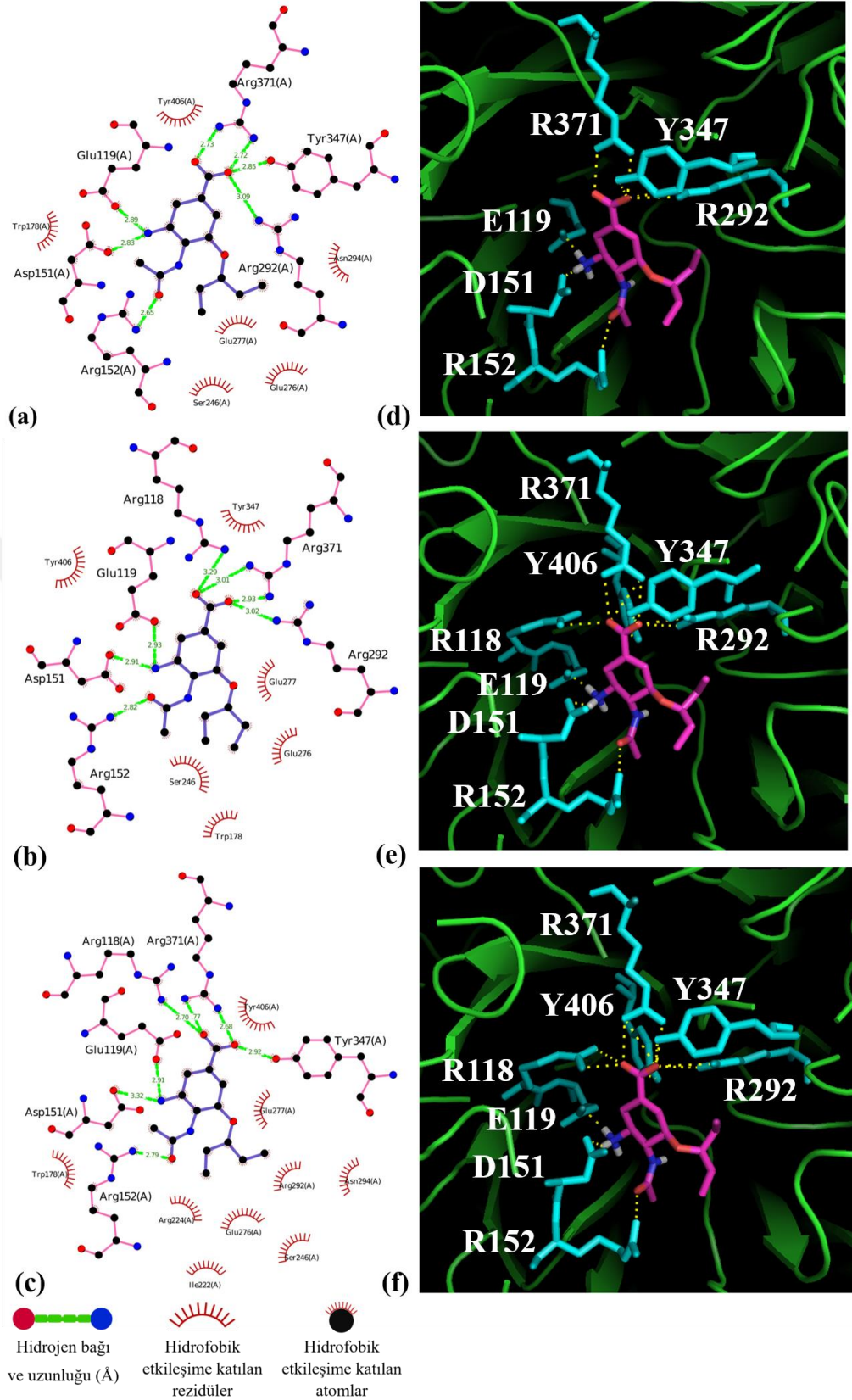
OTV konformasyonunun doğru tespit edilmesi, beraberinde NA ile yaptığı bağların da tespit edilip edilemediği sorusunu getirir. Kenetleme deneyleri ile OTV konformasyonunun yanı sıra, ligandın makromolekülde hangi atomlara ne tür etkileşimler ile bağlandığı da tespit edilebilir. Bu kısımda, S1, R1 ve R2 kristal NA

yapılarının OTV ile yaptıkları bağlar incelenecektir. Kristal S1-OTV etkileşimleri hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler dahil olmak üzere toplam 12, R1-OTV etkileşimleri toplam 12 ve R2-OTV etkileşimleri toplam 15 rezidünün katılımı ile sağlanır.



Şekil 3.1: OTV'nin S1, R1 ve R2 yapılarına bağlanma konformasyonları.

Bu etkileşimler Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Etkileşimlerin tespiti için LigPlot (Wallace vd., 1995), üç boyutlu yapı üzerinde gösterimi için de Pymol 1.7.4.5 yazılımları kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Kristal S1-OTV (a) kristal R1-OTV (b) ve kristal R2-OTV etkileşimleri (c) ve sırasıyla üç boyutlu gösterimleri (d) (e) (f).

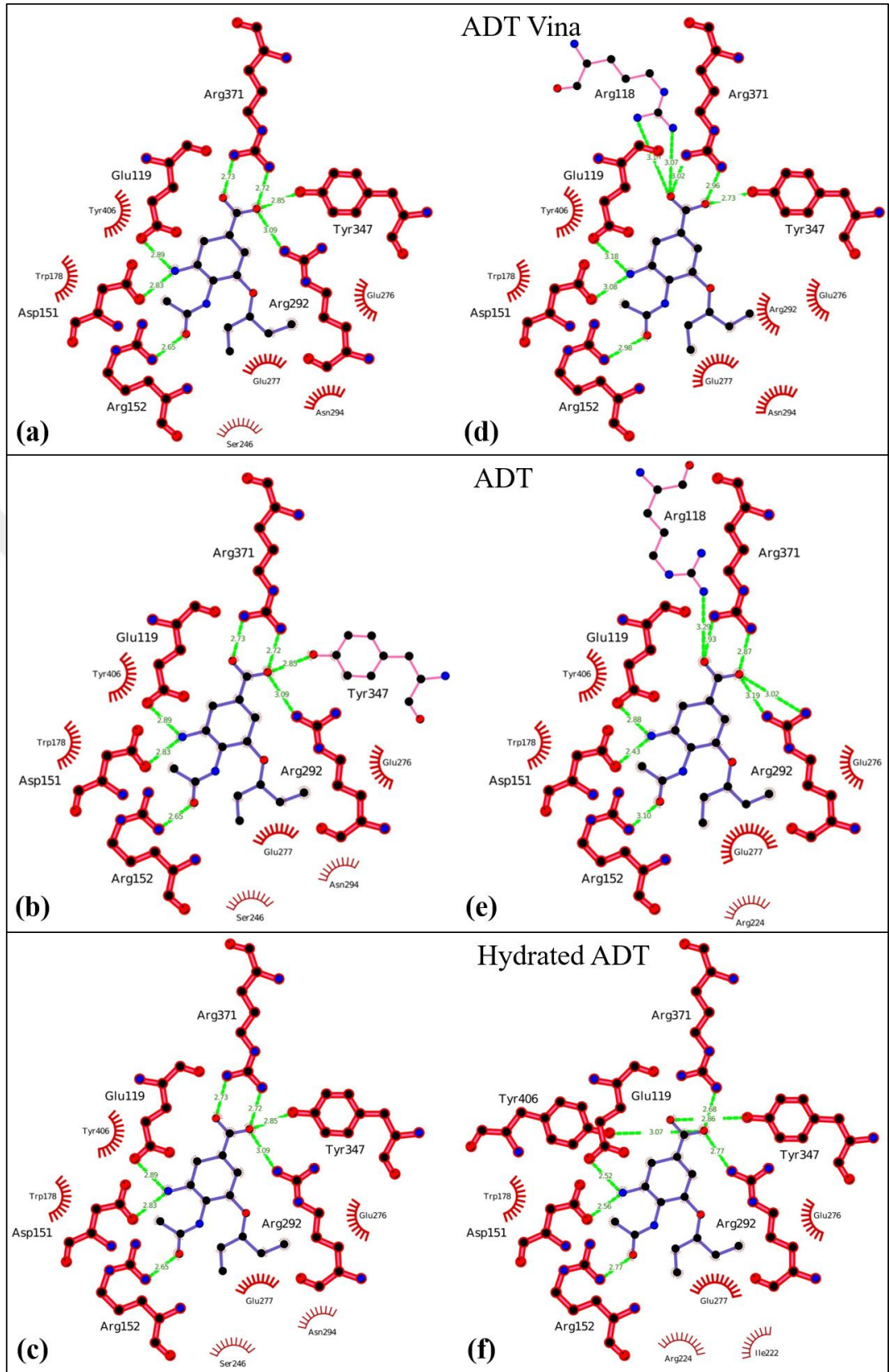
Kenetleme deneyleri sonucunda elde edilen etkileşimlerin tespitinde kenetleme yönteminin başarısını ölçmek için Denklem 3.1’de gösterilen eşitlik oluşturulmuş ve kullanılmıştır. Burada η %, kenetleme sonucunda ligandın etkileşim halinde olduğu amino asitleri tahmin başarısını, α gerçek etkileşimler ile kenetleme etkileşimlerinin ortak rezidü sayısını, β ise gerçek etkileşimlerdeki rezidü sayısını belirtmektedir.

$$\eta\% = \frac{\alpha}{\beta} \times 100 \quad (3.1)$$

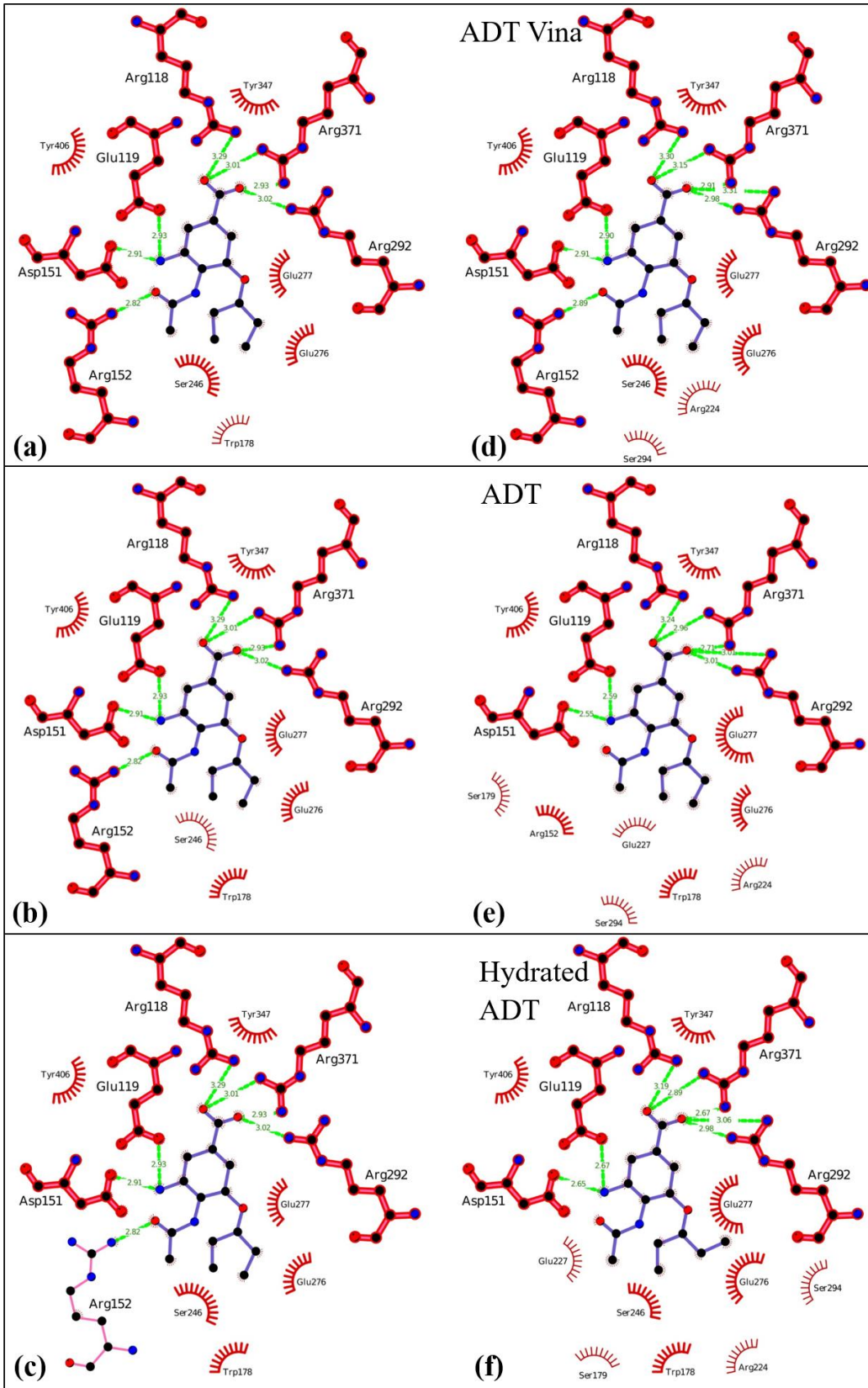
S1, R1 ve R2 için β değerleri sırasıyla 12, 12 ve 15’tir. S1 yapısına kenetlenen OTV’nin bu yapı ile olan etkileşimleri Şekil 3.3’te gösterilmiştir. Etkileşimlere katılan ortak rezidüer kırmızı renk ile vurgulanmıştır. Burada (a), (b) ve (c)’de gösterilen etkileşimler S1 yapısının OTV ile yaptığı gerçek etkileşimleri ifade eder. (d), (e) ve (f)’de gösterilen etkileşimler ise sırasıyla ADT Vina, ADT ve Hydrated ADT ile bulunan etkileşimleri göstermektedir. ADT Vina sonucuna göre ortak rezidü sayısı olan α değeri 11, ADT’ye göre 9 ve Hydrated ADT’ye göre 10’dur. Bu değerlere göre η % sırasıyla, %91.66, %75 ve %83.33 olarak hesaplanmıştır.

R1 yapısına kenetlenen OTV’nin bu yapı ile olan etkileşimleri Şekil 3.4’te gösterilmiştir. Etkileşimlere katılan ortak rezidüer kırmızı renk ile vurgulanmıştır. Burada (a), (b) ve (c)’de gösterilen etkileşimler R1 yapısının OTV ile yaptığı gerçek etkileşimleri ifade eder. (d), (e) ve (f)’de gösterilen etkileşimler yine sırasıyla ADT Vina, ADT ve Hydrated ADT sonucunda bulunan etkileşimleri göstermektedir. Buna göre α değerleri tüm kenetleme sonuçlarının her biri için 11 olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre R1-OTV etkileşimleri kenetleme sonucunda %91.66’lık bir başarı oranı ile tespit edilebilmiştir.

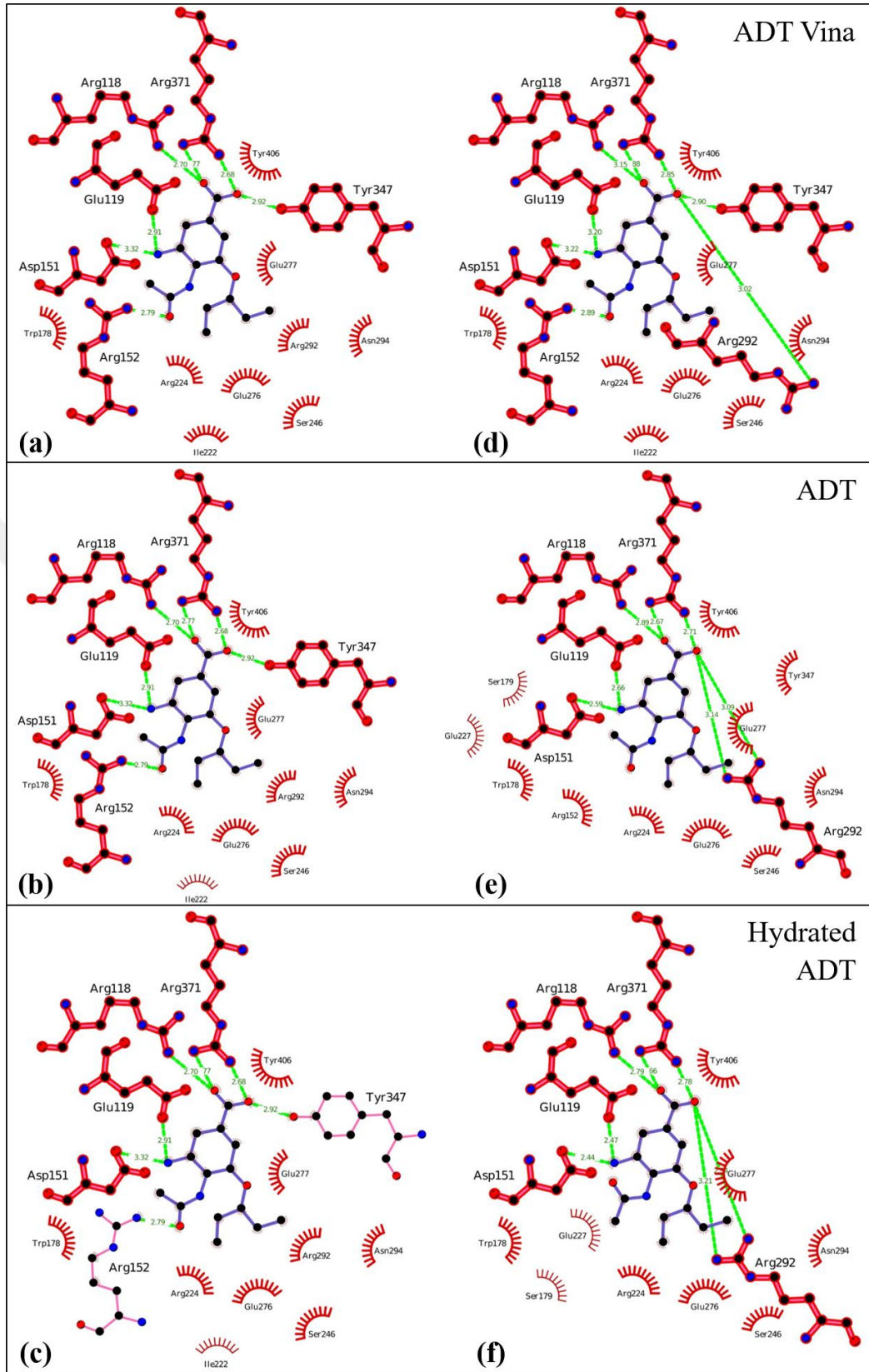
R2 yapısına kenetlenen OTV’nin bu yapı ile olan etkileşimleri Şekil 3.5’te gösterilmiştir. Etkileşimlere katılan ortak rezidüer kırmızı renk ile vurgulanmıştır. Burada (a), (b) ve (c)’de gösterilen etkileşimler R2 yapısının OTV ile yaptığı gerçek etkileşimleri ifade eder. (d), (e) ve (f)’de gösterilen etkileşimler ise yine ADT Vina, ADT ve Hydrated ADT ile bulunan etkileşimleri göstermektedir. ADT Vina sonucuna göre α değeri 15, ADT’ye göre 14 ve Hydrated ADT’ye göre 12’dır. Bu değerlere göre η % sırasıyla, %100, %93.33 ve %80’dır.



Şekil 3.3: Kristal S1-OTV (a) (b) (c) etkileşimleri ile sırasıyla ADT Vina (d), ADT (e) ve Hydrated ADT (f) ile bulunan S1-OTV etkileşimlerinin karşılaştırılması.



Şekil 3.4: Kristal R1-OTV (a) (b) (c) etkileşimleri ile sırasıyla ADT Vina (d), ADT (e) ve Hydrated ADT (f) ile bulunan R1-OTV etkileşimlerinin karşılaştırılması.



Şekil 3.5: Kristal R2-OTV (a) (b) (c) etkileşimleri ile sırasıyla ADT Vina (d), ADT (e) ve Hydrated ADT (f) ile bulunan R2-OTV etkileşimlerinin karşılaştırılması.

Etkileşim analizlerine göre, her bir kenetleme türünün başarısını tespit edebilmek için ortalamalar alındığında ADT Vina'nın %94.44, ADT'nin %86.66 ve Hydrated ADT'nin %84.99 başarı oranı ile OTV'nin NA ile yaptığı etkileşimleri tespit edebildiği görülmektedir. Standart sapma değerleri ise sırasıyla 4.81, 10.13, 6.00'dır. Bu sonuçlara göre ADT Vina, diğer kenetleme yöntemlerine göre etkileşimlerin tahmini anlamında daha başarılıdır. Bunun sebebinin, Vina'nın kullandığı bilgi-tabanlı skorlama algoritmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu sonuçlar konformasyon sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, her bir kenetleme yönteminin de ligandın bağlandığı bölge, bu bölge içerisindeki yönelimi, pozisyon ve geometrisi açısından başarılı sonuçlar verdiği çıkarılabilir. Eldeki sistemin analizinde hesaplama süresi de göz önüne alındığında ise, ADT Vina en iyi seçim olarak belirlenmiştir.

Bu bilgilere göre, moleküler kenetlemenin ligandın makromolekül ile olan etkileşimlerinin doğru olarak belirlenmesinde önemli bir bilgi sağladığı çıkarılabilir. Özellikle, makromolekülün kristal yapısının bilindiği durumlarda gerçekleştirilen SBDD çalışmalarında, olası ligand moleküllerinin doğru belirlenebilmesi açısından bu bilgi büyük önem taşımaktadır.

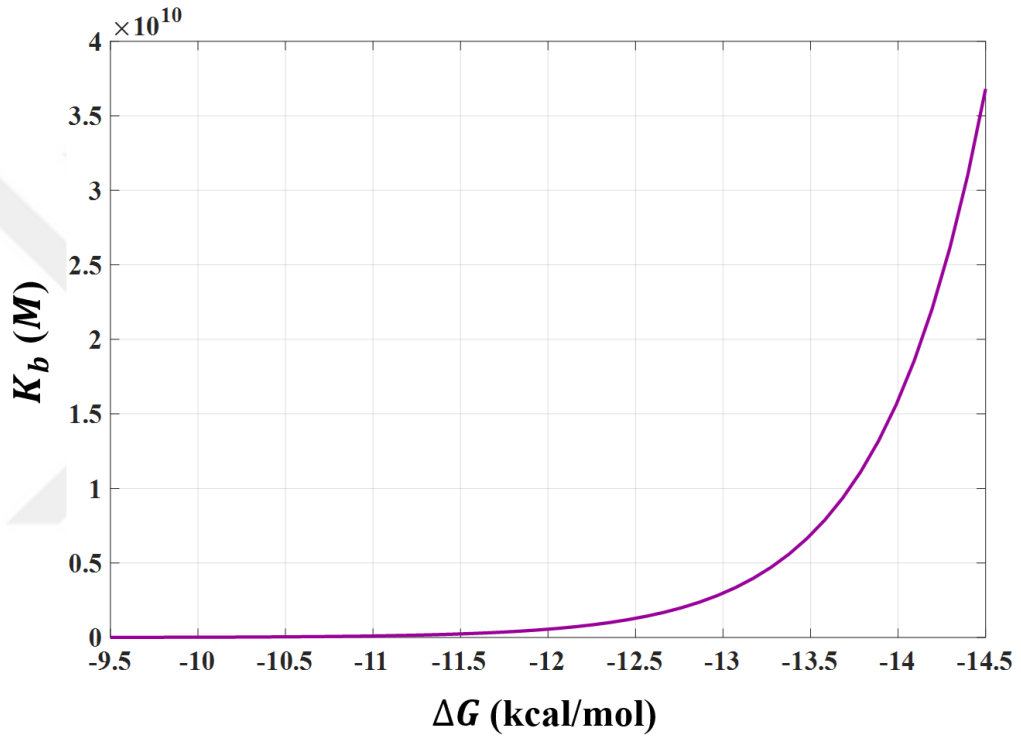
3.2 Oseltamivir Bağlanma Enerjisi Hesaplamaları

Protein-ligand bağlanmasında, ligand genellikle hedef protein üzerindeki bir bölgeye bağlanarak biyolojik bir sinyal üretilmesini sağlayan moleküldür. Ligandın proteine bağlanması, iyonik bağlar, hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi moleküller arası etkileşimler ile meydana gelir.

DeneySEL olarak yapılan çalışmalara göre, tezde kullanılan dört NA yapısı belirli molarlar ile OTV'ye maruz bırakılmış ve OTV'nin bu yapılara olan bağlanma affiniteleri ölçülmüştür (Collins vd., 2008). Ölçülen K_b değerlerinden ise ligandın ΔG bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. ΔG değeri görece ne kadar negatif ise, ligandın proteine olan bağlanma affinitesi o kadar yüksektir. OTV bağlanma enerjilerinin deneysel değerleri S2 için -14.50 kcal/mol, S1 için -13.12 kcal/mol, R1 için -10.48 kcal/mol ve R2 için -9.77 kcal/mol'dür (T. T. Nguyen vd., 2011). Denklem 2.3'e göre, bağlanma sabiti K_b ligandın bağlanma affinitesi ile doğru orantılıdır, yani K_b ne kadar yüksekse OTV bağlanma affinitesi de o kadar yüksektir. Denklem 2.4'e göre, K_b 'den

ΔG bağlanma enerjisine geçişin logaritmik olduğu görülmektedir. ΔG bağlanma enerjisindeki 2-3 kcal/mol'lük bir değişim bile, K_b sabitinde 100 katlık bir değişime neden olmaktadır.

Bu nedenle mutant ve mutant olmayan yapıların ayırt edilmesinde ΔG 'deki değişimler büyük önem taşımaktadır. ΔG ve K_b arasındaki bu ilişki Denklem 2.4 kullanılarak yukarıdaki OTV bağlanma enerjileri aralığında Şekil 3.6'da grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3.6: ΔG ve K_b arasındaki logaritmik ilişki.

Tezin bu bölümünde, OTV bağlanma enerjisi hesaplamaları hem kenetleme hem de şemsiye örnekleme simülasyonları ile hesaplanmış ve analizler yapılmıştır. Amaç, SBDD yöntemlerini kullanarak OTV'ye karşı direnç gösteren ve göstermeyen yapıların doğru bir şekilde belirlenebilmesidir.

Böylelikle antiviral ilaç direnci kazanan yeni viral yapılar önceden tespit edilebilir, var olan ilaçların bu yapılara karşı etkinlikleri belirlenebilir ve kimyasal kütüphanelerde bu yapıları inhibe edebilecek yeni bileşenler bulunabilir.

3.2.1 Moleküler kenetleme ile bağlanma enerjilerinin hesaplanması

Oseltamivirin S2, S1, R1 ve R2 yapılarına bağlanma enerjileri moleküler kenetleme kullanılarak hesaplanmış ve bulunan değerler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. S2 kristal yapısı bulunmadığından bu yapı için çizelgede I-TASSER ve Mutagenesis ile elde edilen yapılar üzerinden gerçekleştirilen hesaplamalar verilmiştir. Diğer yapıların PDB’de kristal yapıları olduğundan, bunların kenetleme sonuçları da ayrı bir kolonda gösterilmiştir.

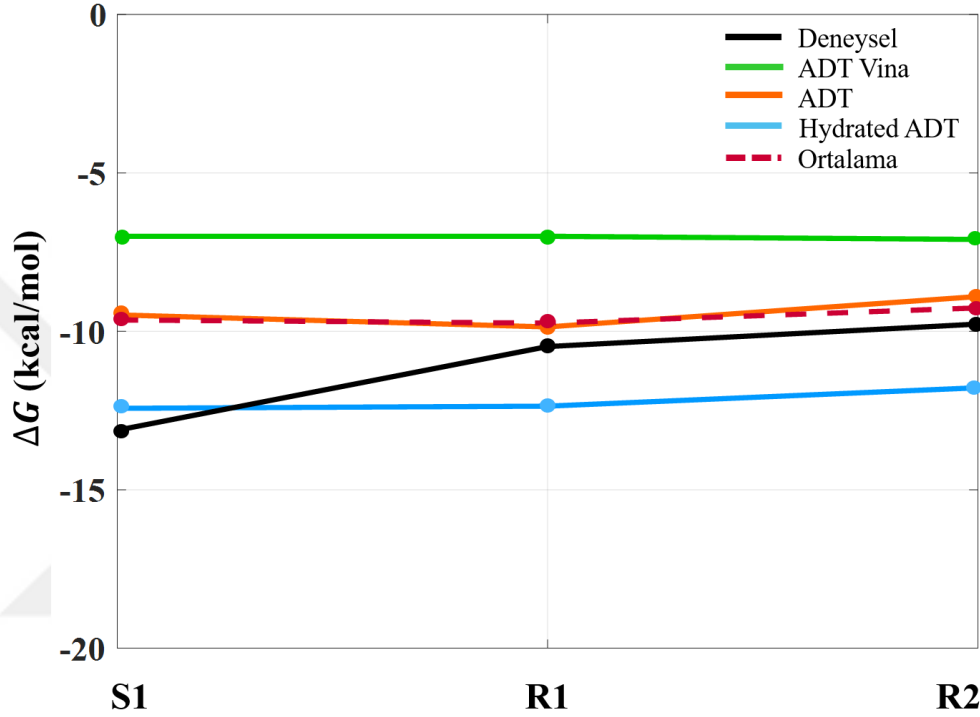
Çizelge 4.1: S2, S1, R1 ve R2’nin farklı yapılarına moleküler kenetleme ile bağlanmış OTV’nin farklı kenetleme yazılımları ile hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.

	ΔG Bağlanma Enerjisi Değeri (kcal/mol)										
	S2		S1			R1			R2		
	I-tasser	Mut.	Kristal	I-tasser	Mut.	Kristal	I-tasser	Mut.	Kristal	I-tasser	Mut.
Hyd. AutoDock	-9.70	-12.49	-12.43	-8.95	-12.39	-12.36	-9.26	-11.91	-11.78	-9.33	-12.34
AutoDock	-6.30	-9.65	-9.48	-6.05	-9.60	-9.86	-6.04	-9.23	-8.90	-6.63	-9.92
AutoDock Vina	-6.2	-6.9	-7.0	-6.4	-6.9	-7.0	-6.3	-7.0	-7.1	-6.5	-7.0
Deneysel	-14.50		-13.12			-10.48			-9.77		

Kenetleme sonucunda bulunan bağlanma enerjilerinin birbirleri ile ve deneysel değerler ile karşılaştırmaları yapılmıştır. Deneysel verilere göre, S1, R1 ve R2 kristal yapıları için bağlanma eğilimi, OTV bağlanma affinitesi yüksek olandan düşük olana doğru S1, R1 ve R2’dir. Ancak, ilk olarak ADT Vina sonuçları incelendiğinde, OTV bağlanma enerjilerinin sırasıyla -7.0 kcal/mol, -7.0 kcal/mol ve -7.1 kcal/mol olduğu görülmektedir. ΔG değerlerindeki bu fark göz önüne alındığında, mutant olmayan S1 ve mutant R1 ve R2 yapılarının mutajenitelerinin birbirinden ayırt edilemediği sonucu çıkarılabilir. ADT sonuçları incelendiğinde ise bağlanma enerjilerinin sırasıyla -9.48 kcal/mol, -9.86 kcal/mol ve -8.9 kcal/mol olduğu görülür. Benzer bir şekilde, ADT ile yapılan moleküler kenetleme sonucunda oseltamivirin S1 ve R1 yapılarına çok yakın ΔG değerleri ile bağlandığı sonucu çıkmaktadır. Ek olarak, oseltamivirin R1 yapısına S1 yapısından daha iyi bağlandığı görülmektedir. Bu nedenle ADT moleküler kenetleme yöntemi ile de gerçek hayattaki bağlanma eğilimi gözlemlenememiştir. Hydrated ADT sonuçlarının ise sırasıyla -12.43 kcal/mol, -12.36 kcal/mol ve -11.78 kcal/mol olduğu görülmektedir. Bu sonuca göre, enerjiler arasındaki fark beklenen

kadar yüksek olmasa da bağlanma eğilimi S1, R1 ve R2'dir. Yani, Hydrated ADT ile OTV bağlanma eğilimi beklenen şekilde görülmektedir.

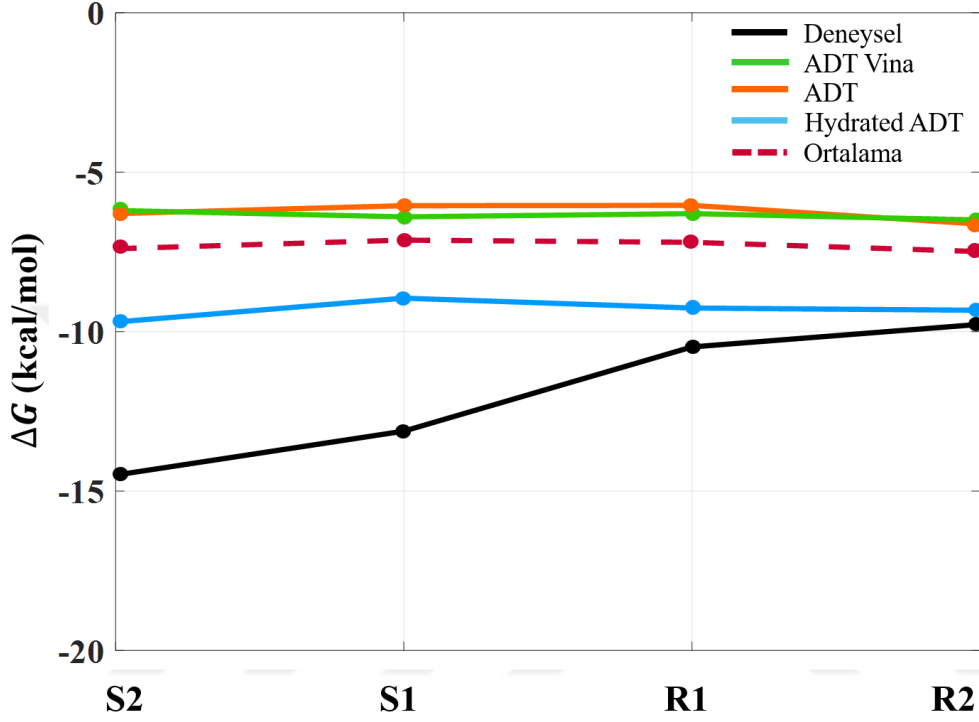
S1, R1 ve R2 kristal yapıları için ΔG değerlerinin karşılaştırmaları Şekil 3.7'de grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafikte deneysel değerler siyah, ADT Vina değerleri yeşil, ADT değerleri turuncu ve Hydrated ADT değerleri mavi renk ile, bu üç kenetleme sonucunun ortalamaları ise kesikli bordo çizgi ile gösterilmiştir.



Şekil 3.7: S1, R1 ve R2'nin kristal yapılarına kenetlenen oseltamivirin bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması.

Kristal yapısı elde edilmemiş (PDB'de bulunmayan) protein yapıları tezin 3.2. bölümünde anlatıldığı gibi homoloji modellemesi yöntemi ile bu proteinlerin homologları taslak alınarak oluşturulur. Proteinlerde kristal yapı tayini deneysel olarak oldukça zor ve pahalı bir yöntemdir. 2019 Haziran ayı itibarıyla UniProt veritabanında dünyada günümüze kadar keşfedilmiş toplam 158,817,814 adet protein bulunmaktadır (Consortium, 2019). Bu sayı göz önüne alındığında, tüm proteinlerin kristal yapısını elde edebilmenin mümkün olmadığı oldukça açıktır. Bu nedenle, yapısı bilinmeyen proteinleri modelleyerek çalışmaların gerçekleştirilmesi bu anlamda önem taşımaktadır. Bu amaç doğrultusunda, S2, S1, R1 ve R2 yapılarının homoloji modellemesi ile elde edilmiş yapıları üzerinde moleküler kenetleme deneyleri gerçekleştirilmiştir. ΔG değerleri ADT Vina için sırasıyla -6.2 kcal/mol, -6.4 kcal/mol,

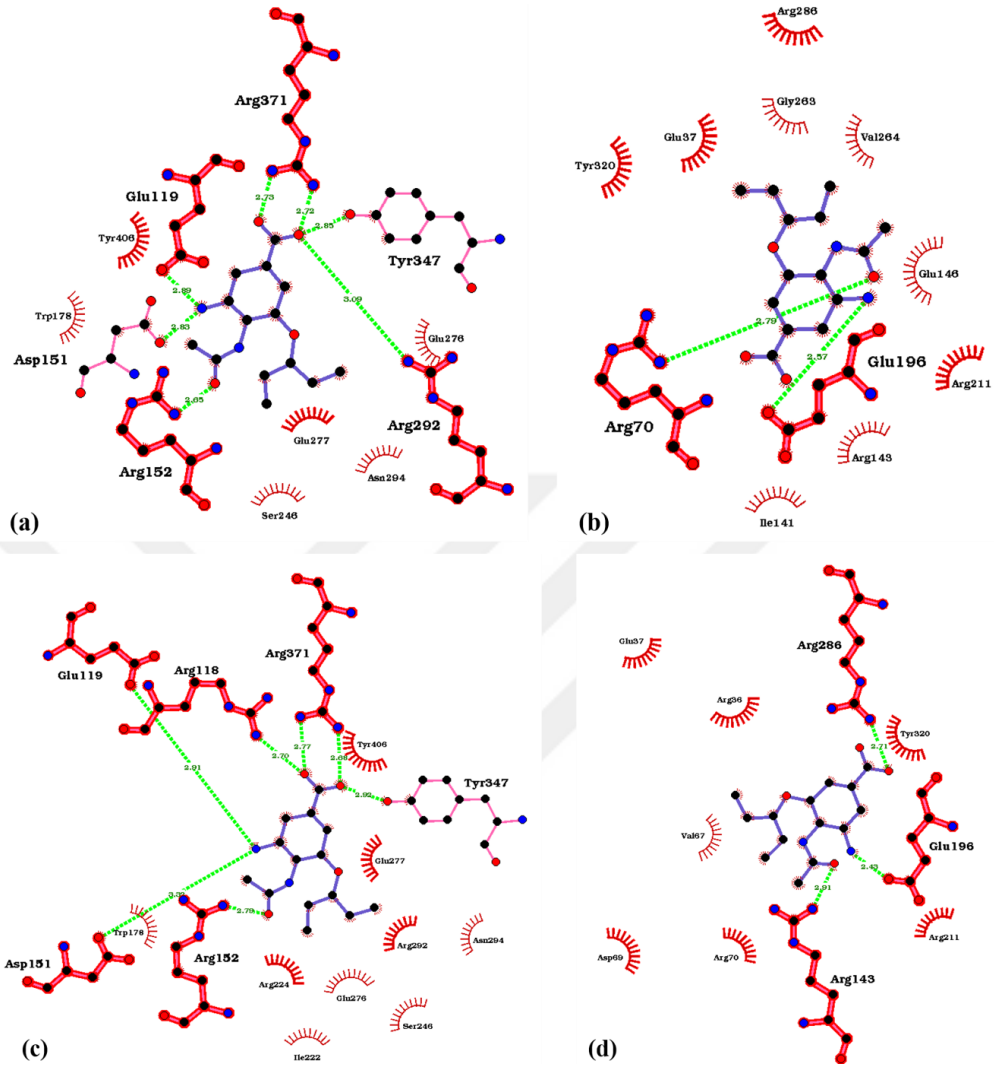
-6.3 kcal/mol, 6.5 kcal/mol; ADT değerleri -6.30 kcal/mol, -6.05 kcal/mol, -6.04 kcal/mol, -6.63 kcal/mol; Hydrated ADT değerleri -9.70 kcal/mol, -8.95 kcal/mol, -9.26 kcal/mol ve -9.33 kcal/mol'dür. Bu değerlerin karşılaştırmaları Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Bu sonuca göre, OTV bağlanma eğilimlerinin tahmini üç kenetleme yöntemi için de deneysel verilerle uyumlu olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.8: S2, S1, R2 ve R1'in I-TASSER homoloji modellemesi ile elde edilen yapılarına kenetlenen oseltamivirin bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması.

Homoloji modellemesi ile elde edilmiş NA yapılarının, kristal yapılarıdaki OTV etkileşimlerinden farkını anlamak amacıyla S1 ve R2 temsilci mutant olmayan ve mutant yapılar olarak seçilmiştir. Bu yapıların kenetleme deneyleri (Hydrated ADT) sonucunda OTV ile yaptıkları etkileşimler çıkarılarak kristal etkileşimler ile Şekil 3.9'daki gibi karşılaştırılmıştır. S1 yapısı için η değeri %50, R2 yapısı için ise %60'tır. Bağlanma enerjisi verileri ile birlikte etkileşim tahmin başarısı oranının düşük olması, homoloji modellemesi sırasında OTV için kritik olan bir bölgenin yeteri kadar iyi modellenmemiş olabileceği düşüncesini oluşturmuştur. Bunun üzerine, literatürde OTV'nin aktif bölgedeki stabilitesini sağladığı bilinen 347. rezidüdeki Tirozin amino asitinin yapısı incelenmiş ve bu yapının kristaldeki oryantasyonunun aksine dışa yönelimli olduğu görülmüştür. Buradan çıkarılacak sonuç, homoloji modellemesinin

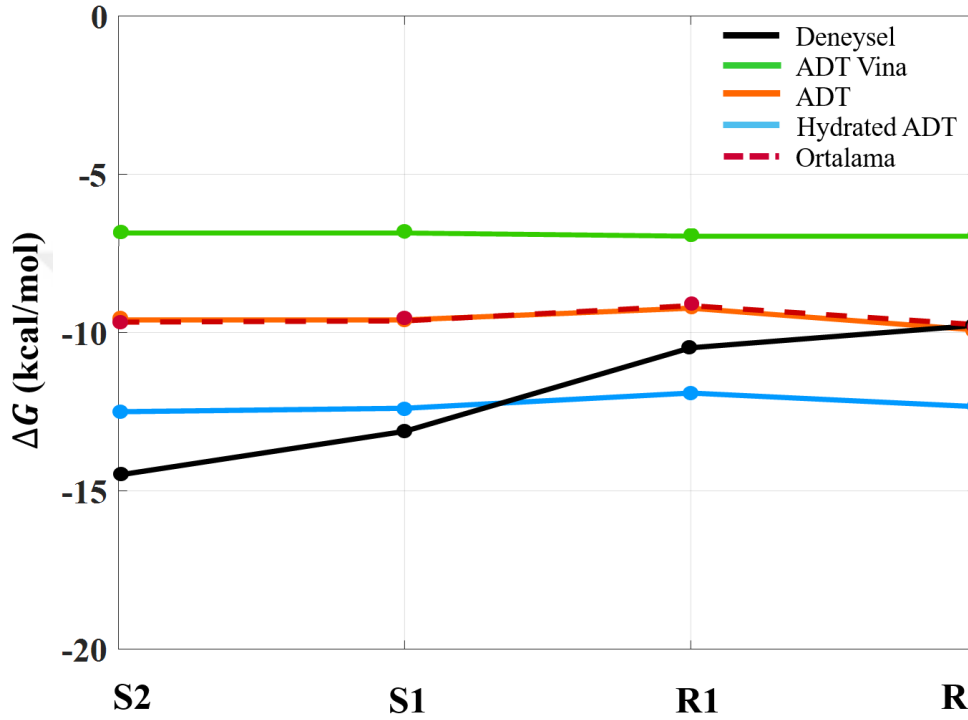
NA yapısında OTV'nin kritik olarak bağlandığı tek bir amino asitte iyi tahmin vermemesinin bile, sonuçlarda önemli bir etkiye sahip olabileceğidir.



Şekil 3.9: Kristal S1-OTV (a) etkileşimlerinin kenetleme sonucu elde edilen S1-OTV etkileşimleri (b) ile ve kristal R2-OTV (c) etkileşimlerinin kenetleme sonucu elde edilen R2-OTV etkileşimleri ile karşılaştırılması.

Pymol Mutagenesis modülü ile oluşturulan S2 yapısının, S1, R1 ve R2 ile karşılaştırmalarının yapılabilmesi için bu üç kristal yapıdaki mutasyonlar (H252Y, N294S ve H274Y) yine bu modül yardımı ile tekrar oluşturulmuştur. Böylelikle tekli mutasyonu bu modül ile oluşturulmuş dört yapı elde edilmiştir. Kenetleme deneyleri sonucunda S2, S1, R1 ve R2 yapıları için ADT Vina değerleri sırasıyla -6.9 kcal/mol, -6.9 kcal/mol, -7.0 kcal/mol, 7.0 kcal/mol; ADT değerleri -9.6 kcal/mol, -9.6 kcal/mol, -9.23 kcal/mol, -9.92 kcal/mol; Hydrated ADT değerleri -12.49 kcal/mol, -12.39 kcal/mol, -11.91 kcal/mol ve -12.34 kcal/mol'dür. Bu değerlerin karşılaştırmaları Şekil

3.10'daki grafikte gösterilmiştir. Bağlanma eğiliminin önceki sonuçlara benzer şekilde deneysel ile korelasyon göstermediği de yine bu sonuçlar ile gözlenmektedir. Ayrıca sonuçlar Şekil 3.7'deki kristal yapılara ait sonuçlar ile karşılaştırıldığında, bağlanma eğilimlerinin beklendiği gibi bu sonuçlara yakın olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, proteinin homoloji modellemesinde olduğu gibi tümüyle modellenmeden, Pymol Mutagenesis ile tek bir rezidüde mutasyon oluşturulmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.10: S2, S1, R2 ve R1'in Pymol Mutagenesis ile elde edilen yapılarına kenetlenen oseltamivirin bağlanma enerjilerinin karşılaştırılması.

Tüm kenetleme sonuçları analiz edildiğinde, I-TASSER ve Mutagenesis ile oluşturulan NA yapıları için OTV bağlanma eğilimi beklenen korelasyonu göstermemektedir. Kristal yapılar için gerçekleştirilen kenetleme deneylerine göre ise OTV bağlanma eğiliminin en doğru tespitinin Hydrated ADT ile sağlanabildiği görülmektedir. Ancak, mutant olmayan ve mutant yapıların birbirinden ayrımını sağlamak, OTV bağlanma eğiliminin ΔG değerleri ile birlikte değerlendirilmesi ile anlamlı olabilir. Bu nedenle, S1 yapısını R1 ve R2 yapılarından anlamlı bir şekilde ayıracak olan ΔG değerinin, kenetleme deneyleri sonucunda gerçek hayattaki kadar fark oluşturmadığından yetersiz kaldığı sonucu çıkarılabilir.

Moleküler kenetleme deneyleri, OTV ile NA arasındaki atomik etkileşimler ve OTV konformasyonu açısından başarılı sonuçlar vermektedir. Bu da farklı yöntemler ile simüle edilecek sistemler için başlangıç konfigürasyonunun belirlenmesinde ve hedef makromolekülün aktif bölgesinin tespit edilmesinde önemli bir bilgi sağlamaktadır. Bu bilgi LBDD yaklaşımı için de, makromolekülün aktif bölgesinin modellenmesine ve böylece yeni ilaç bileşenlerinin tasarımına ışık tutmaktadır. Ancak, antiviral direnç gösterdiği bilinen NA yapılarının, direnç göstermeyen NA yapılarından efektif olarak ayrılmasının başlıca sebebi, moleküler kenetlemenin en büyük limitasyonu olan makromolekülün tamamen katı yani hareketsiz olarak kabul edilmesidir. Bu yüzden sistemin gerçek hayata uygun simülasyonu gerçekleştirilememektedir. Bu nedenle MD simülasyonları, sistemin daha gerçekçi modellenmesinin yapılabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Tezin bu kısmından sonra, kenetleme çalışmalarına destek oluşturabilmek ve NA-OTV davranışının doğadaki modellenmesini gerçekleştirebilmek için şemsiye örnekleme metodu kullanılarak MD simülasyonları yapılmıştır.

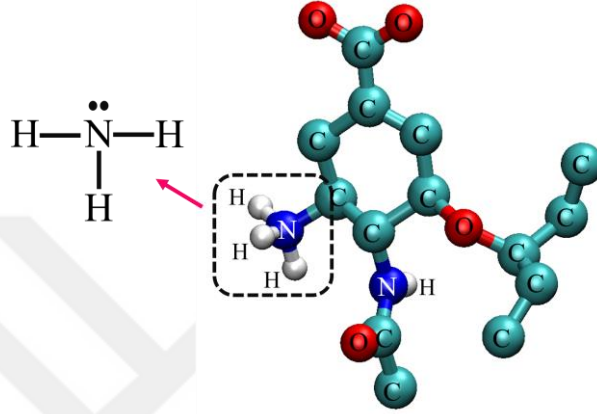
3.2.2 Moleküler dinamik ile bağlanma enerjilerinin hesaplanması

3.2.2.1 Oseltamivir yük etkisi

Protein-ligand sistemleri, doğada fizyolojik ortamlarda bulunduğu için bu iki molekülün birbirleri ile etkileşimlerinde özellikle ligandın yükü çok önemlidir. Bunun nedeni, ortamda bulunabilecek serbest iyon ve atomların ligand molekülü ile bağ yaparak ligandın yükünü değiştirmesi ve böylece bağlanma enerjisinde dramatik bir etki oluşturabilecek olmasıdır. Bu durum, NA-OTV sistemi için bağlanma eğilimi üzerinde değişiklik yaratabilir. Bu nedenle çalışılan sistemde ligandın yükünün doğru bir şekilde tayin edilmesi MD çalışmalarında önem taşımaktadır.

Bu bölümde, OTV'nin yük değişiminin ΔG bağlanma enerjisi üzerindeki etkisi incelenecektir. Burada gerçekleştirilen simülasyonlarda GROMOS96 43a1 kuvvet alanı kullanılmıştır, bu nedenle OTV'deki polar olmayan hidrojenler karbon atomlarına kaynaştırılarak birleşik-atom modeli oluşturulmuştur. Bu model sonucunda kullanılan OTV yapısı Şekil 3.11'de verilmiştir. Karbon atomları C, azotlar N, oksijenler O ve hidrojenler H ile gösterilmiştir. Kare içerisinde gösterilen NH_3 molekülü, OTV'nin yükünün 0 ve +1 olarak belirlenmesinde kritik bir bölgedir.

Normal şartlarda NH_3 , -3 yüke sahip azot ve +1 yüklü üç adet hidrojen atomuyla toplamda 0 yüke sahip bir moleküldür. Böylece OTV'nin formal yükü de 0 olmaktadır. Ancak, OTV molekülü insan vücudu gibi fizyolojik bir ortamda iken, azot atomunda boşta kalan elektron çifti ortamdaki serbest hidrojen atomlarından biri ile bağ yaparak NH_4^+ durumuna geçebilmektedir (Care vd., 1987). Bu durumda toplam yük +1 olur ve bu yük fizyolojik yük olarak değerlendirilir.



Şekil 3.11: OTV molekülünün birleşik-atom modeline göre gösterimi ve NH_3 'ün Lewis yapısı.

İlaç bileşenlerinin ayrıntılı verilerini kapsamlı olarak paylaşan DrugBank veritabanında OTV'nin fizyolojik yükü +1 olarak verilmiştir (Wishart et al., 2018). Ancak, literatürdeki GROMOS kuvvet alanı kullanılan birçok çalışmada OTV'nin ligand topolojisi PRODRG sunucusu kullanılarak elde edilmiştir ve bu sunucu ile hesaplanan OTV yükü formal olup 0'dır.

OTV'nin formal ve fizyolojik yüklerinin bağlanma eğilimine etkisini belirleyebilmek amacıyla simülasyonlar S1, R1 ve R2 yapılarının her biri için OTV yükü hem +1 hem 0 olarak hesaplanarak gerçekleştirilmiştir. 0 yüklü OTV'nin kısmi atomik yükleri PRODRG sunucusu kullanılarak, +1 yüklü OTV'nin kısmi atomik yükleri ise Gaussian 09 programı kullanılarak kuantum mekaniksel yöntemler ile hesaplanmıştır. B3LYP teorisi seviyesi ve 6-31g (d,p) temel parametre seti kullanılmıştır ve Mulliken yükleri dikkate alınarak, birleşik-atom modeline uygun şekilde kısmi yükler ligand topolojisinde modifiye edilmiştir.

Şemsiye örnekleme sonucu elde edilen PMF eğrisine göre S1, R1 ve R2 holo yapıları için OTV'nin bağlanma enerjileri iki farklı yöntem ile hesaplanmış ve ΔG_1 (PMF

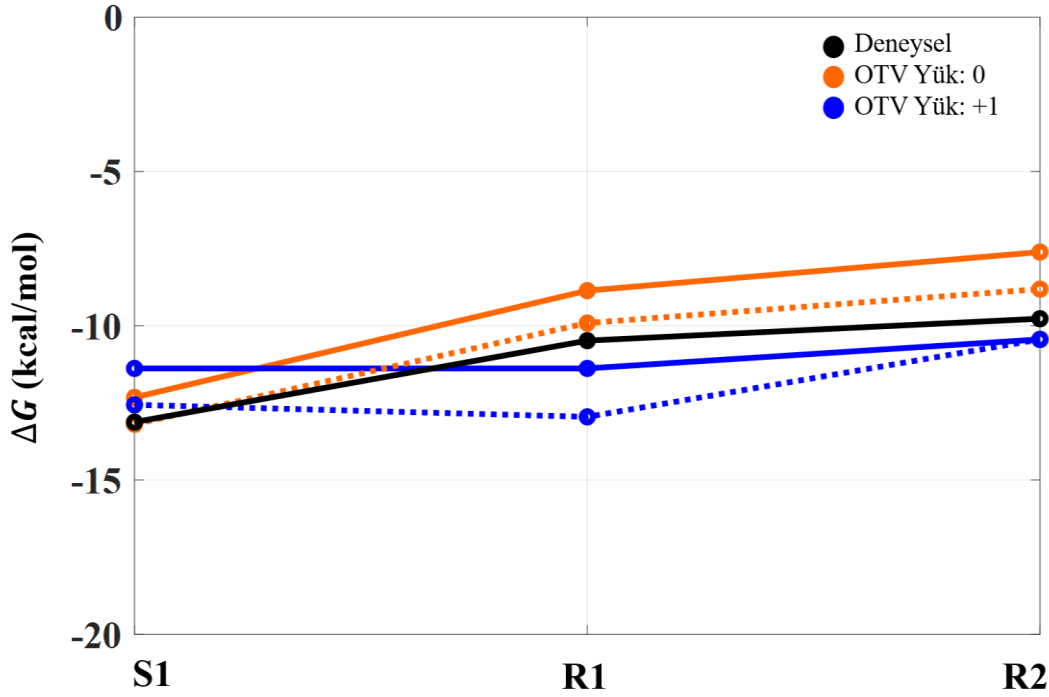
eğrisinin maksimum ve minimum noktaları arasındaki fark) ve ΔG_2 (Denklem 2.10 ve Denklem 2.11 kullanılarak hesaplanan) değerleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. 0 formal yük için değerler sırasıyla -12.32 kcal/mol, -8.86 kcal/mol ve -7.61 kcal/mol; +1 fizyolojik yük için değerler sırasıyla -11.38 kcal/mol, -11.38 kcal/mol ve -10.44 kcal/mol’dür. Bu değerler bölüm 2.4.4’te anlatılan PMF eğrisinden bağlanma enerjisi hesabındaki ilk yöntem kullanılarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.2: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarındaki OTV’nin formal ve fizyolojik yüküne göre hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.

	ΔG Bağlanma Enerjisi Değeri (kcal/mol)					
	Kristal yapılar					
	S1		R1		R2	
	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_1	ΔG_2
OTV yük: 0	-12.32	-13.19	-8.86	-9.91	-7.61	-8.81
OTV yük: +1	-11.38	-12.56	-11.38	-12.95	-10.44	-12.19
Deneysel	-13.12		-10.48		-9.77	

OTV’in toplam yükü +1 iken, OTV’nin S1 ve R1 yapılarına bağlanma enerjileri her ikisi için de -11.38 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu durum, mutant ve mutant olmayan NA yapılarına bağlanmış olan +1 yüklü OTV’nin GROMOS96 43a1 kuvvet alanı kullanılarak simüle edilmesi durumunda deneysel sonuçlar ile korelasyon sağlanamadığını göstermektedir. Yani bu sonuca göre S1 ve R1 yapıları arasında mutajenite anlamında bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak, 0 yük durumundaki bağlanma eğilimi incelendiğinde S1, R1 ve R2 sıralaması ile deneysel sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Şekil 3.12). Grafikteki deneysel değerleri belirten siyah eğrinin, düz çizgi ile gösterilen turuncu (formal yük) ve mavi (fizyolojik yük) ile karşılaştırması yapıldığında siyah ve turuncu eğrilerin eğimlerinin birbirlerine çok yakın olduğu görülmektedir. Burada beklenen durum, eğrilerin ΔG değerlerinin kendi içlerinde mutant ve mutant olmayan yapıların ayrımını sağlaması ile birlikte deneysel değerleri ifade eden eğri ile benzer eğime sahip olmasıdır. Şemsiye örnekleme simülasyonları sonucu ile de bu durum OTV’nin formal yükü kullanıldığında mümkün olmuştur.

Ayrıca hesaplanan ΔG_2 bağlanma enerjisi değerleri OTV yükü 0 olduğunda S1, R1 ve R2 için sırasıyla -13.19 kcal/mol, -9.91 kcal/mol ve -8.81 kcal/mol'dür. OTV yükü +1 olduğu durum için ise S1, R1 ve R2 bağlanma enerjileri -12.56 kcal/mol, -12.95 kcal/mol ve -12.19 kcal/mol'dür. Bu yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar da Şekil 3.12'de kesikli çizgiler ile gösterilmiştir ve ΔG_1 bağlanma enerjisi değerleri ile paralel bulgular göstermektedir.



Şekil 3.12: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarındaki OTV'nin formal ve fizyolojik yükünün bağlanma enerjilerine etkisi ve değerlerin karşılaştırılması.

Sonuç olarak, GROMOS96 43a1 kuvvet alanı diğer kuvvet alanlarından farklı olarak birleşik-atom modeli ile hesaplamalar yaptığından ve bağlanma eğiliminin OTV yükü 0 olduğu durumda daha doğru tespit edilebildiğinden dolayı, OTV yükünün yalnızca bu kuvvet alanı için toplam formal yükü olan 0 ile simüle edilmesine karar verilmiştir.

3.2.2.2 Farklı kuvvet alanları etkisi

Moleküler dinamik simülasyonlarında bir sistemi doğru olarak modellemek yüzlerce parametrenin o sistem için belirlenmiş optimum değerlerinin uyum içerisinde kullanılması ile mümkündür. Özellikle biyolojik sistemlerin doğadaki davranışlarını bilgisayar destekli çalışmalar ile simüle edebilmek karmaşık ve zaman isteyen bir

süreçtir. Tezin 3.4.2. bölümünde anlatıldığı gibi, bir moleküler dinamik simülasyonunun en temel parametre setlerinden biri olan kuvvet alanları, farklı sistemler için farklı sonuçlar verebilir ve gerçek hayata en uygun sonucu tespit edebilmek ancak farklı kuvvet alanları ile çok sayıda simülasyonlar gerçekleştirilerek mümkün olabilir.

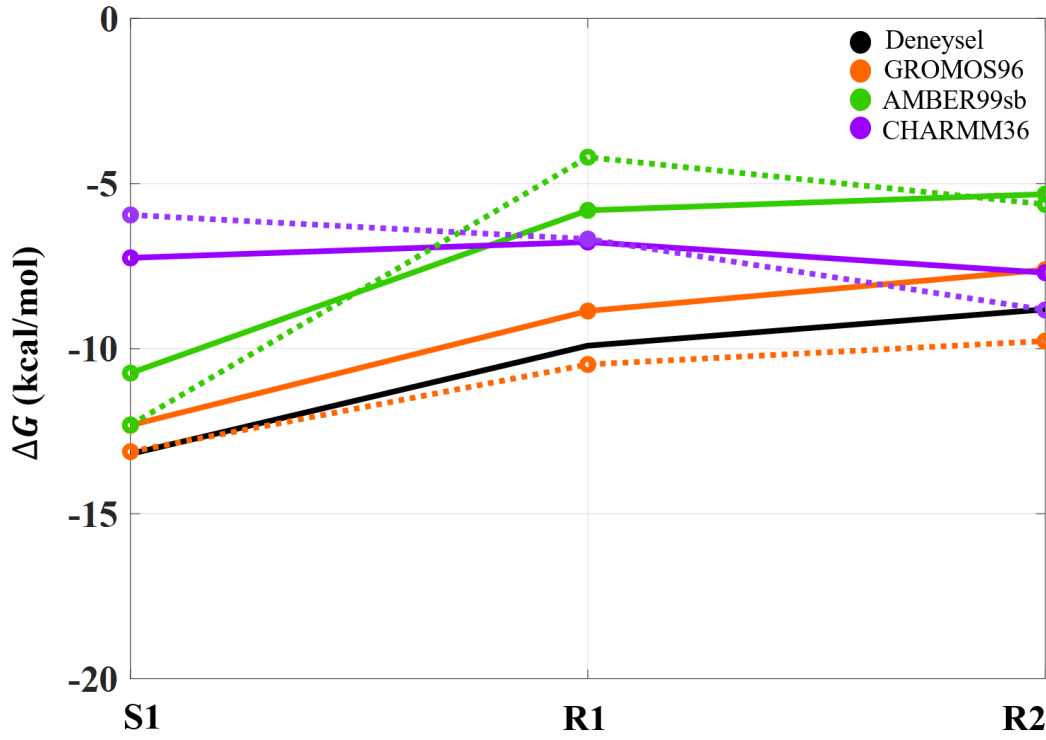
Bu bölümde, şemsiye örnekleme simülasyonlarında NA-OTV sistemi için farklı kuvvet alanlarının ΔG bağlanma enerjisi üzerindeki etkisi incelenecektir. Bu doğrultuda, buradaki çalışmada literatürde protein-ligand sistemlerinde en yaygın olarak kullanılan AMBER99sb, GROMOS96 43a1 ve CHARMM36 kuvvet alanları kullanılarak deneyler yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. GROMOS96 43a1 kuvvet alanı kullanılarak yapılan deneyler sonucunda, S1, R1 ve R2 için ΔG_1 değerleri sırasıyla -12.32 kcal/mol, -8.86 kcal/mol ve -7.61 kcal/mol; AMBER99sb kuvvet alanı için sırasıyla -10.74 kcal/mol, -5.81 kcal/mol ve -5.32 kcal/mol; CHARMM36 kuvvet alanı için ise sırasıyla -7.25 kcal/mol, -6.77 kcal/mol ve -7.70 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu değerler bölüm 2.4.4'te anlatılan PMF eğrisinden bağlanma enerjisi hesabındaki ilk yöntem kullanılarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.3: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarındaki OTV'nin GROMOS96 43a1, AMBER99sb ve CHARMM36 kuvvet alanlarına göre hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.

	ΔG Bağlanma Enerjisi Değeri (kcal/mol)					
	Kristal yapılar					
	S1		R1		R2	
	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_1	ΔG_2
GROMOS96 43a1	-12.32	-13.19	-8.86	-9.91	-7.61	-8.81
AMBER99sb	-10.74	-12.31	-5.81	-4.20	-5.32	-5.63
CHARMM36	-7.25	-5.95	-6.77	-6.68	-7.70	-8.33
DeneySEL	-13.12		-10.48		-9.77	

Şekil 3.13 'de gösterilen ΔG grafiklerine göre, GROMOS96 43a1 (turuncu) ve AMBER99sb (yeşil) kuvvet alanları kullanılarak hesaplanan, düz çizgi ile gösterilen ΔG_1 değerlerinin deneysel veriler ile korelasyon gösterdiği görülmektedir. Her iki kuvvet alanı için de bağlanma eğilimi S1, R1 ve R2 şeklindedir. CHARMM36 kuvvet

alanı (mor) sonucuna göre ise, hem ΔG_1 hem ΔG_2 değerlerine göre OTV'nin bağlanma affinitesinin en yüksek olduğu NA yapısı R2'dir. Bu sonuç, OTV'nin olması gereken bağlanma eğilimine uyum göstermemekte, yani mutajenite ayrımı tespit edilememektedir. Bu anlamda deneysel eğri ile beklenen eğim korelasyonu sağlanamadığından CHARMM36 kuvvet alanı tez kapsamında kullanılan NA-OTV sistemi için uygun bulunmamıştır.



Şekil 3.13: S1, R1 ve R2 holo yapıları için GROMOS96 43a1, AMBER99sb ve CHARMM36 kuvvet alanlarının OTV bağlanma enerjilerine etkisi ve değerlerin karşılaştırılması.

Ayrıca, Denklem 2.10 ve Denklem 2.11 kullanılarak hesaplanan ΔG_2 bağlanma enerjisi değerleri GROMOS96 43a1 kuvvet alanı kullanıldığında S1, R1 ve R2 için sırasıyla -13.19 kcal/mol, -9.91 kcal/mol ve -8.81 kcal/mol; AMBER99sb kuvvet alanı kullanıldığında -12.31 kcal/mol, -4.20 kcal/mol ve -5.63 kcal/mol ve CHARMM36 kuvvet alanı kullanıldığında ise -5.95 kcal/mol, -6.63 kcal/mol ve -8.33 kcal/mol'dür. Bu yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar da, ilk yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar ile paralel bulgular göstermektedir.

Sonuç olarak, OTV'nin bağlanma affinitesinin ve eğiliminin tespit edilmesinde kuvvet alanı etkisini görebilmek amacı ile yapılan bu çalışmada, her kuvvet alanının her sistem için uygun olmadığı gözlemlenmekle birlikte, iki ayrı kuvvet alanı ile

(GROMOS ve AMBER) farklı bağlanma enerjileri elde edilse bile bağlanma eğiliminin doğru bir şekilde tespit edilerek gerekli mutajenite ayrımının yapılabildiği görülmüştür.

3.2.2.3 Moleküler pozisyon kısıtlaması etkisi

Şemsiye örnekleme yönteminde ligand molekülü, bağlanmış olduğu makromolekülden bir kuvvet yardımı ile uzaklaştırılarak simüle edilir. Bu simülasyonda önemli olan bir adım, ligandı makromolekülden çekerken makromolekülün atomik hareketlerinin kısıtlanmadan, sadece konumunun pozisyon kısıtlayıcı kuvvetler yardımı ile sınırlanmasıdır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen simülasyonlarda, NA yapılarında pozisyon kısıtlaması kullanılmasının en önemli sebebi, ligandın makromolekülden uzaklaştırılması sırasında proteinin konumsal olarak hareketli olması durumunun bağlanma eğiliminin tespitinde olumsuz bir etki yaratabilmesi olasılığıdır. Ancak, gerçek hayatta moleküller konumsal anlamda sürekli hareket halindedirler. Bu nedenle sistemin daha gerçekçi simüle edilebilmesi için pozisyon kısıtlaması etkisi kaldırılarak simülasyonlar yapılmış ve ΔG değerleri hesaplanmıştır.

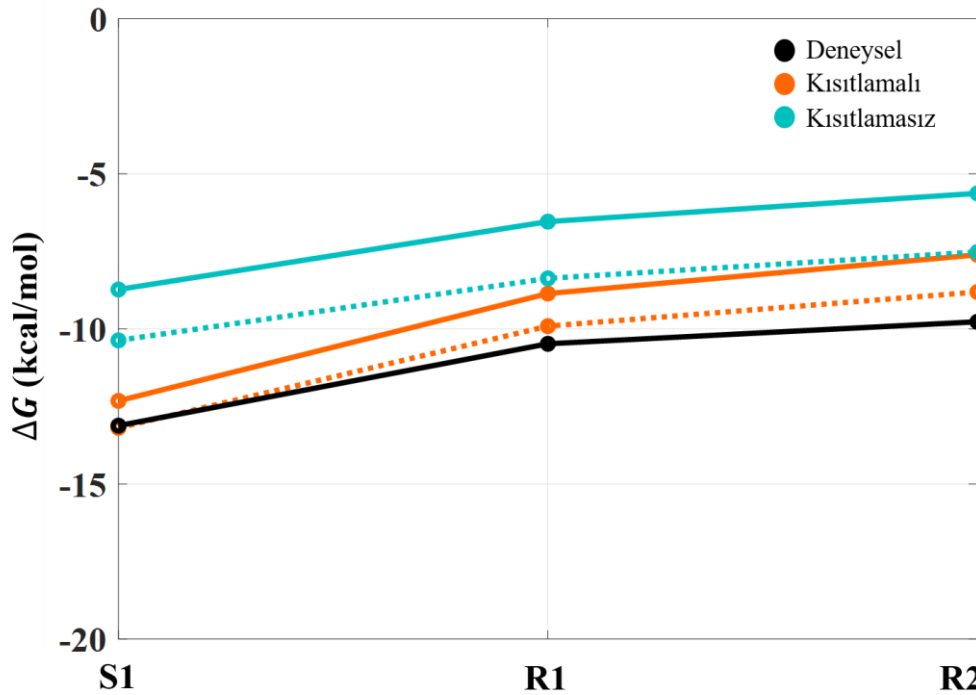
Simülasyonlar, GROMOS96 43a1 kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Pozisyon kısıtlamalı simülasyonlara göre S1, R1 ve R2 yapıları için ΔG_1 değerleri sırasıyla -12.32 kcal/mol, -8.86 -12.32 kcal/mol, -7.61 -12.32 kcal/mol; pozisyon kısıtlamasız simülasyonlara göre ise -8.73 kcal/mol, -6.54 kcal/mol ve -5.63 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu değerler bölüm 2.4.4'te anlatılan PMF eğrisinden bağlanma enerjisi hesabındaki ilk yöntem kullanılarak elde edilmiştir.

Ayrıca, Denklem 2.10 ve Denklem 2.11 kullanılarak hesaplanan ΔG_2 bağlanma enerjisi değerleri pozisyon kısıtlamasız S1, R1 ve R2 için sırasıyla -10.37 kcal/mol, -8.37 kcal/mol ve -7.52 kcal/mol'dür. Bu yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar da, yukarıda elde edilen sonuçlar ile paralel bulgular göstermektedir.

Çizelge 4.4: Şemsiye örnekleme simülasyonları ile S1, R1 ve R2 holo yapılarının pozisyon kısıtlamalı ve kısıtlamasız simüle edilmeleri sonucunda hesaplanmış ve deneysel bağlanma enerjileri.

	ΔG Bağlanma Enerjisi Değeri (kcal/mol)					
	Kristal yapılar					
	S1		R1		R2	
	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_1	ΔG_2	ΔG_1	ΔG_2
Kısıtlamalı	-12.32	-13.19	-8.86	-9.91	-7.61	-8.81
Kısıtlamasız	-8.73	-10.37	-6.54	-8.37	-5.63	-7.52
Deneysel	-13.12		-10.48		-9.77	

Şekil 3.14'te gösterilen veriler incelenirse, pozisyon kısıtlaması etkisi her bir NA yapısı için kaldırıldığında ve protein çözelti içerisinde serbest olarak hareket edebildiğinde OTV bağlanma eğiliminin deneysel verilere uyumlu olarak S1, R1 ve R2 şeklinde elde edildiği görülmektedir.



Şekil 3.14: S1, R1 ve R2 holo yapıları üzerindeki pozisyon kısıtlamasının kaldırılmasının OTV bağlanma enerjilerine etkisi ve değerlerin karşılaştırılması.

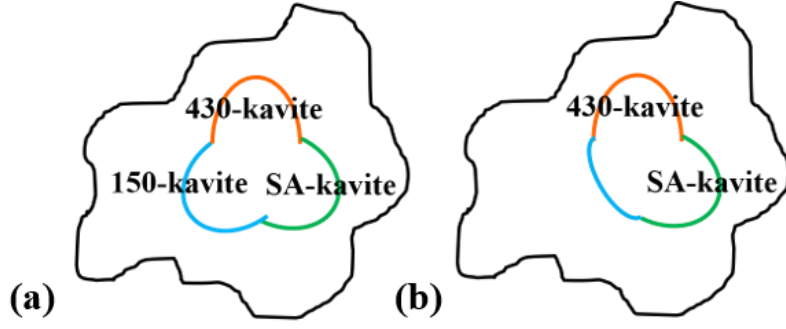
Bu bölümde elde edilen sonuç, S1, R1 ve R2 yapılarının mutajenite ayrımlarının üzerlerinde herhangi bir pozisyon sınırlaması olmadan da tespit edilebildiğidir. Bu bilgi, sistemin daha gerçekçi simüle edilebilmesi ile gerçekleştirilebildiğinden bilgisayar tabanlı ilaç tasarımı alanında gelecek çalışmalarda büyük önem arz etmektedir.

3.3 NA Proteininin Detaylı Yapısal Analizi

3.3.1 Aktif bölge kavitesinin MD simülasyonları ile analizi

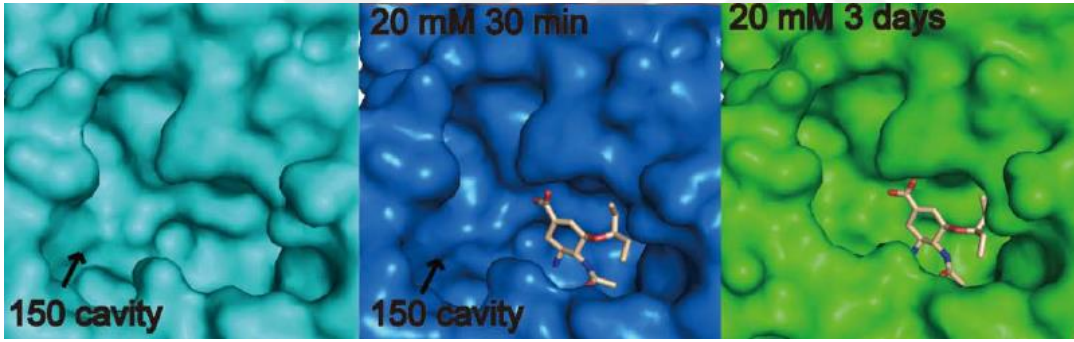
Ligandın hedef proteine bağlanması veya serbest kalması, proteinin aktif bölgesindeki kavitelere veya yan zincirlerinde küçük hareketlerden, bağlanma bölgesinde gerçekleşecek büyük ölçekli yapısal değişimlere veya kısmi açılmalara kadar etkiye neden olabilir (Zavodszky, 2005). Bu tür yapısal değişimler ligandın, bağlanma bölgesi tarafından yakalanarak orada stabil olarak kalmasına veya aksine bu bölgeden koparak salınmasına yol açabilir. Bu nedenle, proteinin aktif bölgesindeki kavite dinamiklerinin analizi, ligandın buradaki kararlılığını belirleyebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Tezde kullanılan NA yapısının aktif bölgesini oluşturan kavite Şekil 1.7’de gösterilmiştir. Şekil 1.8’de ise bu bölgedeki 150-kavitenin açık ve kapalı konformasyonları verilmiştir. Yani NA proteininde, direkt olarak OTV bağlanma bölgesinde esnekliği yüksek ve değişken bir kavite bulunmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalara göre de 150-kavitenin fleksibilitesinin yüksek olduğu kanıtlanmıştır (Amaro vd., 2011) (Li vd., 2010).

Bu bölümde, S1 yapısı referans seçilerek bu yapı için aktif bölge analizleri gerçekleştirilmiş ve OTV’nin aktif bölgede bulunmasının 150-kavite fleksibilitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. PDB’de sekansı S1 ile birebir aynı olan, ancak 150-kavite yapısında farklılık gösteren bir yapı bulunmaktadır (PDB ID: 2hty). Bu yapının S1’den tek farkı, apo formda yani OTV ile kompleks halinde olmamasıdır. Açık konformasyona sahip 150-kavite deneylerinde bu yapı da kullanılmış ve S1-150 olarak adlandırılmıştır. S1-150 ve S1 yapılarının şematik olarak gösterimi Şekil 3.15’te verilmiştir.



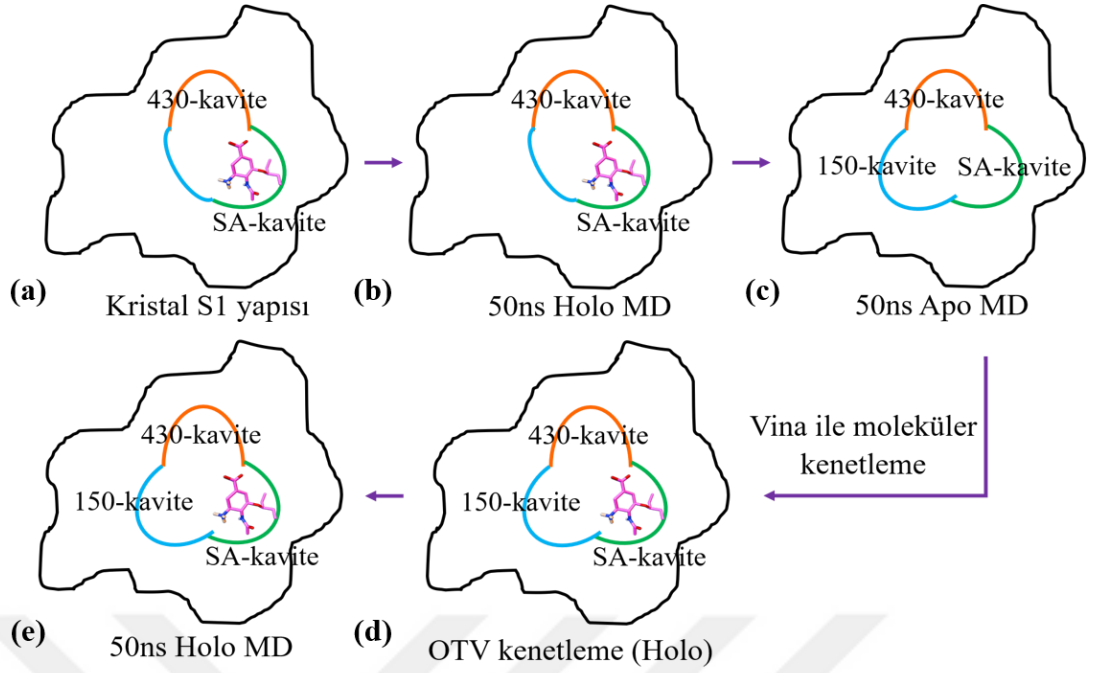
Şekil 3.15: S1-150 (a) ve S1 (b) yapılarının kavite konformasyonlarının şematik olarak gösterimi.

OTV'nin 150-kavite üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla literatürde yapılan deneysel bir çalışmaya göre, açık 150-kavite'ye sahip NA yapısı 20 dakika boyunca 20 mM OTV'ye maruz bırakıldığında kavite yapısında bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak bu süre yine 20 mM konsantrasyonda 3 güne çıkarıldığında, 150-kavite yapısının kapandığı görülmüştür (Wu vd., 2013). Bu sonuç, elde edilen kristalografik yapılar üzerinde Şekil 3.16'te gösterilmiştir.



Şekil 3.16: OTV kaynaklı 150-kavite dönüşümünün deneysel olarak karşılaştırılması (Wu et al., 2013).

Bahsedilen 150-kavite dinamiğinin araştırılması için, tezin bu bölümünde 50 ns pozisyon kısıtlamasız MD simülasyonları AMBER99sb kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, Şekil 3.17'de şematik olarak gösterilen şekilde S1 holo yapısı alınarak (a) MD simülasyonu yapılmıştır (b). Daha sonra OTV, aktif bölgeden çıkartılarak apo yapı üzerinde simülasyon gerçekleştirilmiştir (c). OTV'nin, 150-kavitenin fleksibilitesi üzerinde herhangi bir geri-dönüşümlü etkisinin olup olmadığının araştırılması için ise ADT Vina ile OTV tekrar yapıya kenetlenerek (d) yine 50 ns holo yapı olarak simüle edilmiştir (e).



Şekil 3.17: 150-kavite dinamiğinin MD simülasyonları ile holo ve apo yapılar üzerinde araştırılmasının şematik gösterimi.

Bu simülasyonların analizinde, 150-kavitenin açık veya kapalı konformasyon olarak değerlendirilebilmesi için “çözücüyle erişilebilen yüzey alanı (SASA)” ve “karelerin ortalamasının karekökündeki sapma (RMSD)” değerleri hesaplanmıştır. SASA, sistemde kullanılan çözeltinin (su ve iyonlar) molekül üzerinde erişebildiği yüzey alanını ifade eder ve nm^2 cinsinden tanımlanır. RMSD ise, hizalanmış moleküllerin atomik konumları arasındaki mesafenin bir ölçüsüdür.

Bu doğrultuda öncelikle S1 ve S1-150 kristal yapılarındaki, kapalı ve açık 150-kavite konformasyonlarının SASA değerleri hesaplanmıştır. 150-kavite rezidüleri Çizelge 1.1’deki amino asitler dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu değerlerin hesaplanmasında GROMACS 5.1.4 yazılım paketindeki sasa modülü kullanılmıştır (Chemistry, 1995). S1 yapısı için 150-kavite SASA değeri 20.06 nm^2 , S1-150 yapısı için ise 22.41 nm^2 olarak bulunmuştur. Yapıların 150-kaviteleri hizalandırıldığında RMSD değeri ise 2.49 \AA olarak hesaplanmıştır. Açık ve kapalı 150-kavite konformasyonlarındaki referans değerler bu şekilde elde edilmiştir. Holo MD sonucunda elde edilen S1 yapısının 150-kavite SASA değeri 21.73 nm^2 , S1 yapısı ile olan RMSD’si 1.248 \AA olarak kapalı konformasyonda bulunmuştur. Bu da ortamda OTV varken kapalı konformasyondaki 150-kavite yapısında herhangi bir açılmanın görülmediği ve stabil bir profil izlediği anlamına gelmektedir. Ortamdan OTV

çıkarılarak yapılan simülasyon sonucuna göre, 150-kavite SASA değeri 28.04 nm² ile önemli bir artış göstermiştir. Yapının S1 ile RMSD değeri 5.47 Å, S1-150 ile RMSD değeri ise 4.61 Å olarak bulunmuştur. 150-kavite yapısal olarak incelendiğinde de simülasyon sonucunda kavitenin açık konformasyona geçtiği gözlenmektedir. Bu durum, OTV'nin 150-kavite stabilizasyonunda önemli bir yere sahip olduğu çıkarımını da güçlendirmektedir. Son olarak, simülasyon sonucunda elde edilen bu yapıya ADT Vina kenetleme işlemi gerçekleştirilmiş ve kavitenin davranışı yine 50 ns simülasyonlar ile gözlenmiştir. Bunun sonucunda, SASA değeri 28.35 nm², S1 ile RMSD değeri 4.96 Å, S1-150 ile RMSD değeri ise 4.24 Å olarak bulunmuş ve 150-kavitenin açık konformasyon davranışını devam ettirdiği gözlenmiştir. Deneysel çalışmalarda, OTV'ye maruz bırakılan aktif bölgedeki 150-kavite yapısının 3 gün sonra kapandığı gözlenmiştir. Bu nedenle, geri-dönüşümlü etkinin MD simülasyonları ile gözlenememesinin nedeni aslında simülasyon süresinin, deneysel süreye ulaşmasının mümkün olmamasındandır.

Literatürde, 150-kavitenin OTV bağlanmasındaki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, bu tez de dahil olmak üzere tespit edilen 150-kavite fleksibilitesi, NA yapıları hedeflenerek gerçekleştirilen ilaç tasarım çalışmalarında dikkate değer bir durum oluşturmaktadır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, influenza A virüsündeki Nöraminidaz protein yapısının antiviral bir ilaç olan OTV ile etkileşimi moleküler dinamik (şemsiye örnekleme) ve moleküler kenetleme yöntemleri (AutoDock, AutoDock Vina ve Hydrated AutoDock) ile analiz edilerek, OTV'nin etkinliğinin belirlenebilmesi için kullanılan yöntemlerin ve yöntemlerde kullanılan parametrelerin moleküler yapı ve bağlanma enerjisi hesaplarındaki etkileri incelenmiştir. Bunun için, deneysel olarak yapısı ve bağlanma enerjisi bilinen NA-OTV sistemleri modellenerek kullanılan parametrelerin (kuvvet alanları, OTV elektriksel yükü, pozisyon kısıtlaması) doğru yapıya ve bağlanma enerjisinin hesaplanmasına etkileri belirlenmiştir. Bu sayede, verilen NA yapısına eldeki ilaç moleküllerinin bağlanma mekanizması incelenerek ilacın etkinliğinin belirlenmesi ve dolayısı ile karşılaşılan virüsün ilaca karşı dirençli olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda, moleküler kenetleme yöntemlerinin ilacın aktif bölge kavitelesinin bulunmasında ve bu kavite içerisindeki ilaç konformasyonunun belirlenmesinde başarı gösterdiği, ancak ilacın kavite içerisindeki bağlanma enerjisinin hesaplanması için yeterli olmadığı gözlenmiştir. Test edilen üç moleküler kenetlenme yöntemi de eşdeğerde başarı gösterirken, hesaplama zamanı açısından Autodock Vina'nın eldeki sistemin analizinde en iyi seçim olduğu belirlenmiştir. Aktif bölgenin ve aktif bölge içerisindeki ilaç konformasyonunun belirlenmesi tek başına ilacın etkinliğini belirleyememektedir. Bu amaçla ilacın bağlanma enerjisinin de doğru bir şekilde hesaplanması gerekir. Bu nedenle, moleküler kenetleme çalışmaları moleküler dinamik yöntemlerinden biri olan şemsiye örnekleme ile desteklenmiş ve OTV bağlanma enerjileri PMF eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. On binlerce atomdan oluşan bu sistemin, kararlı bir şekilde şemsiye örnekleme metodu için hazırlanması ve OTV'nin NA'dan doğru bir şekilde uzaklaştırılması zaman ve dikkat isteyen bir süreçtir. Bu doğrultuda, kullanılan kuvvet alanları (CHARMM, AMBER ve GROMOS) ve ilaç molekülünün yük dağılımı gibi simülasyon parametreleri

simülasyonlar ile incelenerek deney sonuçları ile en uyumlu bağlanma enerjilerini veren yöntemlere karar verilmiştir. Sonuçta, moleküler kenetleme ile elde edilemeyen bağlanma eğilimi, şemsiye örnekleme yöntemi içerisinde GROMOS kuvvet alanı için OTV yükünün 0 alınması ve AMBER kuvvet alanı için OTV yükünün +1 alınması durumlarında, deneysel sonuçlar ile büyük oranda uyum göstermiştir. Bu nedenle, bir protein-ligand sisteminde başlangıç konfigürasyonu belirlemede ve ligandın protein üzerinde etkileşim halinde olduğu rezidüleri tespit etmede moleküler kenetleme, iki molekül arasındaki bağlanma dinamiklerinin gerçekçi modellenmesinin yapılabilmesi ve bağlanma enerjilerinin doğru tayini için ise moleküler dinamik yöntemleri ve kullanılacak parametreler önemli hale gelmektedir.

Ayrıca, literatürde gözlenen 150-kavitenin fleksibilitesi üzerinde 50 ns MD simülasyonları da gerçekleştirilmiş ve kavitenin literatür ile uyumlu bir şekilde OTV varlığında kapalı yokluğunda açık konformasyonda bulunduğu gösterilmiştir. NA'yı inhibe edecek yeni ilaçların tasarımında, ilacın kavitedeki pozisyonu ve kaviteye bağlanma enerjisine ek olarak bu kavitenin dinamik davranışlarının da dikkate alınması gerektiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak bu tez kapsamında, günümüz ilaçlarının virüsü bloke edebilme yeteneklerinin belirlenmesi ve böylece etkinliği daha yüksek yeni ilaçların tasarımı için gereken bilgisayar destekli metotların etkinlikleri incelenerek hangi yöntemlerin hangi kullanım amacı için uygun olduğu belirlenmiştir. Böylelikle değişimi önceden tahmin edilmiş virüslerin ilaçlara verdiği tepkiler simülasyonlar ile doğru bir şekilde tahmin/tespit edilebilir, oluşan/oluşabilecek mutasyonların elimizdeki ilaçlara karşı virüse direnç kazandırıp kazandırmadığı belirlenerek önceden gerekli önlemlerin alınmasına yardımcı olunabilir.

Gelecek çalışmalarda, şemsiye örnekleme simülasyonları NA aktif bölgesine bağlanarak OTV stabilitesinde etkisi olduğu bilinen kalsiyum iyonlarını da içerecek şekilde genişletilebilir, MM-PBSA ve LIE gibi yaygın olarak diğer MD metotları ile karşılaştırmaları yapılabilir ve ZMR, PRV ve LNR gibi piyasadaki diğer ilaçların OTV'ye direnç gösteren NA yapıları üzerindeki bağlanma enerjileri aynı yöntemler ile hesaplanarak bağlanma etkinlikleri analiz edilebilir.

KAYNAKLAR

- Amaro, R. E., Swift, R. V., Votapka, L., Li, W. W., Walker, R. C., & Bush, R. M.** (2011). Mechanism of 150-cavity formation in influenza neuraminidase. *Nature communications*, 2, 388.
- Baker, D., & Sali, A.** (2001). Protein Structure Prediction and Structural Genomics, 294 (October), 93–96.
- Balgi, A. D., Wang, J., Cheng, D. Y., Ma, C., Pfeifer, T. A., Shimizu, Y., & Roberge, M.** (2013). Inhibitors of the influenza A virus M2 proton channel discovered using a high-throughput yeast growth restoration assay. *PLoS One*, 8(2), e55271.
- Ballard, C., Winn, M., Ashton, A., Briggs, P., & Eales, M. H.** (2002). *CCP4 NEWSLETTER ON*, (4).
- Ben-David, M., Noivirt-Brik, O., Paz, A., Prilusky, J., Sussman, J. L., & Levy, Y.** (2009). Assessment of CASP8 structure predictions for template free targets. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(S9), 50-65.
- Berendsen, H. J., Postma, J. V., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., & Haak, J. R.** (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*, 81(8), 3684-3690.
- Berendsen, H. J., van der Spoel, D., & van Drunen, R.** (1995). GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer physics communications*, 91(1-3), 43-56.
- Brooks, B. R., Brooks III, C. L., Mackerell Jr, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., & Caflisch, A.** (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545-1614.
- Burgan, M.** (2014). Grip Aşılarının Geliştirilmesi. Vol. 1., Sf. 7&26. Ankara, Türkiye: *TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları*.
- Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M.** (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, 126(1), 014101.
- Chang, M. W., Ayeni, C., Breuer, S., & Torbett, B. E.** (2010). Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS one*, 5(8), e11955.
- Chen, G. S., & Chern, J. W.** (2007). Computer-aided drug design. Drug discovery research: new frontiers in the post-genomic era. *Wiley*, Hoboken, 89-107.
- Chen, P. C., & Kuyucak, S.** (2011). Accurate determination of the binding free energy for KcsA-charybdotoxin complex from the potential of mean force calculations with restraints. *Biophysical journal*, 100(10), 2466-2474.

- Cheng, L. S., Amaro, R. E., Xu, D., Li, W. W., Arzberger, P. W., & McCammon, J. A.** (2008). Ensemble-based virtual screening reveals potential novel antiviral compounds for avian influenza neuraminidase. *Journal of medicinal chemistry*, 51(13), 3878-3894.
- Chothia, C., & Lesk, A. M.** (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *The EMBO journal*, 5(4), 823-826.
- Christen, M., Hünenberger, P. H., Bakowies, D., Baron, R., Bürgi, R., Geerke, D. P., & Peter, C.** (2005). The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1719-1751.
- Collins, P. J., Haire, L. F., Lin, Y. P., Liu, J., Russell, R. J., Walker, P. A., & Gamblin, S. J.** (2008). Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*, 453(7199), 1258.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., & Kollman, P. A.** (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5179-5197.
- Cui, W., Cheng, Y. H., Geng, L. L., Liang, D. S., Hou, T. J., & Ji, M. J.** (2013). Unraveling the allosteric inhibition mechanism of PTP1B by free energy calculation based on umbrella sampling. *Journal of chemical information and modeling*, 53(5), 1157-1167.
- da Silva, A. W. S., & Vranken, W. F.** (2012). ACPYPE-Antechamber python parser interface. *BMC research notes*, 5(1), 367.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., & Liu, S. Q.** (2016). Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 144.
- Durrant, J. D., & McCammon, J. A.** (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*, 9(1), 71.
- Durrant, J. D., Bush, R. M., & Amaro, R. E.** (2016). Microsecond molecular dynamics simulations of influenza neuraminidase suggest a mechanism for the increased virulence of stalk-deletion mutants. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(33), 8590-8599.
- Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sander, C., & Scharf, M.** (1995). The double cubic lattice method: efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, 16(3), 273-284.
- Forli, S., & Olson, A. J.** (2012). A force field with discrete displaceable waters and desolvation entropy for hydrated ligand docking. *Journal of medicinal chemistry*, 55(2), 623-638.
- Furr, B. J. A.** (2006). Milestones in Drug Therapy. Aromatase Inhibitors.
- Garman, E., & Laver, G.** (2005). The structure, function, and inhibition of influenza virus neuraminidase. In *Viral membrane proteins: structure, function, and drug design* (pp. 247-267). Springer, Boston, MA.

- Gibbs, J. W.** (1873). A Method of Geometrical Representation of the Thermodynamic Properties by Means of Surfaces. *Transactions of Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 382-404.
- Gilson, M. K., & Zhou, H. X.** (2007). Calculation of protein-ligand binding affinities. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 21-42.
- Gilson, M. K., & Zhou, H.-X.** (2007). Calculation of Protein-Ligand Binding Affinities. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36(1), 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132550>
- Gubareva, L. V., Kaiser, L., & Hayden, F. G.** (2000). Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet*, 355(9206), 827-835.
- Jagadesh, A., Salam, A. A. A., Mudgal, P. P., & Arunkumar, G.** (2016). Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Archives of virology*, 161(8), 2087-2094.
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J.** (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45), 11225-11236.
- Karthick, V., & Ramanathan, K.** (2014). Insight into the oseltamivir resistance R292K mutation in H5N1 influenza virus: a molecular docking and molecular dynamics approach. *Cell biochemistry and biophysics*, 68(2), 291-299.
- Kästner, J.** (2011). Umbrella sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(6), 932-942.
- Kazemi, S., & Güntert, P.** (2018). *Molecular Dynamics Simulation Tutorial with Answers to Questions*, (Sommersemester), 1–27.
- Lawrenz, M., Wereszczynski, J., Amaro, R., Walker, R., Roitberg, A., & McCammon, J. A.** (2010). Impact of calcium on N1 influenza neuraminidase dynamics and binding free energy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(11), 2523-2532.
- Lemkul, J. A., Allen, W. J., & Bevan, D. R.** (2010). Practical considerations for building GROMOS-compatible small-molecule topologies. *Journal of chemical information and modeling*, 50(12), 2221-2235.
- Li, Q., Qi, J., Zhang, W., Vavricka, C. J., Shi, Y., Wei, J., & He, J.** (2010). The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site. *Nature structural & molecular biology*, 17(10), 1266.
- Lina, B., Boucher, C., Osterhaus, A., Monto, A. S., Schutten, M., Whitley, R. J., & Nguyen-Van-Tam, J. S.** (2018). Five years of monitoring for the emergence of oseltamivir resistance in patients with influenza A infections in the Influenza Resistance Information Study. *Influenza and other respiratory viruses*, 12(2), 267-278.
- Martin, M. G.** (2006). Comparison of the AMBER, CHARMM, COMPASS, GROMOS, OPLS, TraPPE and UFF force fields for prediction of vapor–liquid coexistence curves and liquid densities. *Fluid phase equilibria*, 248(1), 50-55.

- McKimm-Breschkin, J. L.** (2013). Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and other respiratory viruses*, 7, 25-36.
- Mehler, E. L., & Solmajer, T.** (1991). Electrostatic effects in proteins: comparison of dielectric and charge models. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(8), 903-910.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M.** (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- Monasse, B., & Boussinot, F.** (2014). Determination of forces from a potential in molecular dynamics. *arXiv preprint arXiv:1401.1181*.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J.** (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J.** (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- Moscona, A.** (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *New England Journal of Medicine*, 353(13), 1363-1373.
- Nguyen, P. H., Li, M. S., & Derreumaux, P.** (2011). Effects of all-atom force fields on amyloid oligomerization: replica exchange molecular dynamics simulations of the A β 16–22 dimer and trimer. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(20), 9778-9788.
- Nguyen, T. T., Mai, B. K., & Li, M. S.** (2011). Study of Tamiflu sensitivity to variants of A/H5N1 virus using different force fields. *Journal of chemical information and modeling*, 51(9), 2266-2276.
- Nguyen, T. T., Viet, M. H., & Li, M. S.** (2014). Effects of water models on binding affinity: evidence from all-atom simulation of binding of tamiflu to A/H5N1 neuraminidase. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J.** (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9(2), 91-102.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... & Schulten, K.** (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1781-1802.
- Ponder, J. W., & Case, D. A.** (2003). Force fields for protein simulations. *In Advances in protein chemistry* (Vol. 66, pp. 27-85). Academic Press.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), 725.
- Salata, C., Sgarabotto, D., Del Vecchio, C., Solimbergo, E., Marini, G., Nicolè, S., & Palù, G.** (2019). Antiviral treatment and virological monitoring of oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1) pdm09 in a patient with chronic B lymphocytic leukemia. *Journal of Infection and Chemotherapy*.

- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C.** (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3(2), 198-210.
- Schauer, R.** (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal*, 17(7-9), 485-499.
- Schüttelkopf, A. W., & Van Aalten, D. M.** (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(8), 1355-1363.
- Sensoy, O., Almeida, J. G., Shabbir, J., Moreira, I. S., & Morra, G.** (2017). Computational studies of G protein-coupled receptor complexes: Structure and dynamics. In *Methods in cell biology* (Vol. 142, pp. 205-245). Academic Press.
- Sousa, S. F., Ribeiro, A. J., Coimbra, J. T. S., Neves, R. P. P., Martins, S. A., Moorthy, N. S. H. N., & Ramos, M. J.** (2013). Protein-ligand docking in the new millennium—a retrospective of 10 years in the field. *Current medicinal chemistry*, 20(18), 2296-2314.
- Sun, X., Li, Q., Wu, Y., Wang, M., Liu, Y., Qi, J., & Gao, G. F.** (2014). Structure of influenza virus N7: the last piece of the neuraminidase “jigsaw” puzzle. *Journal of virology*, 88(16), 9197-9207.
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M.** (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging infectious diseases*, 12(1), 15.
- Trott, O., & Olson, A. J.** (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- UniProt Consortium.** (2018). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.
- Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P., & MacKerell Jr, A. D.** (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: assignment of bonded parameters and partial atomic charges. *Journal of chemical information and modeling*, 52(12), 3155-3168.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M.** (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering, design and selection*, 8(2), 127-134.
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A.** (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.
- Wang, N. X., & Zheng, J. J.** (2009). Computational studies of H5N1 influenza virus resistance to oseltamivir. *Protein Science*, 18(4), 707-715.
- Weast, R. C.** (1987). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 1st student edition.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., & Assempour, N.** (2017). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D1074-D1082.
- Wu, Y., Qin, G., Gao, F., Liu, Y., Vavricka, C. J., Qi, J., & Gao, G. F.** (2013). Induced opening of influenza virus neuraminidase N2 150-loop suggests an important role in inhibitor binding. *Scientific reports*, 3, 1551.

- Yu, W., & MacKerell, A. D.** (2017). Computer-aided drug design methods. In *Antibiotics* (pp. 85-106). Humana Press, New York, NY.
- Young, A. R., Narita, M., & Narita, M.** (2013). Cell senescence as both a dynamic and a static phenotype. In *Cell Senescence* (pp. 1-13). Humana Press, Totowa, NJ.
- Yusuf, M., Mohamed, N., Mohamad, S., Janezic, D., Damodaran, K. V., & Wahab, H. A.** (2016). H274Y's effect on oseltamivir resistance: What happens before the drug enters the binding site. *Journal of chemical information and modeling*, 56(1), 82-100.
- Zavodszky, M. I., & Kuhn, L. A.** (2005). Side-chain flexibility in protein–ligand binding: the minimal rotation hypothesis. *Protein Science*, 14(4), 1104-1114.
- Zhang, Y.** (2008). Progress and challenges in protein structure prediction. *Current opinion in structural biology*, 18(3), 342-348.
- Url-1** <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))>
alındığı tarih: 14.05.2018
- Url-2** <<https://www.ppd.com/About/About-Drug-Discovery-and-Development>>
alındığı tarih: 20.06.2018
- Url-3** <<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-diagram-flu-virus-structure-showing-major-components-including-lipid-bilayer-matrix-protein-nucleocapsid-created-image54907936>> alındığı tarih: 24.05.2018
- Url-4** <<http://www.fda.gov/>> alındığı tarih: 08.06.2019
- Url-5** <https://www.click2drug.org/directory_HomologyModeling.html>
alındığı tarih: 02.06.2019
- Url-6** <<https://slideplayer.com/slide/5137469/>> alındığı tarih: 04.06.2019
- Url-7** <<http://www.mdtutorials.com/gmx/umbrella/index.html>>
alındığı tarih: 10.06.2019

EKLER

EK 1: S1, R1 ve R2 yapıları için GROMOS96 kuvvet alanı kullanılarak OTV yükünün +1 olduğu durumda elde edilmiş PMF eğrileri.

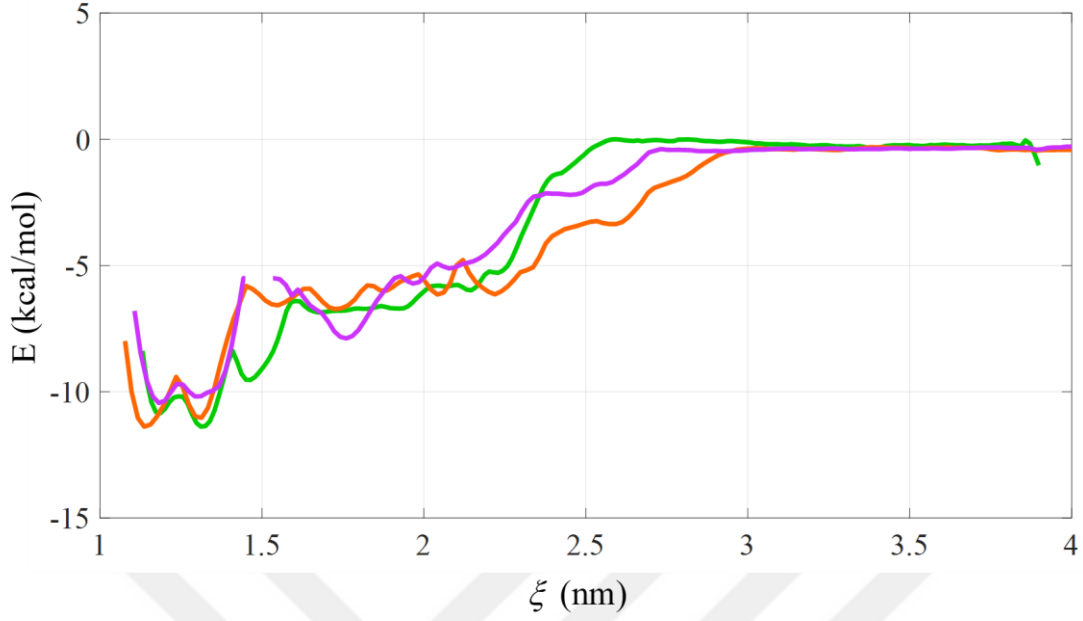
EK 2: S1, R1 ve R2 yapıları için GROMOS96 kuvvet alanı kullanılarak OTV yükünün 0 olduğu durumda elde edilmiş PMF eğrileri.

EK 3: S1, R1 ve R2 yapıları için AMBER99 kuvvet alanı kullanılarak elde edilmiş PMF eğrileri.

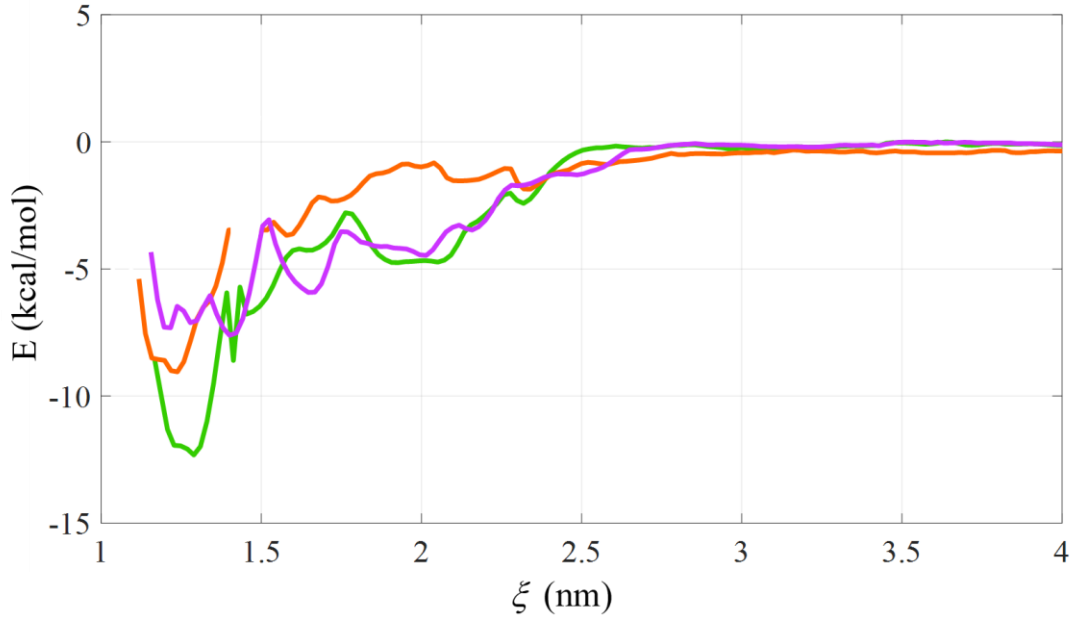
EK 4: S1, R1 ve R2 yapıları için CHARMM36 kuvvet alanı kullanılarak elde edilmiş PMF eğrileri.

EK 5: Pozisyon kısıtlamasız S1, R1 ve R2 yapıları için GROMOS96 kuvvet alanı kullanılarak elde edilmiş PMF eğrileri.

EK 1

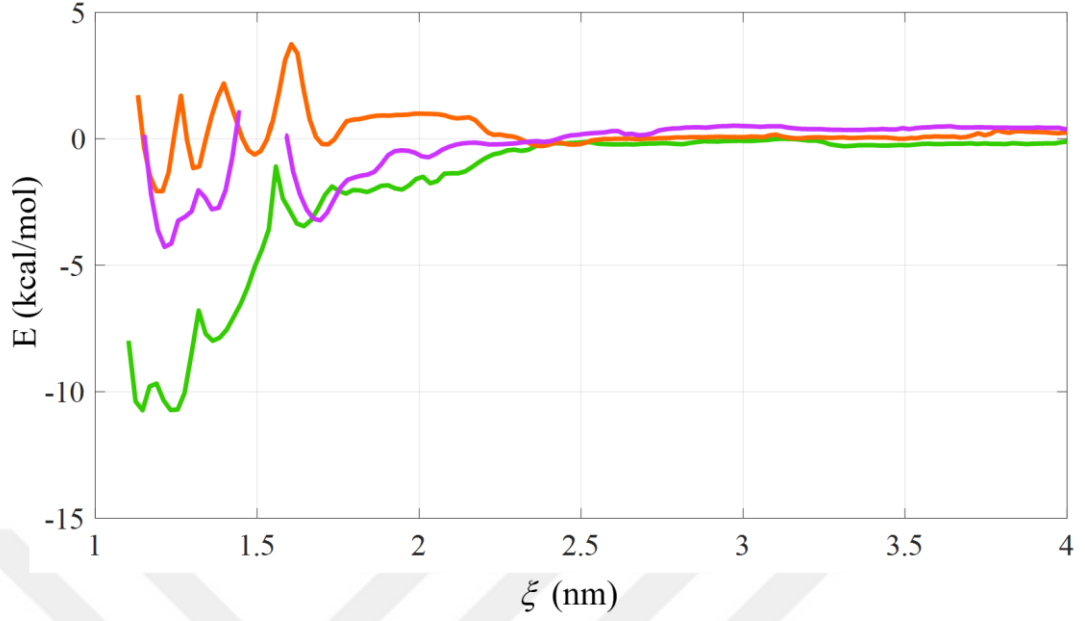


EK 2



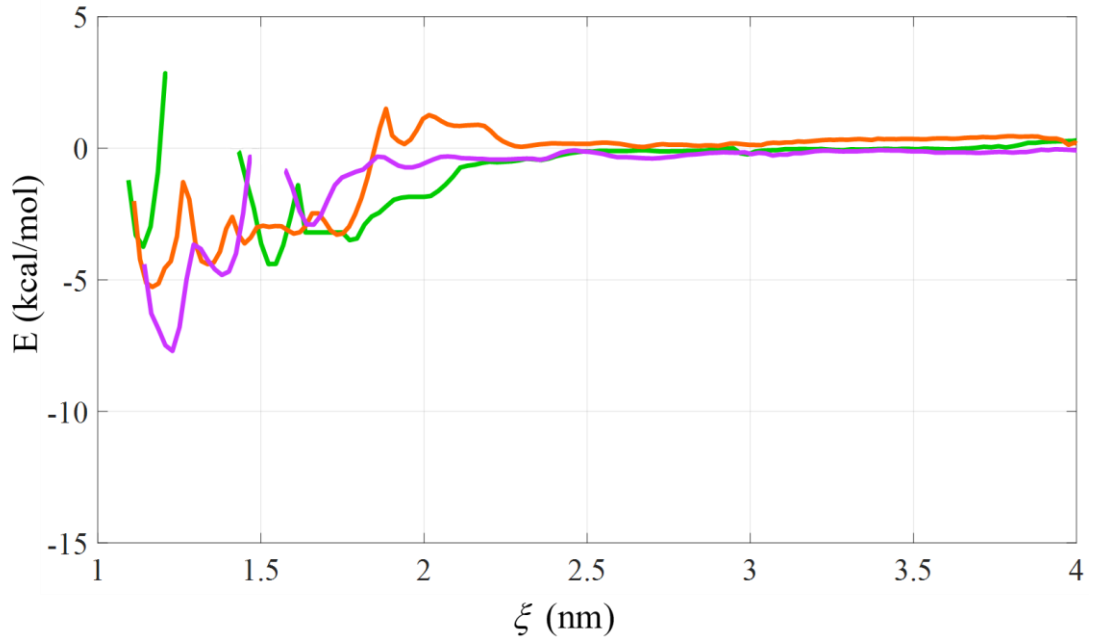
Şekil Ek.2: GROMOS96 kuvvet alanı kullanılarak OTV yükünün 0 olduğu durumda S1 (yeşil), R1 (turuncu) ve R2 (magenta) yapıları için elde edilen PMF eğrileri. R1'in PMF eğrisindeki boşluk, örneklemenin yetersiz olduğu aralığı göstermektedir. ΔG hesaplamalarında bu aralık da dikkate alınmıştır.

EK 3



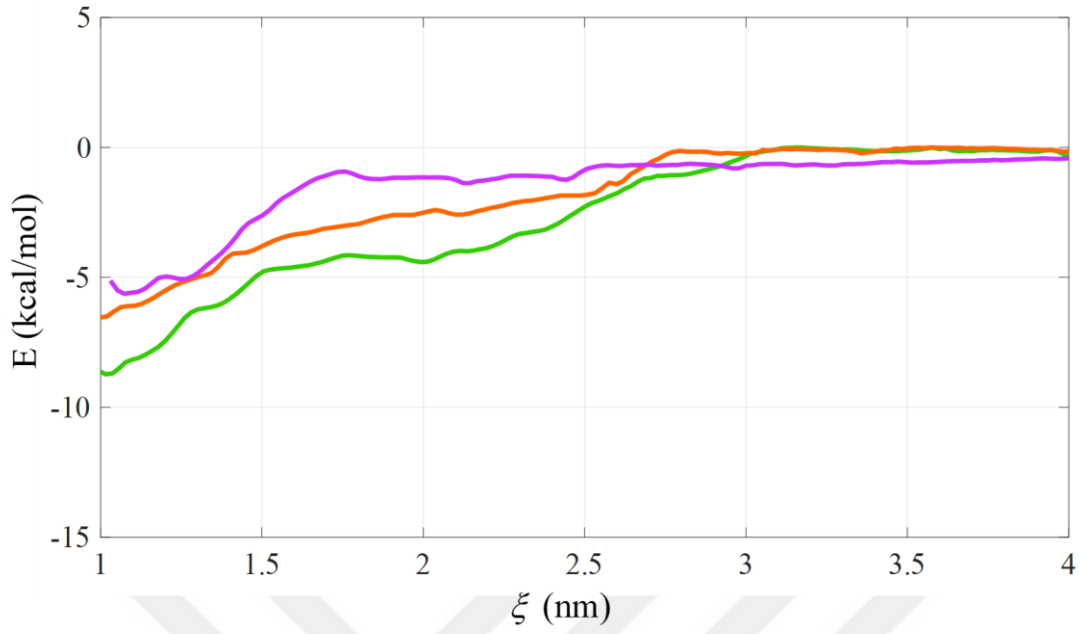
Şekil Ek.3: AMBER99sb kuvvet alanı kullanılarak S1 (yeşil), R1 (turuncu) ve R2 (magenta) yapıları için elde edilen PMF eğrileri. R2'nin PMF eğrisindeki boşluk, örneklemin yetersiz olduğu aralığı göstermektedir. ΔG hesaplamalarında bu aralık da dikkate alınmıştır.

EK 4



Şekil Ek.4: CHARMM36 kuvvet alanı kullanılarak S1 (yeşil), R1 (turuncu) ve R2 (magenta) yapıları için elde edilen PMF eğrileri. S1 ve R2'nin PMF eğrisindeki boşluk, örneklemin yetersiz olduğu aralığı göstermektedir. ΔG hesaplamalarında bu aralıklar da dikkate alınmıştır.

EK 5



Şekil Ek.5: GROMOS96 kuvvet alanı kullanılarak pozisyon kısıtlamasız S1 (yeşil), R1 (turuncu) ve R2 (magenta) yapıları için elde edilen PMF eğrileri.

ÖZ GEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gizem GÖKÇE
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri : 22.03.1992, Kahramanmaraş
E-posta : gizemgokce92@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Yüksek Lisans** : 2019, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği (Tam Burslu, 4.00/4.00)
- **Lisans** : 2016, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği (Ücretli & Özel Başarı Burslu 3.27/4.00)

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

Yıl	Yer	Görevler
2016-2019	Ankara	Tam Burslu Yüksek Lisans Öğrencisi
2017	Ankara	Evrensel Koleji Proje Şenliği Fizik Dalı Gönüllü Juri

Yıl	Yer	Ödüller
2019-2021	Ankara	Fulbright ABD Doktora Eğitim Bursu
2016	Ankara	TOBB ETÜ BMM498 Bitirme Projeleri Birinciliği
2016	Ankara	TOBB ETÜ BMM498 Bitirme Projeleri Poster Birinciliği
2015	Ankara	TOBB ETÜ Lisans Özel Başarı Bursu

YABANCI DİL: İngilizce (Çok iyi), Almanca (Başlangıç)

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **G. Gokce**, E. E. Oren, (2017) “Analysis of Protein-Ligand Interactions via Homology Modeling, Docking and Molecular Dynamics Techniques: Neuraminidase Protein (H1N1 influenza virus) as a Case Study”, Sözlü Sunum, 5th International BAU Drug Design Congress, Istanbul, TÜRKİYE Ekim 19 - 21, 2017
- **G. Gokce**, E. E. Oren, (2017). “Analysis of Protein-Ligand Interactions via Homology Modeling, Docking and Molecular Dynamics Techniques: Neuraminidase Protein (H1N1 influenza virus) as a Case Study”, Poster Sunumu, 5th International BAU Drug Design Congress, Istanbul, TÜRKİYE October 19 - 21, 2017
- **G. Gokce**, E.Candas, E. E. Oren, (2016). “Forecasting Antiviral Drug Resistance Development in Influenza Viruses”, Sözlü Sunum, XXV International Materials Research Congress, Cancun, MEXICO Ağustos 14 - 19, 2016

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

- E.Candas, **G. Gokce**, B. Demir, G. Demirel, E. E. Oren, (2016). “Modeling of Morphological Versatility in Self -Assembly of Val-Ala and Ala-Val”, Sözlü Sunum, Materials Research Society Fall Meeting & Exhibit Boston, MA, ABD Kasım, 29 - December, 4, 2016
- **G. Gokce**, E. E. Oren, (2014). “Examination of H3N2 Influenza A Hemagglutinin Virus Evolution by Mutations”, Poster Sunumu, 8th Aykut Kence Evolution Conference Middle East Technical University (METU), Ankara, TÜRKİYE Nisan 26 - 27, 2014