

**PROTEİN-PEPTİD SİSTEMLERİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK  
SİMÜLASYONU VE SERBEST ENERJİ HESAPLARI: NÖROMÜSKÜLER  
NİKOTİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖRÜNE  $\alpha$ -KONOTOKSİN Sİ  
BAĞLANMA MEKANİZMASI**

**ONUR TUNA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MİKRO VE NANOTEKNOLOJİ**

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

**ARALIK 2014**

**ANKARA**

Fen Bilimleri Enstitü onayı

---

Prof. Dr. Osman EROĞUL  
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

---

Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ  
Anabilim Dalı Başkanı

ONUR TUNA tarafından hazırlanan PROTEİN-PEPTİD SİSTEMLERİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONU VE SERBEST ENERJİ HESAPLARI: NÖROMÜSKÜLER NİKOTİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖRÜNE  $\alpha$ -KONOTOKSİN Sİ BAĞLANMA MEKANİZMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

---

Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ  
Tez Danışmanı

Tez Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Üye : Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ersin Emre ÖREN



## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Onur TUNA

**Üniversitesi** : TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi  
**Enstitüsü** : Fen Bilimleri  
**Anabilim Dalı** : Mikro ve Nanoteknoloji  
**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ  
**Tez Türü ve Tarihi** : YÜksek Lisans – Aralık 2014

**Onur TUNA**

**PROTEİN-PEPTİD SİSTEMLERİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK  
SİMÜLASYONU VE SERBEST ENERJİ HESAPLARI: NÖROMÜSKÜLER  
NİKOTİNİK ASETİLKOLİN RESEPTÖRÜNE  $\alpha$ -KONOTOKSİN Sİ  
BAĞLANMA MEKANİZMASI**

**ÖZET**

Günümüzde ağrı yitimi amaçlı olarak kullanılan moleküllerin başında morfin gelmektedir. Ancak, morfin, sürekli kullanımda bağımlılık yapabileceğinden, kullanımı da riskli olmaktadır. Hem kolay elde edilmesi, hem de ucuz olması nedeniyle henüz bir alternatifi sunulmamıştır. Ancak, morfine alternatif olarak umut vaad eden moleküller doğa tarafından sunulmaktadır. Özellikle, zehirli hayvanların salgıladığı felç edici toksinler, ağrı yitimi amaçlı kullanılabilir peptidlerdir. Söz konusu peptidlerin çalışma mekanizmasının anlaşılması ve bir ilaca dönüştürülmesi deneysel olarak çok pahalı ve uzun bir süreç olsa da, günümüzde bilgisayar teknolojisinin hem donanımsal, hem algoritmik anlamda ulaştığı yer, bu tür çalışmaların yapılmasını mümkün kılmaktadır. Bu tez çalışmasında, morfine alternatif olarak kullanılma potansiyeli olan  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin, bir çok canlıda, nöromüsküler kavşakta bulunan ve kas kasılmasından sorumlu olan nöromüsküler Nikotinik Asetilkolin Reseptör proteiniyle etkileşimi incelendi. Söz konusu protein ve peptidin daha önceden deneysel olarak belirlenmiş 3 boyutlu yapılarından yola çıkarak, muhtemel bağlanma konfigürasyonları oluşturuldu ve dinamikleri incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç Keşfi, Moleküler Dinamik, Ortalama Kuvvet Potansiyeli, Protein-Peptid Etkileşimleri.

**University** : TOBB University of Economics and Technology  
**Institute** : Institute of Natural and Applied Sciences  
**Science Programme** : Micro and Nanotechnology  
**Supervisor** : Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ  
**Degree Awarded and Date** : M.Sc. – ARALIK 2014

**Onur TUNA**

**MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS AND FREE ENERGY  
CALCULATIONS OF PROTEIN PEPTIDE SYSTEMS: BINDING MECHANISM  
OF  $\alpha$ -CONOTOXIN SI TO NEUROMUSCULAR NICOTINIC  
ACETYLCHOLINE RECEPTOR**

**ABSTRACT**

Recently, morphine is the most used molecule for analgesia. However, morphine can be hazardous when it is used regularly because of its addictive nature. It can be obtained easily and its production cost is low. Because of this fact there is no other alternative to morphine. However there molecules with white hope are provided by the nature. Specifically, the toxins produced by venomous animals, are peptides which are able to be used for analgesia. Although investigation of the mechanisms and transforming into a drug of such peptides cost high amounts of money and time by using experimental techniques, the computer technology provides an opportunity to carry out such studies, currently. In this study, the interaction between  $\alpha$ -Conotoxin peptide, which is an alternative to morphine, and neuromuscular nicotinic acetylcholine receptor has been investigated. Most probable bound configurations for these protein and ligand and their bounded dynamics has been investigated.

**Keywords:** Drug Discovery, Molecular Dynamics, Potential of Mean Force, Protein-Peptide Interactions.

## **TEŞEKKÜR**

Deęerli aileme maddi ve manevi hi bir yardımı esirgemedен eğitim hayatım boyunca yanımda oldukları için minnetle teşekkür ederim.

Bu tez çalıŐmasının yürütülmesinde ve oluşumunda desteğini esirgemeyen bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ’a teŐekkürlerimi sunarım.

Simülasyonların yapılmasında sundukları bilgisayar desteğinden dolayı Avustralya Ulusal Hesaplama Altyapı Tesisi’ne (NCI) teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|  |            |
|--|------------|
| <b>ÖZET</b>  | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR</b>  | <b>v</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>   | <b>vi</b>  |
| <b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b>  | <b>ix</b>  |
| <b>TABLULARIN LİSTESİ</b>  | <b>xiv</b> |
| <b>KISALTMALAR</b>   | <b>xv</b>  |
| <b>1 GİRİŞ</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 Motivasyon . . . . .   | 1          |
| 1.2 Asetilkolin Reseptörleri . . . . .   | 4          |
| 1.2.1 Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri . . . . .  | 5          |
| 1.2.2 Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri . . . . .   | 7          |
| 1.2.3 Nöro-Müsküler Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri ve Asetilkolin Etkileşimi . . . . . | 9          |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 1.3      | Konotoksinler . . . . .  | 12        |
| 1.3.1    | $\delta$ -, $\kappa$ -, $\mu$ - ve $\omega$ -Konotoksinler . . . . .   | 13        |
| 1.3.2    | $\alpha$ -Konotoksinler . . . . .  | 14        |
| 1.4      | Nöromusküler Nikotik Asetilkolin Reseptörü ile $\alpha$ -Konotoksin SI Etkileşimi için Yapılmış Çalışmalar . . . . . | 15        |
| <b>2</b> | <b>SİMÜLASYONLAR</b>   | <b>17</b> |
| 2.1      | Kenetlenme Simülasyonları . . . . .  | 18        |
| 2.2      | Moleküler Dinamik Simülasyonları . . . . .   | 26        |
| 2.2.1    | Moleküler Dinamik Simülasyon Tekniği . . . . .   | 26        |
| 2.2.2    | Simülasyonlar . . . . .  | 29        |
| 2.3      | Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesapları . . . . .  | 33        |
| 2.3.1    | Ortalama Kuvvet Potansiyeli . . . . .  | 33        |
| 2.3.2    | Şemsiye Örnekleme . . . . .  | 34        |
| 2.3.3    | Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemi . . . . .   | 34        |
| 2.3.4    | Şemsiye Örnekleme Simülasyonları ve Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesapları . . . . .                                  | 36        |
| <b>3</b> | <b>BULGULAR</b>  | <b>38</b> |
| 3.1      | Kenetlenme Simülasyonları . . . . .  | 38        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.2      | Moleküler Dinamik Simülasyonları . . . . .  | 40        |
| 3.2.1    | D1 Durumu için Simülasyon Analizi . . . . .   | 42        |
| 3.2.2    | D2 Durumu için Simülasyon Analizi . . . . .   | 45        |
| 3.3      | Şemsiye Örnekleme Simülasyonları ve Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesapları . . . . . | 47        |
| 3.3.1    | D1 Konfigürasyonu için Ortalama Kuvvet Potansiyeli Analizi . .                      | 47        |
| 3.3.2    | D2 Konfigürasyonu için Ortalama Kuvvet Potansiyeli Analizi . .                      | 49        |
| <b>4</b> | <b>TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER</b>  | <b>50</b> |
|          | <b>KAYNAKLAR</b>  | <b>56</b> |
|          | <b>EKLER</b>  | <b>67</b> |
|          | <b>A HADDOCK Parametreleri</b>  | <b>68</b> |
|          | <b>B Aktif Amino Asitler</b>  | <b>87</b> |
|          | <b>C Moleküler Dinamik Simülasyon Parametreleri</b>                                 | <b>90</b> |
|          | <b>ÖZGEÇMİŞ</b>   | <b>92</b> |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- 1.1 Morfin molekülünün (solda) 3 boyutlu ve (sağda) kimyasal yapıları [95]. Burada karbon atomları yeşil, azot atomu mavi ve oksijen atomları kırmızı renkle gösterilmiştir. . . . . 2
- 1.2 Koni salyangoz. [88]'den alınmıştır. . . . . 3
- 1.3 Asetilkolin molekülünün (solda) 3 boyutlu ve (sağda) kimyasal yapıları görülmektedir. Burada karbon atomları yeşil, azot atomu mavi, oksijen atomları kırmızı ve hidrojen atomları beyaz renkle gösterilmiştir. Yapı, Avogadro paket yazılımı [96] ile modellenmiştir. . . . . 5
- 1.4 Nörotransmitter moleküllerin çalışma prensibi. [89]'den modifiye edilmiştir. 5
- 1.5 M3 tipi Muskarinik Asetilkolin Reseptörü. (PDB kodu: 4DAJ) . . . . . 6
- 1.6 G-Protein Kenetli Protein. Mavi bölge reseptör proteini ve kırmızı bölge G Proteini göstermektedir. [90]'den modifiye edilmiştir. . . . . 7
- 1.7 Nikotinik asetilkolin reseptörünün yandan görünümü. (PDB kodu: 2BG9) 8
- 1.8 Nikotinik asetilkolin reseptörünün üstten görünümü. (PDB kodu: 2BG9) . 9
- 1.9 Nikotinik Asetilkolin Reseptörünün C-Döngü bölgesi. . . . . 11
- 1.10 Nöromusküler Nikotinik Asetilkolin Reseptöründe Asetilkolin bağlanma bölgelerinin yandan (üstte) ve üstten (altta) görünümü. Burada asetilkolin kırmızı renkte gösterilmiştir. [92]'den modifiye edilmiştir. . . . . 12



|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.11 | Konotoksin çeşitleri ve disülfid bağları. Aralarında disülfid bağı olan sistein amino asitleri aynı renkle gösterilmiştir. Her bir nokta sistein dışında bir amino aside denk gelmektedir. . . . .   | 13 |
| 1.12 | $\omega$ -Konotoksin peptidinde disülfid bağ düğümü. Sarı çizgiler disülfid bağlarını göstermektedir. [97]'den alınmıştır. . . . .   | 14 |
| 1.13 | $\alpha$ -Konotoksin peptidinin 3 boyutlu yapısı. (PDB kodu: 1HJE) . . . . .   | 15 |
| 2.1  | Torpedo Marmorata. Bu canlı benekli elektrikli vatoz olarak bilinir ve Atlas Okyanusu'nda Kuzey Denizi'nden Güney Afrika'ya kadar olan bölgede sığ olan kesimlerde bulunur. [93]'den alınmıştır. . . . .   | 20 |
| 2.2  | nm-nAChR proteininin 3 boyutlu yapısı. N. Unwin tarafından 2005 yılında kriyo-elektron mikroskopisi tekniğiyle çözülmüştür. Sarı renkle gösterilen $\alpha$ -helis kısımlar hücre zarının dışında bulunur. Bu sarı bölgenin alt kısmında bulunan pembe renkli $\beta$ -levha yapılar, hücre zarına gömülü ve hücrenin içinde bulunan kısımlardır. (PDB kodu: 2BG9) . . . . . | 21 |
| 2.3  | $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin 3 boyutlu yapısı. Janes ve ark. tarafından 2003 yılında X-Işınları Kristalografisi tekniğiyle çözülmüştür. (PDB kodu: 1HJE) . . . . .   | 22 |
| 2.4  | nm-nAChR proteininin muhtemel aktif amino asitlerinin (kabartılmış bölge) yandan (sağda) ve üstten (solda) görünümü. (PDB kodu: 2BG9) . . . . .  | 23 |
| 2.5  | D1 sistemi. Görünüm sadece nm-nAChR proteininin $\alpha$ -altbiriminin hücre dışı kısmına aittir ve potansiyel yüzeyi formunda verilmiştir. . . . .  | 25 |
| 2.6  | D2 sistemi. Görünüm sadece nm-nAChR proteininin $\alpha$ -altbiriminin hücre dışı kısmına aittir ve potansiyel yüzeyi formunda verilmiştir. . . . .  | 25 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.7  | Moleküler Dinamik Simülasyonu akış diyagramı. En basit şekliyle bir MD simülasyonunun adımları belirtilmiştir. . . . .   | 27 |
| 2.8  | Kovalent bağ nedeniyle meydana gelen temel etkileşimler. [91]'den modifiye edilmiştir. . . . .   | 29 |
| 2.9  | D1 sisteminin konulduğu su kutusu. $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin ok yönünde çekilmesi amacıyla kutunun x yönündeki bileşeni daha büyüktür.  | 31 |
| 2.10 | D2 sisteminin konulduğu su kutusu. $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin ok yönünde çekilmesi amacıyla kutunun y yönündeki bileşeni daha büyüktür.  | 31 |
| 2.11 | D1 durumu için KOKS eğrisi. . . . .  | 32 |
| 2.12 | D2 durumu için KOKS eğrisi. . . . .  | 32 |
| 2.13 | D1 ve D2 durumlarında $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin x, y ve z koordinatlarında kütle merkezinin zaman içerisinde değişimi. . . . .  | 33 |
| 2.14 | Şemsiye Örnekleme için şematik bir anlatım. Mavi renkli daire, protein ve kırmızı renkli daire ligandı simgelemektedir. [94]'den modifiye edilmiştir. . . . .  | 35 |
| 3.1  | D1 sisteminin kenetlenme simülasyonu sonrası potansiyel yüzeyi (solda) ve katı küreler (sağda) formlarında durumu. Katı küreler formunda gösterilen şekil, bağlanma bölgesinin yakın çevresidir. . . . . | 39 |
| 3.2  | D2 sisteminin kenetlenme simülasyonu sonrası potansiyel yüzeyi (solda) ve katı küreler (sağda) formlarında durumu. Katı küreler formunda gösterilen şekil, bağlanma bölgesinin yakın çevresidir. . . . . | 40 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.3  | D1 sisteminin MD simülasyonu başlangıcında (solda) ve sonundaki (sağda) durumu. . . . .   | 40 |
| 3.4  | D2 sisteminin MD simülasyonu başlangıcında (solda) ve sonundaki (sağda) durumu. . . . .   | 41 |
| 3.5  | HADDOCK puanlandırmasından en yüksek 3. puanı alan sistemin MD simülasyonu başlangıcında (solda) ve sonundaki (sağda) durumu. . . . .   | 41 |
| 3.6  | D1 konfigürasyonu için MD simülasyonlarının son 5 ns'inde oluşan hidrojen bağı sayısı. . . . .  | 42 |
| 3.7  | D1 pozisyonu için MD simülasyonlarının son 5 ns'inde oluşan hidrojen bağı oluşturan amino asitler ve atomlar arası mesafe değişimi. . . . .   | 43 |
| 3.8  | nm-nAChR proteini ile $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi arasındaki elektrostatik etkileşimler. . . . .  | 44 |
| 3.9  | D1 konfigürasyonu için MD simülasyonlarının son 5 ns'inde oluşan hidrojen bağı sayısı. . . . .  | 45 |
| 3.10 | D2 durumu için hidrofobisite haritası. Kahverengi çizgiler proteindeki kovalent bağları, pembe çizgiler, liganddaki kovalent bağları, kesikli çizgiler, yüklü etkileşimleri gösteriyor. Hidrofobik grupların çevresinde birer yay ve bu hidrofobik gruplara yanıt veren atomların çevresinde daha küçük birer yay vardır. . . . . | 47 |



## **TABLULARIN LİSTESİ**

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 2.1 | HADDOCK Puanlandırması sonucu elde edilen 5 yapı ve puanları. . . . . | 24 |
|-----|---|----|

## **KISALTMALAR**

Gly Glisin

Ala Alanin

Val Valin

Leu Lösin

Ile İzölösin

Met Metiyonin

Phe Fenilalanin

Trp Triptofan

Pro Prolin

Ser Serin

Thr Treyonin

Cys Sistein

Tyr Tirozin

Asn Asparajin

Gln Glutamin

Asp Aspartik Asit

Glu Glutamik Asit

Lys Lisin

Arg Arjinin

Hse Histidin

# 1. GİRİŞ

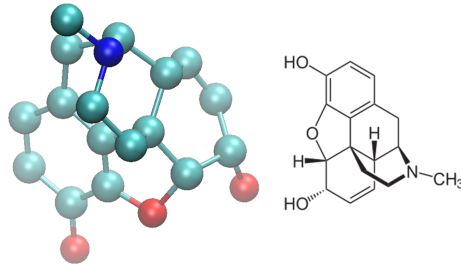
## 1.1 Motivasyon

İlaçlar, tarih boyunca insan sağlığı açısından en önemli gereksinimlerimizden biri olmuştur. Ancak günümüzde ilaç keşfi konusunda hem araştırma maliyeti hem de süreci bakımından yaşanan bir takım sıkıntılar bulunmaktadır. Araştırma maliyetinin yüksek olması, maddi durumu iyi olmayan insanların gerekli ilaçlara ulaşamamasına neden olmaktadır. İlaçlar esasında, vücudumuzda belli bir biyolojik molekülle etkileşime giren, organik ya da organik olmayan, büyüklük olarak bir kısıtlaması bulunmayan moleküllerdir. İnsan vücudunun çok karmaşık bir yapı olduğu düşünülürse, uygun molekülle etkileşime giren bir molekül üretilse bile bu molekülün vücut içinde bulunan başka bir molekülle de etkileşime girme olasılığını belirlemek çok zordur. Bir ilacı üretmek için yapılan deneysel çalışmaların yüksek maliyetlere sahip olması nedeniyle alternatif teknikler geliştirmeden, bu tür çalışmaların devam etmesi imkansızlaşmaktadır. Yakın zamanda hem donanımsal anlamda, hem algoritmik anlamda bilgisayar teknolojisindeki gelişmeleri düşünürsek, bir çok probleme bilgisayar simülasyonlarıyla çözümler üretebilmemiz mümkündür. Bu nedenle yeni bir ilacın üretimi aşamasında bilgisayar simülasyonları, deneysel çalışmalara tamamlayıcı bir rol oynarlar. Bu tez çalışmasında, bilgisayar simülasyonları kullanarak narkotik ve ağrı kesici (analjezik) olarak kullanım imkanı olan bir toksin peptidinin, bir proteine bağlanma mekanizması incelenmiştir.

Günümüzde analjezik olarak kullanılan moleküllerin en etkili olanlarından birisi morfindir [1]. Morfine bu kadar yaygın kullanım özelliği kazandıran, onun doğal olarak bulunmasıdır. Özellikle karasal iklimde ve kolayca yetişen haşhaş bitkisinin çiçek açmadan önce içinde bulunan sıvıda %40 oranında morfin bulunur [2]. Morfinin içinde bulunduğu

bu sınıfın ismi afyondur. Afyonun İngilizce karşılığı olan "opium" kelimesinden dolayı bu sınıfın içindeki moleküllere "opiat" ya da "opioid" denir. Vücudumuzda bu moleküllerin etkileşime girdiği reseptör proteinlerin ismi de "opioid reseptörleri" şeklindedir.

Morfin (Şekil 1.1), merkezi sinir sistemindeki opioid reseptörlerine bağlanarak ağrı yitimi etkisi gösterir. Uzun yıllardır insanlar tarafından morfinin bağlanma mekanizması bilinmeksizin, afyon, ağrı kesici olarak kullanılmıştır. İnsan vücudunda morfin ile aynı işi yapan ve ağrı kesici özelliği gösteren endorfin adında bir molekül üretilmektedir. Bu molekülün ismi "endojen" ve "morfin" kelimelerinin birleşimiyle oluşturulmuş ve morfinden sonra keşfedilmiştir. Aynı işlevi yapan biyolojik yapılara birbirinin agonisti denmektedir. Morfin başka bir deyişle endorfinin agonistidir. Bu yüzden vücuda belli bir sıklıkta morfin alındığında endorfin üretimi azalabilir ya da durabilir [3]. Bu durum morfin bağımlılığına yol açar ve morfin kullanımının ciddi sıkıntılarından birini oluşturur.



Şekil 1.1: Morfin molekülünün (solda) 3 boyutlu ve (sağda) kimyasal yapıları [95]. Burada karbon atomları yeşil, azot atomu mavi ve oksijen atomları kırmızı renkle gösterilmiştir.

Morfine alternatif olarak en umut vaad edici moleküllerden birisi konotoksinlerdir. Konotoksinler, koni salyangozun (Şekil 1.2) salgıladığı zehir sıvısında bulunmaktadır; farklı türler ve farklı homologlara sahiptir. Daha önceki çalışmalar,  $\alpha$ -konotoksin GI,  $\alpha$ -konotoksin MI ve  $\alpha$ -konotoksin SI üzerinde yoğunlaşmıştır. Özellikle  $\alpha$ -konotoksin GI ve  $\alpha$ -konotoksin MI üzerine çalışmalar daha yoğunlukta olmakta, ancak  $\alpha$ -konotoksin



SI ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır [4]. Daha önce yapılan deneysel bir çalışmada,  $\alpha$ -konotoksin GI ve  $\alpha$ -konotoksin MI peptidlerinin bağlanma mekanizmasının  $\alpha$ -konotoksin SI peptidinden daha farklı olduğu bulunmuştur [63]. Bu farklılıkların nedenlerini açıklayabilmek için bağlanma mekanizmalarının anlaşılması çok önemlidir. Konotoksinlerden faydalanılarak geliştirilecek olası bir analjezik için deneysel çalışmalara ek olarak bilgisayar simülasyonlarının kullanılması gerekmektedir. Çünkü deneysel olarak bağlanma mekanizması belirlenemeyeceğinden, mekanizma olmaksızın farklılığın nedenini anlamak imkansızdır.



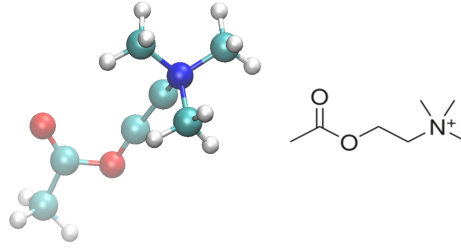
Şekil 1.2: Koni salyangoz. [88]'den alınmıştır.

Bu tezin konusunu  $\alpha$ -konotoksin SI peptidinin nöromüsküler kavşakta hücre membranlarına gömülü olarak bulunan nikotinik asetilkolin reseptör proteinlerine bağlanma mekanizmasının bilgisayar simülasyonlarıyla anlaşılması oluşturmaktadır. Nikotinik asetilkolin reseptörleri, nöron-kas arası sinyal iletiminden sorumlu olduğundan, işleyişleri herhangi bir şekilde bloke edildiğinde bu durum kas kasılmaması ile sonuçlanır. Negatif görünen bu durumdan faydalanarak bir analjezik üretimi mümkündür [5]. Ancak böyle bir analjezik gerçekleştirmek için, bu tezin de konusunu oluşturan  $\alpha$ -konotoksin SI peptidi ve nikotinik asetilkolin reseptör protein arasındaki etkileşim mekanizmasının belirlenmesi zorunludur.

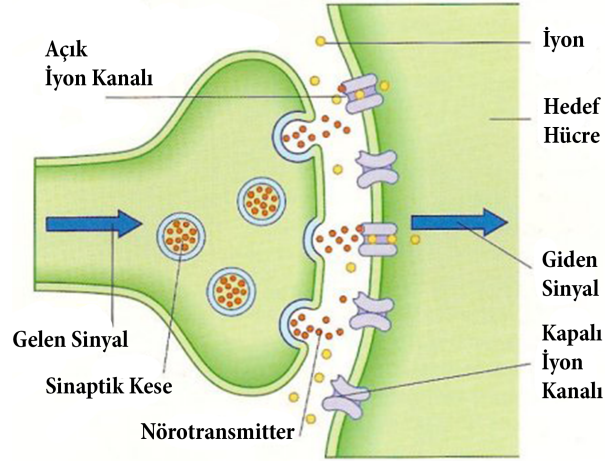
## 1.2 Asetilkolin Reseptörleri

Asetilkolin reseptörleri, asetilkolin molekülünün bağlandığı hücre membranı proteinleridir. Bu proteinler, entegre membran proteinleri sınıfına girerler; çünkü membranın tamamlayıcı bir parçasını oluşturmaktadırlar. Asetilkolin (Şekil 1.3), canlılarda asetilkolinesteraz enzimleri tarafından doğal olarak üretilen [6, 7] küçük bir nörotransmitter moleküldür. Nörotransmitter moleküllerin görevi, sinapslar üzerinden nöronlar arası sinyal iletimini sağlamaktır. Bir ya da birden fazla nörotransmitter molekül, kapalı bir iyon kanalına bağlanarak, kanalın açılmasını sağlar ve böylece kanalın içinden iyon geçişi gerçekleşir. Bu moleküllerin çalışma prosedürü bir diyagram olarak Şekil 1.4'te sunulmuştur.

Asetilkolin reseptörleri ilk olarak Henry Dale tarafından 1915 yılında sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre iki tip asetilkolin reseptörü mevcuttur: muskarinik ve nikotinik asetilkolin reseptörleri. İsimlendirmeler, asetilkolin agonistlerine göre yapılmıştır. Muskarinik asetilkolin reseptörleri için mantarlarda bulunan bir molekül olan muskarin [8] ve nikotinik asetilkolin reseptörleri için tütünde bulunan bir molekül olan nikotin [9], asetilkolinin agonistidir.



Şekil 1.3: Asetilkolin molekülünün (solda) 3 boyutlu ve (sağda) kimyasal yapıları görülmektedir. Burada karbon atomları yeşil, azot atomu mavi, oksijen atomları kırmızı ve hidrojen atomları beyaz renkle gösterilmiştir. Yapı, Avogadro paket yazılımı [96] ile modellenmiştir.

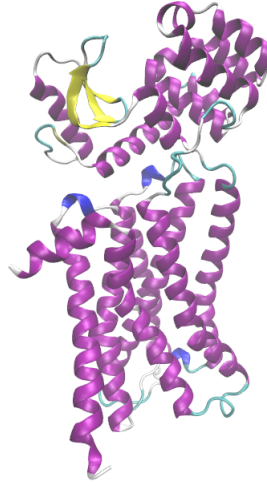


Şekil 1.4: Nörotransmitter moleküllerinin çalışma prensibi. [89]'den modifiye edilmiştir.

## 1.2.1 Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri

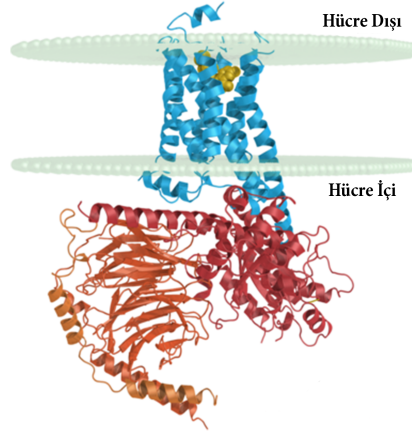
Muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR), merkezi ve periferel sinir sistemindeki nöronlarda ve otonom sinir sisteminde bulunurlar. Görevleri, kalp atması gibi fizyolojik işlevleri düzenlemektir. mAChR proteinleri, tek bir hücrede birden fazla tipte bulunabilirler. Şekil 1.5'te M3 tipi muskarinik asetilkolin reseptörünün Kruse ve arkadaşları

tarafından 2012 yılında X-ışınları tekniğiyle belirlenmiş 3 boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 1.5: M3 tipi Muskarinik Asetilkolin Reseptörü. (PDB kodu: 4DAJ)

mAChR proteinleri, G proteini kenetli reseptörler (GPCR) ailesine üyelerdir [10]. G proteinleri hücre dışı molekülleri hissetme işlevinden sorumludurlar. GPCR proteini bir ligand tarafından uyarılır; bu ligand GPCR proteinine bağlandığında G proteininde konformasyonel bir değişikliğe yol açar. Bu sayede hücre içi sinyal iletimi sağlanır ve hücrel tepkiler ortaya çıkar [11, 12]. Yani bir bakıma hücrenin dışarıyı algılamasını ve buna göre tepki vermesini sağlarlar. G proteinlerinin diğer bir ismi de "7-membran içi" proteinleridir. Bunun nedeni, membranın içinde 7 tur atmalıdır. Bu proteinler sadece ökaryotik hücrelerde bulunurlar . Şekil 1.6'da bir GPCR proteininin 3 boyutlu yapısı bulunmaktadır.

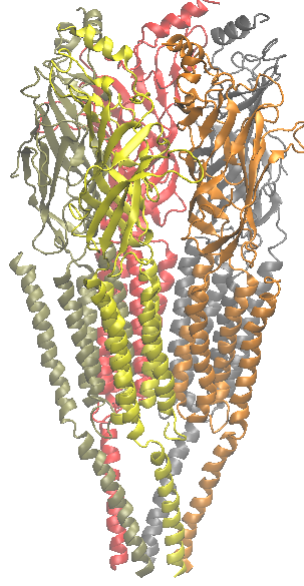


Şekil 1.6: G-Protein Kenetli Protein. Mavi bölge reseptör proteini ve kırmızı bölge G Proteini göstermektedir. [90]'den modifiye edilmiştir.

mAChR proteinlerinin iki bağlanma bölgeleri bulunmakta; bunlar, hücre dışı ve hücre içi olmak üzere, sırasıyla, ligand bağlanma bölgesi ve G proteini bağlanma bölgesidir. Hücre dışında bulunan bölgeleri, amino ucu ve hücre içinde bulunan bölgeleri, karboksil ucudur. Hücre dışındaki bölgeye asetilkolin, muskarin ya da farklı bir agonistin bağlanması reseptörün konformasyonunda değişikliğe neden olarak hücre içinde bulunan G proteini ile etkileşime yol açar ve mAChR proteininin sinyal iletimin mekanizmasının başlangıcını oluşturur.

## 1.2.2 Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR), nöron-kas kavşağında hücre membranına gömülü olarak bulunan ve sinapslar üzerinden sinyal iletimini sağlayan proteinlerdir. Hücre içine  $\text{Na}^+$  iyonunun girmesinden sorumludurlar. Bu yüzden  $\text{Na}^+$  iyon kanallarıdır; aynı zamanda  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarını da geçirdikleri gözlenmiştir [13, 14]. Yapısı Şekil 1.7'de sunulmuştur. Kas kasılması için gerekli olan sinyal iletimi,  $\text{Na}^+$  iyonunun hücre içine girmesiyle sağlanır.

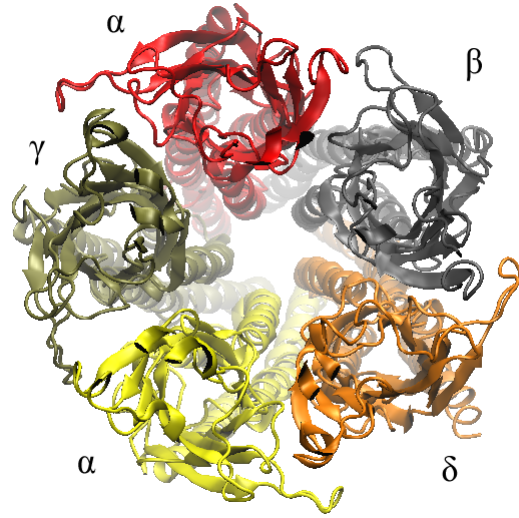


Şekil 1.7: Nikotinik asetilkolin reseptörünün yandan görünümü. (PDB kodu: 2BG9)

nAChR proteini, 5 altbirimden oluşan bir proteindir. Altbirimlerin aynı ya da farklı olmasına göre sırasıyla, homomerik ya da heteromerik şekilde adlandırılan yapılarda bulunur [15]. Bu tezde çalışılan nAChR proteini, heteromerik yapıdadır. Homomerik yapıdaki nAChR proteinleri, beyindeki nöronlarda bulunurlar ve hafıza, düşünme, öğrenme gibi işlevlerden sorumlu oldukları düşünülmektedir [17, 18]. Dolayısıyla bu tezin konusu dışındadırlar. Ayrıca beyinde bulunan nAChR heteromerik yapılarda da bulunabilir. Beyindeki nöronlar üzerinde bulunan homomerik ve heteromerik nAChR proteinleri, nöronal-nAChR ve merkezi sinir sistemindeki nöronlar üzerinde bulunan heteromerik nAChR proteinleri, nöromusküler-nAChR (nm-nAChR) isimlerini alırlar.

nm-nAChR (Şekil 1.8), 4 farklı yapıda bulunan ve toplam 5 adet altbirimden oluşmaktadır. Bu altbirimler,  $\alpha$  altbirimden 2 tane olmak üzere,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  altbirimleridir.  $\delta$  altbirimi,

embriyonik yapılarda  $\epsilon$  altbirimi adında ve  $\delta$  altbirimine göre farklı bir yapıya sahiptir [19]. Ancak, ergen yapılarda bu altbirim yapısal değişikliğe uğrayarak  $\delta$  altbirimine dönüşür. Bu tezde ergin yapıdaki nm-nAChR üzerinde çalışılmıştır.



Şekil 1.8: Nikotinik asetilkolin reseptörünün üstten görünümü. (PDB kodu: 2BG9)

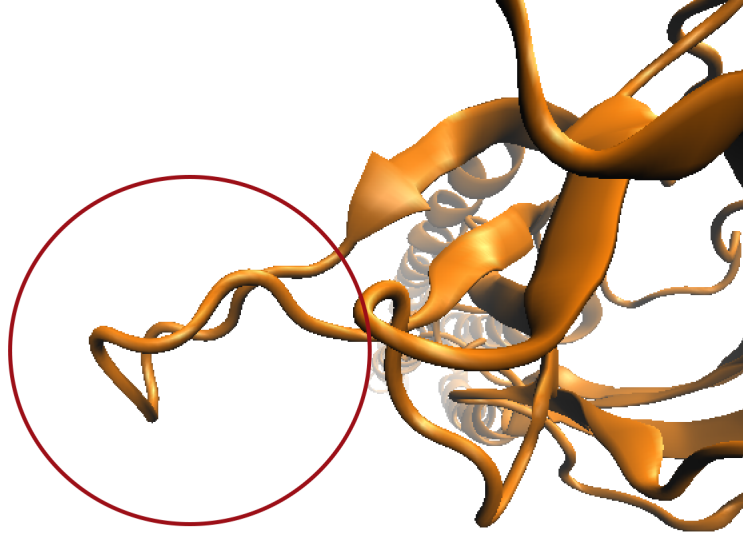
### 1.2.3 Nöro-Müsküler Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri ve Asetilkolin Etkileşimi

Asetilkolin, insan vücudunda bulunan asetilkolinesteraz enzimleri tarafından üretilen küçük moleküllerdir. Üretimi sinaptik bölgede gerçekleşir ve hücre membranına gömülü olan nm-nAChR proteinlerine bağlanarak bu proteinler üzerinde konformasyonel

değişiklikler meydana getirir [20, 21, 22]. Bu konformasyonel değişiklikler nm-nAChR proteininin çapının genişlemesini sağlar ve böylece kas kasılması için gerekli olan sinyal iletimini sağlayan  $\text{Na}^+$  iyonu hücre içine girer. Asetilkolin, nöronlar arası sinyal iletimindeki görevinden dolayı nörotransmitter moleküller arasında yer alır ve alkaloid, yani doğal olarak üretilen bir moleküldür. Asetilkolinin ilk tanımı 1914 yılında İngiliz bilim adamı Henry Hallet Dale tarafından yapılmıştır. Nörotransmitter olduğu 1921 yılında Avustralyalı bilim adamı Otto Lewi tarafından kurbağa kalpleri üzerinde yapılan deneyler sonucu doğrulanmıştır. Bu keşif, 1936 yılında Nobel ödülüyle ödüllendirilmiştir [23].

nm-nAChR proteinlerinin  $\alpha$ -altbirimlerinin hücre dışı bölgelerinde sistein-döngüsü (C-döngüsü) denilen çıkıntılar bulunur (Şekil 1.9). Disülfid bağları nedeniyle, proteinin bu bölgesi konformasyonel değişikliklere çok açıktır [24]. Çünkü, sistein amino asidi polar bir amino asittir ve disülfid bağlarının bulunduğu bölgeye gelecek yeni bir molekül buradaki su molekülleriyle beraber polar olması ya da olmaması nedeniyle önemli değişimlere yol açabilir [25] (Şekil 1.9). Daha önce yapılan çalışmalar, asetilkolin molekülünün nm-nAChR proteini ile etkileşime girmesinde  $\alpha$ -altbirimindeki C-döngüsü bölgesinin aktif olduğunu göstermiştir. 2 ayrı asetilkolin molekülünün nm-nAChR proteinlerinde bulunan 2  $\alpha$ -altbiriminin C-döngüsü bölgeleriyle etkileşime girdiğinde (Şekil 1.10) nm-nAChR proteininin membran içindeki kısmında bir dönme meydana geldiği gösterilmiştir [26, 27, 28]. Bu dönme hareketi sayesinde nm-nAChR proteininin membran içindeki normalde kapalı olan kısmının çapı 6.5 Å'e çıkarak  $\text{Na}^+$  iyonunun kanal içinden geçişine imkan tanınır.

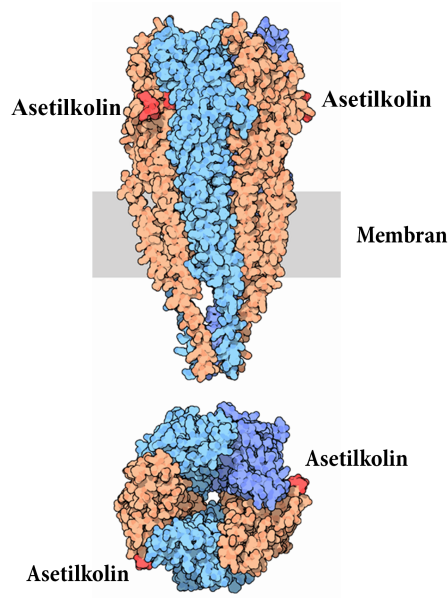




Şekil 1.9: Nikotinik Asetilkolin Reseptörünün C-Döngü bölgesi.

Vücutta asetilkolin molekülünün eksikliği, asetilkolinesteraz enziminin işlev bozukluğunun ya da nikotinik asetilkolin reseptörlerinde bulunan C-döngüsü bölgesindeki yapısal farklılıkların, Parkinson hastalığı gibi kas kasılması kontrolünün ya da Alzheimer gibi zihinsel işlevlerin bozukluğuna dayanan hastalıklara neden oldukları düşünülmektedir [29, 30]. Ayrıca asetilkolin molekülü, kas kasılması işlevinden sorumlu olduğu için vücutta var olan asetilkolin molekülünün nm-nAChR proteinlerine bağlanmasının engellenmesinin felce yol açabileceği gösterilmiştir [31, 32]. Çünkü bu durumda kas kasılması için gerekli olan sinyal iletimi,  $\text{Na}^+$  iyonunun hücre içine girememesiyle birlikte sağlanamaz. Asetilkolin molekülünün nm-nAChR proteinlerine bağlanması, bağlandığı C-döngüsü bölgesine başka bir molekülün daha yüksek afiniteyle bağlanmasıyla beraber engellenebilir. Herhangi bir molekülün işlevini engelleyen moleküllere antagonist denmektedir. Bu tip antagonistlere güzel bir örnek olarak konotoksinler verilebilir. Konotoksinlerin nm-nAChR'deki bağlanma bölgelerinin incelenmesi felç mekanizması ve muhtemel analjezik ilaçların keşfinde önemlidir [33]. Bir konotoksin çeşidi olan  $\alpha$ -konotoksin SI peptidinin

nm-nAChR proteinleriyle etkileşim mekanizması bu tezin konusunu oluşturmaktadır.

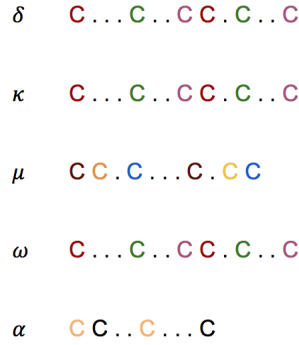


Şekil 1.10: Nöromusküler Nikotinik Asetilkolin Reseptöründe Asetilkolin bağlanma bölgelerinin yandan (üstte) ve üstten (altta) görünümü. Burada asetilkolin kırmızı renkte gösterilmiştir. [92]'den modifiye edilmiştir.

### 1.3 Konotoksinler

Konotoksinler, koni salyangozunun (*Conus*) kendini savunma ve avlanma amaçlı olarak salgıladığı zehrin içinde bulunurlar. Koni salyangozunun ismine hitaben bu ismi almışlardır ve nörotoksin grubuna dahildirler [34]. Genel olarak 10-30 aminoasit içeren küçük peptidlerdir. Yapılarında en az 1 adet disülfid bağı (Şekil 1.11) bulundururlar [35]; 5 ayrı tipte bulunurlar ve bu tiplere hitaben  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$  ve  $\mu$  şeklinde öntakılar alırlar [36]. Her tip konotoksin ayrı bir proteinin inhibitörüdür. Dolayısıyla bu sınıflandırma

da inhibitörü oldukları proteine göre yapılmıştır.  $\delta$ -konotoksinler, voltaj-kapılı sodyum kanallarının [37],  $\kappa$ -konotoksinler, potasyum kanallarının [38],  $\mu$ -konotoksinler, gerilim-kapılı sodyum kanallarının [39],  $\omega$ -konotoksinler, voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının [40] ve  $\alpha$ -konotoksinler, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin inhibitörleridir [41]. Bu tezin çalışma konusunu  $\alpha$ -konotoksinler oluşturmaktadır.

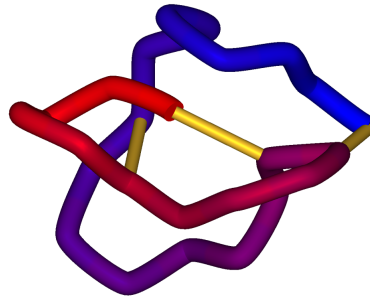


Şekil 1.11: Konotoksin çeşitleri ve disülfid bağları. Aralarında disülfid bağı olan sistein amino asitleri aynı renkle gösterilmiştir. Her bir nokta sistein dışında bir amino aside denk gelmektedir.

### 1.3.1 $\delta$ -, $\kappa$ -, $\mu$ - ve $\omega$ -Konotoksinler

$\delta$ -,  $\kappa$ - ve  $\omega$ -Konotoksinler, yapısında sistein düğümü içeren peptidlerdir. Bu düğümlü yapı 3 adet disülfid bağının iç içe geçmesiyle meydana gelir.  $\omega$ -Konotoksin için disülfid düğümlü bu yapı Şekil 1.12'de gösterilmiştir [42]. Disülfid bağlarından bir tanesi, diğer iki disülfid bağının oluşturduğu döngünün içinden geçer. Bu disülfid bağlarıyla meydana gelen düğümlü yapı  $\delta$ -,  $\kappa$ - ve  $\omega$ -Konotoksinleri için aynıdır.

Yapısal benzerlikleri hemen hemen aynı olsa da, bu 3 peptid farklı reseptör proteinleri inhibe ederler.  $\delta$ -Konotoksinler, voltaj kapılı  $\text{Na}^+$  iyon kanallarının,  $\kappa$ -Konotoksinler, potasyum kanallarının ve  $\omega$ -Konotoksinler, kalsiyum kanallarının inhibitörüdürler.



Şekil 1.12:  $\omega$ -Konotoksin peptidinde disülfid bağ düğümü. Sarı çizgiler disülfid bağlarını göstermektedir. [97]'den alınmıştır.

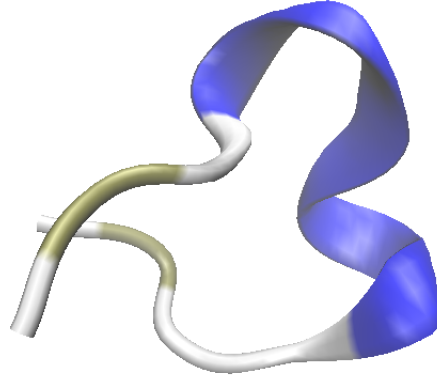
$\mu$ -Konotoksinler, iki farklı sistein düzenlemesine sahiptir. Bu sisteinler  $\delta$ -,  $\kappa$ - ve  $\omega$ -konotoksinler gibi düğümlü bir yapı oluşturmamaktadır [43]. Voltaj-kapılı sodyum kanallarının inhibitörüdürler [44].

### 1.3.2 $\alpha$ -Konotoksinler

$\alpha$ -Konotoksinler, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin inhibitörüdür ve  $\alpha$ -ön takısı, aynı işlevi gören ve yılan zehrinde bulunan  $\alpha$ -Bungarotoksin peptididinden gelmektedir [45]. Genel olarak yapılarında 13-15 aminoasit bulunur ve GI, GIA, GII, MI, MII, SI şeklinde bilinen homologlara sahiplerdir. Öntakılar, buldukları türlere göre verilmektedir. Buna göre G öntakısı, Conus Geographus, M öntakısı, Conus Magus ve S öntakısı, Conus

Striatus'u simgelemektedir [46]. Bu tez çalışmasında Conus Striatus'ta bulunan  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi üzerinde çalışılmıştır ve diğer homologlardan bahsedilmeyecektir.

Şekil 1.13'de  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin X-Işınları tekniğiyle elde edilmiş üç boyutlu yapısı görülmektedir.  $\alpha$ -Konotoksin SI, ICCNPACGPKYSCX sekansı ile verilen, 14 aminoasitli bir peptiddir [47].



Şekil 1.13:  $\alpha$ -Konotoksin peptidinin 3 boyutlu yapısı. (PDB kodu: 1HJE)

## 1.4 Nöromusküler Nikotinik Asetilkolin Reseptörü ile $\alpha$ -Konotoksin SI Etkileşimi için Yapılmış Çalışmalar

nm-nAChR proteini ile  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin etkileştiğinin bilinmesine karşın [61], etkileşimin tam olarak nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir. Bunun yanında, etkileşimdeki aktif aminoasitlerin bulunması için daha önce bir takım mutasyon çalışmaları yapılmıştır [62]. Aynı çalışmada asetilkolin molekülünün, nm-nAChR proteini üzerinde,

iki farklı bağlanma bölgesi olan  $\alpha$  ve  $\gamma$  alt birimleri için  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin  $0.17 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) olmak üzere aynı afiniteyle bağlandığı görülmüştür. Bu durum,  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin gerçek etkileşiminin, nm-nAChR proteininde  $\alpha$  alt birimiyle olduğu düşüncesini güçlendirmektedir. Tüm bunlara ek olarak; daha önce yapılan başka bir çalışmada da  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin,  $\alpha$ -Konotoksin GI ve  $\alpha$ -Konotoksin MI peptidlerine göre bağlanma bölgesinde alt birimler açısından seçicilik davranışının farklı olduğu gösterilmiştir [63]. Söz konusu çalışmada  $\alpha$ -Konotoksin GI ve  $\alpha$ -Konotoksin MI peptidleri, nm-nAChR proteininin  $\alpha$  altbirimleri arasında seçici davranırken,  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi, bu iki altbirim arasında seçici davranmamaktadır. Bu mekanizmayı tam olarak anlamak için deneysel çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Bu tez çalışmasında bu mekanizma üzerinde durulmuş ve bilgisayar simülasyonlarıyla mekanizma incelenmiştir.

## 2. SİMÜLASYONLAR

Protein - ligand etkileşimlerini inceleyebilmek için öncelikle söz konusu protein (nm-nAChR) ve ligandın ( $\alpha$ -Konotoksin SI) birbirlerine bağlı ya da birbirlerinden bağımsız 3 boyutlu yapılarının deneysel olarak elde edilmesi gereklidir. Genel olarak birbirlerinden bağımsız 3 boyutlu yapıları deneysel olarak belirlenmiş yapılar kullanılarak bir kenetlenme simülasyonu ile bağlı oldukları muhtemel pozisyonlar elde edilir. Eğer 3 boyutlu yapı deneysel olarak belirlenmediyse, sözkonusu yapının amino asit diziliminden ve eğer mevcutsa bir takım başka bilgilerden yola çıkarak 3 boyutlu yapı tahmin edilebilir. Bu bilgilerin en önemlisi evrimsel olarak kökenleri aynı olan başka bir proteinin 3 boyutlu yapısıdır. Dolayısıyla söz konusu teknik, "eğer proteinlerin gen dizilimleri yüksek oranda benzerse, yapıları da benzer olmalıdır" [68] fikrini esas alır. Bu şekilde yapılan tahmin tekniğine Homoloji Modelleme ya da Karşılaştırmalı Modelleme [55, 56, 57] denmektedir. Ancak, bu tezde çalışılan biyolojik yapıların 3 boyutlu yapıları deneysel olarak belirlendiğinden herhangi bir Homoloji Modelleme çalışmasına gerek duyulmamıştır.

Protein-peptid yapılarının etkileşimini incelemek için dinamik mekanizmayı anlamak için çok önemlidir. Ancak, elde edilen 3 boyutlu yapılar, birbirlerinden bağımsız olarak elde edilmişse, bu yapıların birbirleriyle etkileşimdeyken sahip olacakları geometrik pozisyonların belirlenmesi gerekmektedir. Günümüzde, birbirinden bağımsız iki protein yapısının, etkileştiğinde sahip olacakları pozisyon ne yazık ki deterministik yöntemlerle belirlenmemektedir. Bu nedenle kenetli yapıları olasılıksal yöntemlerle tahmin etmeyi amaçlayan Kenetlenme (docking) simülasyonları yapılır ve en muhtemel bağlı konfigürasyonlar elde edilir. Ancak, dinamik mekanizmayı açıklamak için bu simülasyonlar yetersizdir. Elde edilen bağlı pozisyonlara Moleküler Dinamik Simülasyonu yapılarak, hem konumların kararlılığı, hem de dinamik mekanizma çözülebilmektedir.

Bu tez çalışmasında, etkileşimi araştırılacak olan iki biyolojik yapıya Kenetlenme Simülasyonları yapılmış (bkz. Bölüm 2.1) ve ardından dinamik mekanizmanın çözülebilmesi için Moleküler Dinamik simülasyonları (bkz. Bölüm 2.2) gerçekleştirilmiştir. Moleküler Dinamik simülasyonlarından elde edilen verilerle bağlanma serbest enerjileri hesaplanmıştır (bkz. Bölüm 2.3).

## 2.1 Kenetlenme Simülasyonları

Kenetlenme (docking) simülasyonları, iki molekülün birbirleriyle etkileşime girdiklerinde nasıl bir geometrik pozisyon (konfigürasyon) alacaklarını tahmin etmek için kullanılan tekniklerdir [48]. Tahmin etmeye dayalı olduğu için stokastiktir ve dinamik bir mekanizmayı açıklamak için fikir vermez. Uzun yıllardır ilgi çeken bir konu olduğundan günümüzde çok gelişmiş algoritmalar ve yazılımlar bulunmaktadır [49]. Genelde yazılımların kullandığı kenetlenme algoritmaları, genetik algoritmalar [50] ya da simulated annealing [51] gibi algoritmaların türevleridir [52]. Belli konfigürasyonları elde ettikten sonra tahmin edilen yapılar, enerji gibi nicelikleri temel alarak olasılıksal hesaplamalarla puanlama fonksiyonları (scoring function) kullanarak bir sıralamaya sokulur [53, 54]. Bu puanlandırmaların durumuna göre dinamik mekanizma çözümlenmeye başlanabilir. Kenetlenme Simülasyonları iki yapı da katı (rigid) olacak şekilde ya da en az birisi esnek (flexible) olacak şekilde yapılabilmektedir. İki yapının da katı olması durumunda, anahtar-kilit modeli kullanılır. Bu modelde, ligandın bağlandığı bölge ve ligandın şekli yapı olarak değişmeden sadece ligandın oryantasyonunu değiştirerek söz konusu bölgeye bağlanması sağlanır. Ancak, bu model her zaman kullanışlı değildir. Zira, ligandın bağlandığı pozisyonlar (anahtarın bağlandığı bölgeler) her zaman ligandın şekline uygun değildir. Bağlanma işlemi, hem ligandın hem de proteinin esnek olmasını gerekli kılmaktadır.



Anahtar-kilit modelinin alternatifi olarak El-Eldiven modeli geliştirilmiştir. Bu modelde, ligand ve ligandın bağlandığı bölge esnektir. Ancak, proteinin diğer bölgeleri katıdır. Bunun yanında protein ligand etkileşimleri su içinde olduğundan suyun etkisi de tüm etkileşimlerde hesaba katılmak zorundadır. Bu şekilde gerçeğe daha yakın bir kenetlenme simülasyonu yapmak mümkündür. Günümüzde pek çok kenetlenme yazılımı olduğu halde tüm bu gereksinimleri karşılayan yazılım bilginiz dahilinde HADDOCK yazılımıdır. Aynı yöntemler protein-protein etkileşimlerinde kullanılmaktadır. HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing) paket yazılımı, büyük biyolojik yapıların etkileşim durumları için bilgi-tabanlı çalışan bir moleküler kenetlenme yazılımıdır [64]. Utrecht Üniversitesi'nde, Alexandre M. J. J. Bonvin ve ekibi tarafından geliştirilmektedir. HADDOCK yazılımının kullanılabilmesi muhtemel bağlanma bölgesi biliniyor olmalı ya da tahmin edilmelidir. Yani bu yazılım ilk prensip teknikleriyle çalışmamaktadır. HADDOCK paket yazılımına bilgi olarak en azından aktif amino asitler verilmelidir.

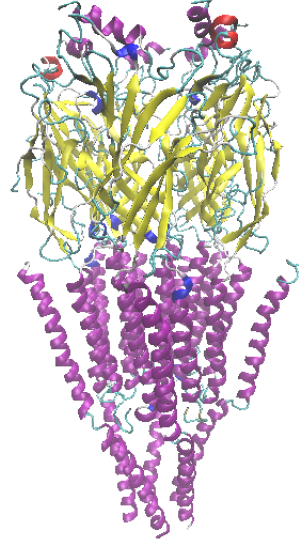
Bu tez çalışmasında kullanılan, nm-nAChR proteininin yapısı 2005 yılında N. Unwin tarafından kriyo-elektron mikroskopisi tekniğiyle yüksek çözünürlüklü olarak çözülmüştür [58]. Bu deneysel çalışmada yapısı çözülen protein, Torpedo Marmorata'dan (Şekil 2.1) alınmıştır. Torpedo Marmorata'nın ya da diğer bir deyişle benekli elektrikli vatozun elektrik organında bu proteinlerden bol miktarda bulunur [59]; elde edilen yapı, Şekil 2.2'de görülmektedir.

$\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin 3 boyutlu yapısı ilk olarak Benie A. J. ve ark. tarafından 2000 yılında Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) tekniği ile çözülmüştür [60]. Ancak bu çalışmada, 2003 yılında Janes ve ark. tarafından X-Işınları Kristalografisi tekniğiyle 0.75 Å çözünürlükte belirlenen 3 boyutlu yapı (Şekil 2.3), kullanılmıştır.



Şekil 2.1: Torpedo Marmorata. Bu canlı benekli elektrikli vatoz olarak bilinir ve Atlas Okyanusu'nda Kuzey Denizi'nden Güney Afrika'ya kadar olan bölgede sığ olan kesimlerde bulunur. [93]'den alınmıştır.

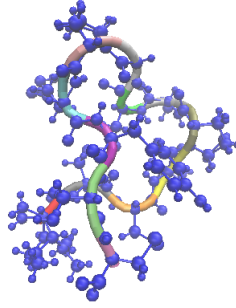
$\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin felç edici etkisi bilindiğinden ilk bakışta en mantıklı senaryonun, söz konusu peptidin nm-nAChR proteini üzerindeki asetilkolin bağlanma bölgesine bağlanarak, asetilkolin molekülünün nm-nAChR proteiniyle etkileşimini engellemesi olduğu açıktır. Ancak, daha önce bahsedilen mutasyon çalışmasında bulunan nm-nAChR proteininin  $\alpha$  altbirimleri arasında seçicilik göstermemesi davranışı bu senaryonun tamamen değiştirilmesini ya da var olan senaryoya bir takım düzeltme ya da ekler yapılması gerektiğini açıkça göstermektedir. Çünkü, çalışmalar göstermiştir ki, mekanizma makroskobik düzeyde gözlemlenerek açılacak bir mekanizma değildir. Bu mekanizmayı açıklayabilmek için ilk yapılması gereken, söz konusu iki biyolojik yapının en uygun bağlanma konfigürasyonlarını elde edip, bu konfigürasyonların fiziksel özelliklerini açıklamaktır. Bu amaç doğrultusunda bu tez çalışmasında, N. Unwin tarafından 2005 yılında Torpedo Marmorata'dan çıkarılarak 3 boyutlu yapısı belirlenen nm-nAChR proteininin, X-Işınları tekiğiyle belirlenen  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin 3 boyutlu yapısıyla olası etkileşim konfigürasyonları HADDOCK paket yazılımı [64] kullanarak elde edilmiştir. Elde edilen konfigürasyonlardan olasılık olarak en muhtemel olanların fiziksel özellikleri incelenmiştir.



Şekil 2.2: nm-nAChR proteininin 3 boyutlu yapısı. N. Unwin tarafından 2005 yılında kriyo-elektron mikroskopisi tekniğiyle çözülmüştür. Sarı renkle gösterilen  $\alpha$ -helis kısımlar hücre zarının dışında bulunur. Bu sarı bölgenin alt kısmında bulunan pembe renkli  $\beta$ -levha yapılar, hücre zarına gömülü ve hücrenin içinde bulunan kısımlardır. (PDB kodu: 2BG9)

Bu tez çalışmasında daha önceden belli olan bilgilerden yola çıkarak nm-nAChR proteini ve  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi üzerinde bulunan muhtemel aktif aminoasitler HADDOCK paket yazılımına bilgi olarak verilmiştir. Kenetlenme simülasyonları için kullanılan tüm parametreler EK A'da bulunmaktadır. Aktif amino asitlerin belirlenme işlemini biraz açmak gerekirse;  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin felç edici etkisi bilinmektedir. Dolayısıyla nm-nAChR proteini üzerindeki asetilkolin bağlanma bölgesindeki aminoasitler muhtemel aktif aminoasitlerdir. Buna ek olarak,  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin nm-nAChR proteininin  $\alpha$  altbirimleri arasındaki seçilim davranışı da başka bağlanma bölgeleri olduğuna işaret etmektedir ve nm-nAChR proteininin  $\alpha$  altbiriminin dış duvarındaki bütün aminoasitlerin

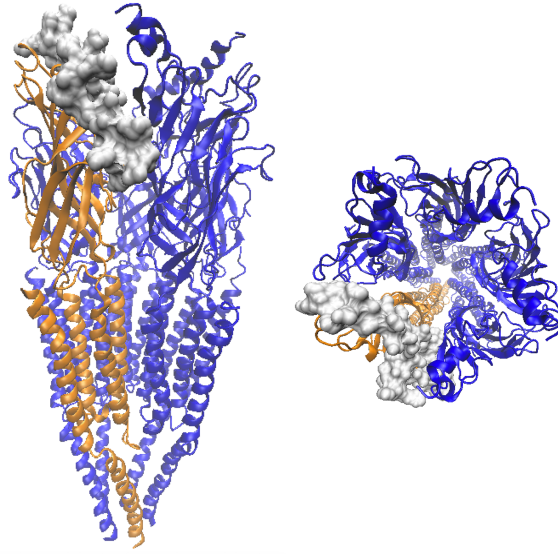
muhtemelen aktif olabileceği hesaba katılmalıdır. Şekil 2.4'te sözkonusu bölge belirtilmiştir. Bu aminoasitler,  $\alpha$  altbiriminin 1 - 28, 148 - 154, 189 - 197 numaralı aminoasitleri olmak üzere toplamda 42 tanedir. Sözkonusu aminoasitlerle ilgili detaylı bilgi Ek B'de verilmiştir.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi üzerindeki bütün amino asitlerin de aktif olduğu varsayılmıştır. Çünkü, literatürde hangi aminoasitlerin bağlanmadan sorumlu olduğu net olarak bilinmemektedir. Aktif amino asit bilgisi, tarama bölgesini daraltarak özellikle büyük yapılı moleküllerin etkileşimi sözkonusu olduğunda, simülasyon zamanını önemli ölçüde azaltmaktadır.



Şekil 2.3:  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin 3 boyutlu yapısı. Janes ve ark. tarafından 2003 yılında X-Işınları Kristalografisi tekniğiyle çözülmüştür. (PDB kodu: 1HJE)

Kenetlenme Simülasyonlara başlamadan önce, aynı kenetli yapıyla Moleküler Dinamik simülasyonlarına devam edileceği için, öncelikle molekülün küçültülmesi gerekmektedir. nm-nAChR proteini çok büyük bir yapıya sahip olduğu için, simülasyon sırasında protein ve peptid dışında çok sayıda su molekülü ve bir lipid tabaka konulması gerekebilir. Ancak, proteinin hücre dışı kısmının en yüksek noktası, lipid tabakasından 73 Å uzaktadır. Bölüm 2.2.2'de detaylı bahsedildiği üzere, Coulomb ve Lennard-Jones potansiyeli kesmelerinin 12 Å alındığı düşünülürse, lipid tabakasının bulunduğu bölgedeki etkileşimler herhangi bir şekilde önemli olmayacaktır. Çünkü, buradaki etkileşimlerde yapılan hesaplamalar

bu bölgenin kendi içinde kalacaktır. Bu yüzden hücre dışında kalan protein kısmını kesmekte bir kusur yoktur. Dahası yapı küçüleceğinden sisteme eklenecek su miktarı da azalacağından hesaplama zamanından olabildiğince tasarruf sağlanmıştır. Bu şekilde düzenlenmiş yapıyla HADDOCK simülasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.4: nm-nAChR proteininin muhtemel aktif amino asitlerinin (kabartılmış bölge) yandan (sağda) ve üstten (solda) görünümü. (PDB kodu: 2BG9)

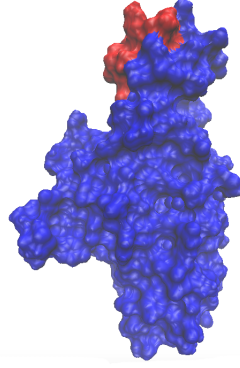
HADDOCK simülasyonları sonucunda bir takım muhtemel bağlı durumlar elde edilir. HADDOCK paket yazılımı puanlandırmayı Van der Waals, elektrostatik, desolvasyon, titreşim enerjileri ve gömülü yüzey alanı üzerinden yapar. Genelde bağlanma bölgesinden çok emin olunan durumlarda ya da sözkonusu notlandırma sonrası elde edilen durumlar arası puan farkı çok yüksekse, en iyi puanı (HADDOCK puanı en küçük yapı en yüksek olasılıklı yapıdır) almış olarak tabir edilebilecek yapılar üzerinde çalışmaya devam edilebilir. Bu tez çalışmasında yapılan simülasyonlar sonucunda 2 durum, diğerlerine göre daha yüksek ve birbirlerine çok yakın notlar almışlardır; ancak, bağlanma bölgesi

net olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla söz konusu 2 durumu da incelemek gereklidir. Yapıların bir tanesi asetilkolin bağlanma bölgesinde ve bir beklenmeyen bir bölgededir. Tahmin edilmeyen bölgeye bağlı olan durum, HADDOCK notlandırmasından en yüksek notu almıştır. Fakat, diğer durum da hemen hemen aynı notu almasına rağmen, notlandırma ikinci sıradadır (Tablo 2.1).

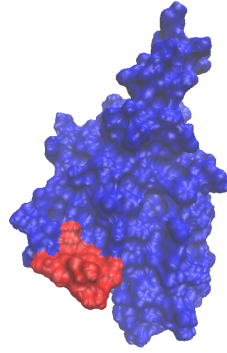
Tablo 2.1: HADDOCK Puanlandırması sonucu elde edilen 5 yapı ve puanları.

|         | HADDOCK-Puanı | Z-Puanı | Küme Sayısı |
|---------|---------------|---------|-------------|
| 1. Yapı | -83.6         | -1.3    | 89          |
| 2. Yapı | -78.6         | -1.1    | 60          |
| 3. Yapı | -51.5         | 0.4     | 10          |
| 4. Yapı | -51.1         | 0.4     | 4           |
| 5. Yapı | -38.7         | 2.1     | 4           |

HADDOCK puanlandırmasından en yüksek puanı alan yapı Şekil 2.5'te görülmektedir. Bu yapının en yüksek puanı alması beklenmemektedir; çünkü bu pozisyonda ligand, asetilkolin bağlanma bölgesinde değildir ve proteinin üst kısmındadır; yani asetilkolin bağlanma bölgesine etki etmesi beklenmemektedir. Ancak, iki molekülün bağlanma mekanizması için iyi bir senaryoya neden olabilir fikriyle bu yapının simülasyonunu yapıp incelemek önemlidir. Notlandırmanın ikinci en yüksek puanı alan pozisyon da Şekil 2.6'da görülmektedir. Elde edilen pozisyon, asetilkolinin bağlanma bölgesine denk geldiğinden notlandırmada ikinci sırada olması dışında şaşırtıcı değildir. Çünkü, asetilkolinin bağlanma bölgesi ve peptidin felç edici etkisi gibi literatürdeki bilgilere göre, böyle bir konfigürasyon beklenmektedir. Bu pozisyonlar, HADDOCK puanlandırmasındaki sıralarına göre sırasıyla D1 ve D2 durumları olarak nitelendirilmiştir.



Şekil 2.5: D1 sistemi. Görünüm sadece nm-nAChR proteininin  $\alpha$ -altbiriminin hücre dışı kısmına aittir ve potansiyel yüzeyi formunda verilmiştir.



Şekil 2.6: D2 sistemi. Görünüm sadece nm-nAChR proteininin  $\alpha$ -altbiriminin hücre dışı kısmına aittir ve potansiyel yüzeyi formunda verilmiştir.

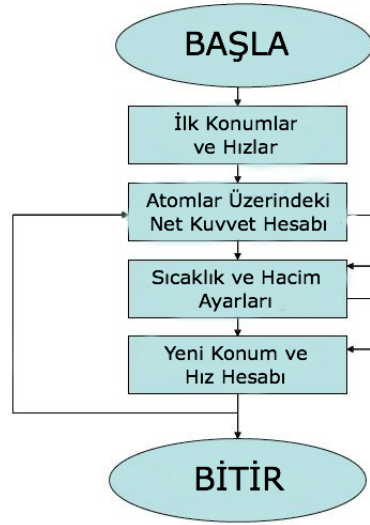
## 2.2 Moleküler Dinamik Simülasyonları

### 2.2.1 Moleküler Dinamik Simülasyon Tekniği

Moleküler Dinamik (MD) simülasyon tekniği, çok parçacıklı sistemlerin zaman içindeki hareketlerini, klasik fizik yöntemleriyle araştırmayı amaçlayan bir tekniktir [65, 66]. Belirli bir süre içinde birbirleriyle etkileşen parçacıkların hareket denklemleri nümerik olarak çözülür ve trajektorileri belirlenir [67]. Burada trajektori, her zaman adımında elde edilen parçacık koordinatlarının belli bir zaman aralığında bütününi temsil etmektedir. Newton mekaniğinde, her parçacığın üzerindeki potansiyel hesaplanır ve bu potansiyelden yola çıkarak parçacığın üzerindeki net kuvvet bulunur. Bulunan bu net kuvvet yardımıyla Newton'un ikinci yasası kullanılarak parçacığın hareketini belirleyen fonksiyon nümerik olarak çözülür.

MD, ilk olarak 1950'lerde ortaya çıkmıştır ve günümüzde biyolojik yapılar gibi çok atomlu ve karmaşık sistemlerde yaygınca kullanılan bir tekniktir. Şekil 2.7'de normal bir MD simülasyonunun işleyişi gösterilmiştir. Şekil 2.7'den de görülebileceği gibi, simülasyona başlamadan önce bilinmesi gereken en önemli faktör atomların ilk konumlarıdır. Bu konumları elde etmenin pratik ve teorik bir çok yolu vardır. Bu tez çalışmasında kullanılan yapıların atom koordinatları daha önce bahsedildiği gibi deneysel olarak elde edilmiştir. Günümüzde teorik yöntemler her ne kadar çok güçlü olsa da, ilgilenilen molekülün yapısının deneysel olarak belirlenmesi en iyi yaklaşımdır. Biyolojik yapıların 3 boyutlu yapılarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan iki deneysel teknik vardır: NMR ve X-Işınları Kristalografisi. İki teknikten keskinlik olarak daha iyi olanı, X-Işınları Kristalografisidir.





Şekil 2.7: Moleküler Dinamik Simülasyonu akış diyagramı. En basit şekliyle bir MD simülasyonunun adımları belirtilmiştir.

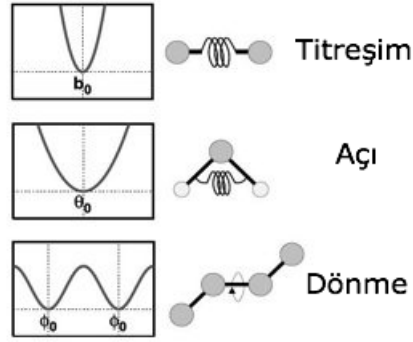
Bu çalışmada kullanılan biyolojik yapıların 3 boyutlu yapıları X-Işınları Kristalografisiyle elde edilmiş ve nm-nAChR proteininin yapısının daha iyi anlaşılması için Unwin tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada kriyo-elektron mikroskopisi tekniğiyle çözünürlüğü artırılmıştır. nm-nAChR proteini çok karmaşık bir yapıya sahiptir ve hücre zarı içine gömülüdür. Dolayısıyla bu tip proteinlerin yapısının anlaşılması çok zordur ve teorik olarak modellenmesi her zaman doğru sonuç vermeyebilir. Bunun yanında, söz konusu proteine ligand olarak bağlanan  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin X-Işınları Kristalografisi tekniğiyle 0.75 Å çözünürlükte 3 boyutlu yapısı belirlenmiştir.

Herhangi bir MD simülasyonuna başlamak için atomların ilk konumlarını bilmek genelde yeterlidir. Ancak, simülasyonun ilerleyebilmesi için bilinmesi gereken önemli bir diğer husus da atomların ilk hızlarıdır. Atomların ilk hızlarını bilemeyiz. Bunun yerine Maxwell-Boltzmann dağılımına [69] uyacak şekilde her atoma rastgele bir ilk hız dağıtılır. En basit şekilde bir MD simülasyonuna artık bu şekilde başlanabilir. Bundan

sonraki adımda her atom için tek tek kendisi üzerindeki potansiyel hesaplanır ve buradan üzerindeki net kuvvet hesaplanır. Newton'un ikinci yasası yardımıyla da o atomun hareketi belirli zaman aralıklarıyla bulunduğu konumlar üzerinden görülebilir. Bu süre içinde sistemle ilgili basınç, sıcaklık, enerji gibi bir çok fiziksel özelliğin değişimini hesaplamak mümkündür.

MD simülasyonlarında önemli konulardan biri de atomun üzerindeki potansiyelin nasıl hesaplanacağıdır. Atomik seviyede, klasik mekanikte olmayan bir çok farklı etkileşim mevcuttur [70, 71]. Bu etkileşimler hem atomlar arası bağlardan, hem de yüklerinden ve bunların konumlanmasından kaynaklanabilir. En temel olarak bir atomun üzerindeki potansiyelde 5 farklı etkileşimden bahsedebiliriz. Bu etkileşimlerden, moleküldeki atomların arasında bulunan kovalent bağlardan kaynaklanan, dönme, torsiyon ve makas hareketleri olarak adlandırılabilir. Bu etkileşimler sadece arasında kovalent bağ olan atomlarda bulunur ve şematik olarak Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Arasında bağ olmayan atomlar da yüklerinden ve bu yüklerin dağılımından kaynaklanan Coulomb etkileşimi ya da Lennard-Jones etkileşimine sahip olabilirler. Lennard-Jones etkileşimi bütün atomlar arasında bulursa da, net yükü sıfır olan atomlarda Coulomb etkileşimi bulunmaz.

Günümüzde MD simülasyonları için bir çok yazılım hem ticari hem akademik kullanım amaçlarıyla bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics) paket yazılımı [72] kullanılarak MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. NAMD paket yazılımı, Illinois Üniversitesi'nde, uzun yıllardır geliştirilen güçlü bir MD yazılımıdır. Yazılımlara ek olarak kullanılan potansiyeller de farklı özelliklere sahip olacak şekilde geliştirilmektedir. Potansiyellerin sahip olacağı özellikleri sistemin türü belirlemektedir. Daha önce bahsedildiği üzere temel etkileşimlerin yanında, özellikle de atomik düzeyde



Şekil 2.8: Kovalent bağ nedeniyle meydana gelen temel etkileşimler. [91]'den modifiye edilmiştir.

çalışırken, bir çok düzeltme terimi çalışılan sistemin türüne göre gereklidir. Bu çalışmada, atomlar üzerindeki potansiyelin hesaplanması için CHARMM22 (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) potansiyeli [73] kullanıldı. CHARMM22 potansiyeli özellikle hücre zarına gömülü proteinleri çalışmak için uygundur. Oluşturulan sistemde herhangi bir lipid olmamasına rağmen CHARMM22 potansiyelinin kullanımı uygundur. Normalde lipid olması durumlarında bu potansiyelin önemi daha da artar. Ancak, lipid olmadığı durumlarda sadece lipidlerle ilgili terimler hesaba katılmaz. Ayrıca bu kullanılan potansiyelde CMAP düzeltmesi de [74] mevcuttur. CMAP düzeltmesi bir dihedral enerji teriminin potansiyel fonksiyonuna eklenmesiyle ilgilidir. Protein ve peptid yapılarının özellikle uzun MD simülasyonlarında CMAP düzeltmesi kullanılması gereklidir [87].

## 2.2.2 Simülasyonlar

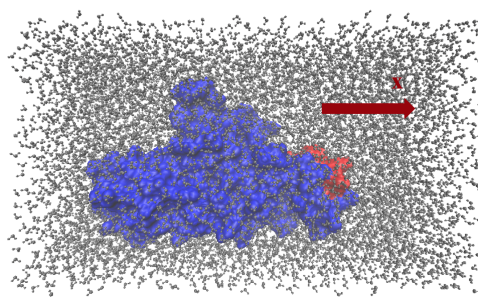
MD simülasyonları iki ayrı durum için sırayla gerçekleştirilmiştir. Her bağlı durumu su kutusuna konulmuş ve particle-mesh Ewald toplamı için periyodik sınır koşulları uygulanmıştır. Kutuların büyüklüğü komşu moleküllerle etkileşime izin vermeyecek oranda seçilmiştir. Periyodik sınır koşulları, sisteme sonsuz büyüklük kazandırır [75]. Her köşe birbirine bağlanır ve bu şekilde yapılan hesaplama su içinde homojen olarak dağılmış

protein-ligand sistemlerine eşdeğerdir. Her durum için kutuların büyüklüğü dışında bütün MD parametreleri aynı seçilmiştir.

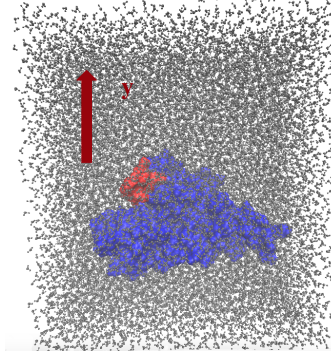
Simülasyonlar, NAMD paket yazılımının 2.9 sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiş ve potansiyel fonksiyonu olarak CHARMM potansiyelinin CMAP düzeltmeli PARAM22 sürümü kullanılmıştır. Periyodik sınır koşulları, NPT istatistiksel kümesi ile oluşturulmuştur. NPT istatistiksel kümesinde, parçacık sayısı, basınç ve sıcaklık sabittir [76]. Sıcaklık, Langevin piston yöntemiyle [77] 298 K olacak şekilde ayarlanmıştır. Langevin katsayısı  $5 \text{ ps}^{-1}$  olarak seçilmiş ve basınç 1 atm'de sabit tutulmuştur. Elektrostatik etkileşimler, particle-mesh Ewald algoritmasıyla [78] hesaplanmıştır. Bağımsız etkileşimler (elektrostatik ve Lennard-Jones etkileşimleri), 12 Å'de azaltarak kesilmiştir. Zaman adımı 2 fs olarak seçilmiştir. Hidrojenin titreşim frekansından dolayı en fazla bu zaman adımıyla integrasyon işlemi yapılmalıdır. Trajektori çıktıları 1 ps aralıklarla kaydedilmiştir. Simülasyon sırasında kullanılan tüm parametreler Ek C'de verilmiştir.

D1 durumunun konulduğu su kutusu Şekil 2.9'da görülmektedir. Su kutusu, simülasyon sonunda ligandın ortalama kuvvet potansiyelini hesaplamak için kullanılacak Şemsiye Örnekleme (ŞÖ) yöntemi için bir ucu daha uzun şekilde oluşturuldu (bkz. Bölüm 2.3.2). Diğer durum için de kutu oluşturulurken şekil bu amaca yönelik olarak oluşturulmuştur.

D1 konfigürasyonunda kutunun boyutları  $110 \times 65 \times 40 \text{ Å}^3$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde sistem önce 5 ns sürede NPT dengesine getirilmiş ve 20 ns boyunca üretim simülasyonu yapılmıştır. Aynı şekilde D2 konfigürasyonu için de  $95 \times 110 \times 50 \text{ Å}^3$  boyutlarında bir kutu oluşturulmuştur (Şekil 2.10) ve sistem 2 ns'de dengeye getirildikten sonra 20 ns üretim simülasyonu yapılmıştır.

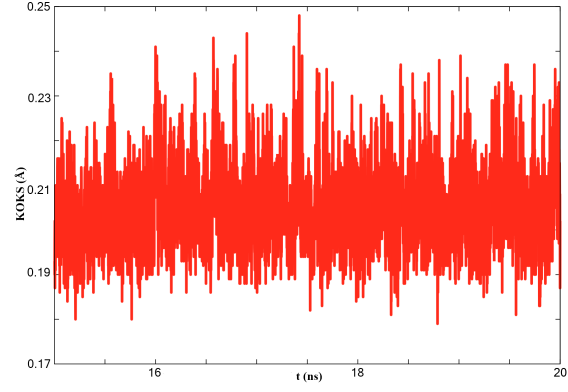


Şekil 2.9: D1 sisteminin konulduğu su kutusu.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin ok yönünde çekilmesi amacıyla kutunun x yönündeki bileşeni daha büyüktür.

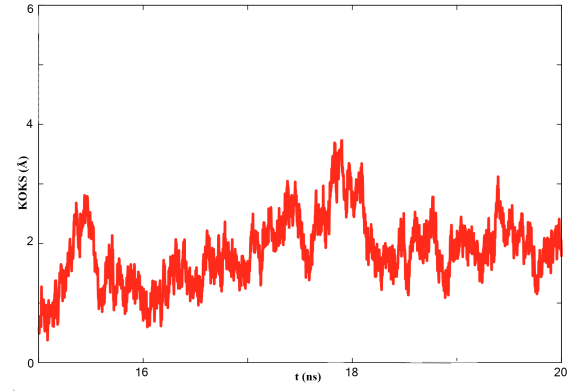


Şekil 2.10: D2 sisteminin konulduğu su kutusu.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin ok yönünde çekilmesi amacıyla kutunun y yönündeki bileşeni daha büyüktür.

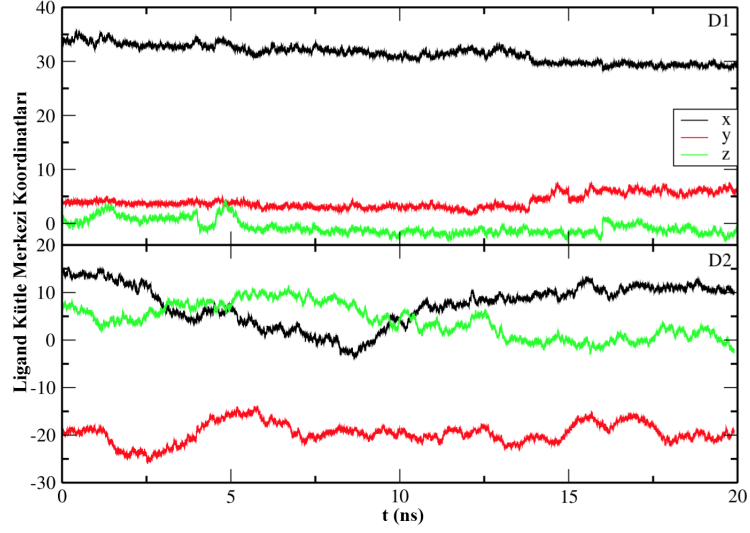
Her iki sistem için de bağlanma bölgelerinde bulunan protein amino asitlerinin omurga atomları için son 5 ns sürede elde edilen Kök Ortalama Kare Sapması (Root Mean Square Deviation) (KOKS) eğrileri Şekil 2.11’te ve Şekil 2.12’de verilmiştir;  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin kütle merkezi değişimleri Şekil 2.13’te görülmektedir. KOKS eğrilerinden ve kütle merkezi değişimlerinden sistemin dengede olduğu açıktır; çünkü salınımların dengede olduğu görülmüştür. Dolayısıyla  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin söz konusu durumlarda kararlı bir şekilde bağlı olduğu gösterilmektedir.



Şekil 2.11: D1 durumu için KOKS eğrisi.



Şekil 2.12: D2 durumu için KOKS eğrisi.



Şekil 2.13: D1 ve D2 durumlarında  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin x, y ve z koordinatlarında kütle merkezinin zaman içerisinde değişimi.

## 2.3 Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesapları

### 2.3.1 Ortalama Kuvvet Potansiyeli

Ortalama Kuvvet Potansiyeli (Potential of Mean Force) (OKP), bir reaksiyon koordinatı boyunca sistemin enerjisinin nasıl değiştiğini gösterir [79]. Aslında, söz konusu reaksiyon koordinatı boyunca tepkimenin serbest enerji profilini verir. Kullanım kolaylığı, sistemin serbest enerji profilinin, istatistiksel yöntemlerle hesaplanabilirliğini sağlamasından gelir. Serbest enerji profili hesaplanmak istenen reaksiyon koordinatı, istenilen herhangi bir doğrultu olabileceği gibi belli bir açı da olabilir. OKP eğrileri MD simülasyonu verilerinden hesaplanabilir ve denge koşulunu gerektirir. Bu tez çalışmasında, OKP yöntemi bir protein - peptid sisteminden peptidinin bir yönde çekildiğinde serbest enerjisinin nasıl değiştiğini anlamak için uygulanmıştır. OKP, genel anlamda yola bağımlı kuvvet potansiyeli hesaplama yöntemidir. Yola bağımlı yöntemler mutlak bağlanma enerjisinin hesaplanması için kullanılır. Bu yöntemler Şemsiye Örnekleme ve Sürüklenen Moleküler Dinamiktir.

Yoldan bağımsız yöntemler de iki nokta arasındaki serbest enerji farkı hesaplanır. Protein-ligand etkileşmesini incelemek için kullanılacak en pratik yol, yola bağımlı serbest enerji hesabı ve Şemsiye Örneklemesi yöntemidir.

### 2.3.2 Şemsiye Örneklemesi

Şemsiye Örneklemesi (ŞÖ) yöntemi ilk olarak 1977 yılında Torie ve Valleau tarafından uygulanmıştır [80]. Bu yöntemde, mikroskopik sistemde, yapay pencereler oluşturulur ve her pencereye MD simülasyonu uygulanır. Bu yöntem bir harmonik potansiyel enerji terimi içeren Hamiltoniyen düzenleyerek uygulanır (Denklem 2.1).

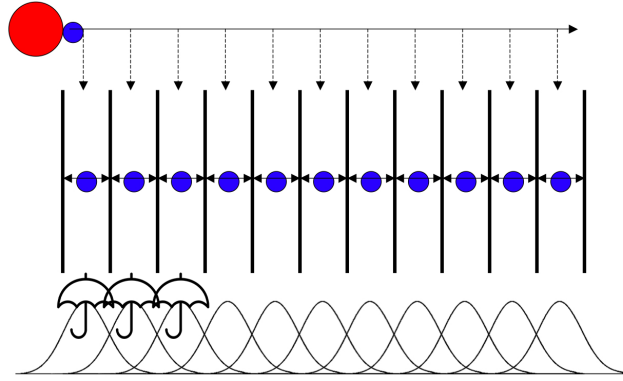
$$H'(z) = H(z) + \frac{1}{2}k_i(z - z_i)^2 \quad (2.1)$$

Burada,  $H(z)$ , sistemin Hamiltoniyeni,  $z$ , reaksiyon koordinatıdır.  $z_i$  ve  $k_i$ , sırasıyla, örneklenen şemsiyenin merkezi ve kuvvet sabitidir. Şekil 2.14'te görüldüğü üzere bu yöntemde reaksiyon koordinatı boyunca şemsiye potansiyelinin farklı yerleşimlerinde çok sayıda simülasyon çalıştırılır. Her bir simülasyonun  $z$  örnek değerleri kaydedilir ve uygulanan potansiyel enerjiyle temsil edilen popülasyon değerleri ortaya çıkarılır. Bu işlem yapılırken kullanılan algoritma genellikle Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemidir.

### 2.3.3 Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemi

Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemi'nin (AHAY) kökeni Ferenberg ve Swendsen'e dayanır. Onların geliştirdiği teknik daha sonra bu tez çalışmasında kullanılan AHAY'a alkemikal simülasyon analizleri için kullanılmak üzere dönüştürülmüştür [81]. Burada alkemikal, bir biyolojik yapıda yer alan atom ya da molekülün başka bir atom ya da





Şekil 2.14: Şemsiye Örneklemesi için şematik bir anlatım. Mavi renkli daire, protein ve kırmızı renkli daire ligandı simgelemektedir. [94]'den modifiye edilmiştir.

molekülle değiştirilmesi anlamına gelmektedir. AHAY algoritmasındaki adımlar için Şekil 2.14'deki şemsiye incelenirse durum daha da kolay anlaşılır. Simülasyonlarda konstraint konulan peptid atomlarının koordinatlarının reaksiyon yönündeki koordinatlarının histogramı çıkarılır. Dikkate alınan peptid atomları hiç bir potansiyel etkisinde değilse çıkan histogramın/popülasyonun (aynı zamanda yoğunluk dağılımı olarak da adlandırılır) tepe noktası maksimumda bulunan Gauss dağılımını verir. Şekil 2.14'de bu dağılımlar görülmektedir. Fakat biyolojik moleküllerde şemsiye potansiyelini koyduğumuz noktanın potansiyeli sıfırdan farklı olduğundan beklenen Gauss dağılımının maksimumu konulan pozisyonun potansiyeline bağlı olarak kayma gösterecektir. Yapılan AHAY analizinde ilk olarak eklenen harmonik potansiyel (Biasing potansiyeli) çıkartılmak suretiyle yoğunluk dağılımı potansiyelden arındırılır (Unbiasing). Unbiased yoğunluk dağılımlarının birleştirilmesinden elde edilecek yoğunluk dağılımı Boltzmann denklemi gereği serbest enerji profilinin eksponansiyelidir; logaritma almak suretiyle serbest enerji profili elde edilir. Dağılımların her bir penceresi birleştirilerek potansiyel enerji eğrilerini oluşturmak gerekir. Bu basit bir işlem değildir. Çünkü her dağılımın enerjileri mutlak değildir. AHAY bitişik pencerelerin simülasyonlarını örneklenen bölgede üst üste getirerek ölçeklemeye çalışır. Böylece reaksiyon koordinatı boyunca örneklenen uzay bölgesinde komşu simülasyonların özellikle üst üste binmesinde AHAY kullanma

zorunluluđu dođar.

ŞÖ yönteminin başarılı bir uygulaması için gerekli koşul uygun reaksiyon koordinatı ve bias potansiyelinin seçimine bağlı olarak yeterli örneklemelemdir. İdeal bir biasing potansiyeli reaksiyon koordinatı boyunca düzgün örneklemelemler sağlamalıdır. Bir serbest enerji profilinin şekli hakkında önceden bilgi varsa, serbest enerjisinin negatifi biasing potansiyeli olarak kullanılabilir. Ne yazık ki OKP profili çoğu durumda önceden bilinmemektedir ve biasing potansiyelinin diğer durumları kullanılmalıdır. Dolayısıyla tipik olarak reaksiyon koordinatı boyunca her pencerede bir harmonik biasing potansiyeli uygulanır.

### **2.3.4 Şemsiye Örnekleme Simülasyonları ve Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesapları**

Bu tez çalışmasında, iki ayrı sistem için MD simülasyonları gerçekleştirilmiş ve her sistem için birbirinden bağımsız olarak OKP hesapları yapılmıştır.

D1 sistemi için 20 ns MD simülasyonu sonunda sistemin denge durumunun korunduğu görülmüştür. Sistemin dengede olması koşuluyla OKP hesapları ŞÖ simülasyonlarıyla yapılmıştır. Bu nedenle sistemin 20 ns simülasyon sonunda elde edilen koordinatlarıyla ŞÖ simülasyonlarına başlanmıştır.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin koordinatları x ekseninde (Şekil 2.9) 0.5 Å kaydırılarak 30 farklı durum oluşturulmuştur. Bu durumlar, birer Şemsiye Penceresidir; 0.5 Å aralıklı 30 pencere aslında peptidinin 15 Å çekilmesine karşılık gelir. Her pencereye birbirinden bağımsız 4 ns süreli simülasyon uygulanmıştır. Simülasyon parametreleri, üretim simülasyonundakiyle aynıdır. Simülasyonlar sonucunda elde edilen veriler AHAY ile analiz edilmiştir.

D2 sistemi için de 20 ns üretim simülasyonu sonunda sistemin dengede durumunun korunduğu görülmüştür. Bu simülasyonun sonundaki koordinatlar ile ŞÖ simülasyonlarına başlanmıştır.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin koordinatları y ekseninde (Şekil 2.10) D1 sisteminde olduğu gibi 0.5 Å aralıklarla kaydırılmış ve toplamda 40 pencere oluşturulmuştur. Böylece peptid toplamda 20 Å uzaklaştırılmıştır. Bu bölgede kaydırma işleminin D1 konfigürasyonuna göre daha uzun olmasının nedeni, nm-nAChR proteininin C-döngüsüdür. Çünkü, peptidinin proteinden tamamen ayrılması ve artık etkileşmiyor olana kadar kaydırılması gerekir. Söz konusu C-döngüsü bir çıkıntı şeklinde olduğu için kaydırma işlemi daha uzun sürmüştür.

D2 sistemi için ŞÖ simülasyonu her pencere için toplamda 2 ns olacak şekilde yapılmış ve simülasyon sonunda yapılan AHAY analizleri karşılaştırılmıştır. Simülasyonun 2 ns süreli olmasının nedeni, D1 simülasyonunda OKP eğrisinin 2 ns’de yakınsamasıdır (bkz. Bölüm 3.3.2). D2 sistemi için yapılan ŞÖ simülasyonları ve AHAY analizleri koşullar bakımından D1 sistemiyle aynıdır. Sonuçlar Bölüm 3.3’te değerlendirilmiştir.

## 3. BULGULAR

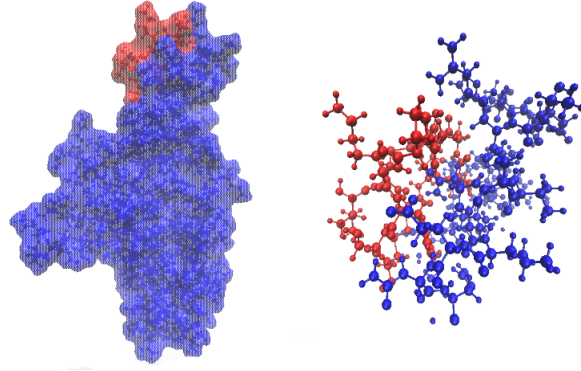
### 3.1 Kenetlenme Simülasyonları

nm-nAChR proteini ve  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidi arasındaki etkileşimin hangi amino asitler aracılığıyla olduğu ve amino asitler arası etkileşim dışında yapısal değişiklikler gibi başka mekanizmaların olup olmadığı bilinmemektedir. Bununla beraber nm-nAChR proteinindeki aktif amino asitlerin hangi bölgede oldukları konusunda fikir yürütülebilir. Diğer taraftan  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin tamamı aktif olarak seçilerek, bu bilgiler, HADDOCK yazılımına girdi olarak verilmiştir. Protein-ligand etkileşim bölgelerinde öne çıkan iki durum söz konusudur. Bu durumlar daha önce bahsedildiği gibi D1 ve D2 şeklinde adlandırılmıştır.

D1 durumunda MD simülasyonlarına başlamadan önceki, başka bir deyişle HADDOCK paket yazılımının verdiği şekliyle, hem potansiyel yüzeyi hem de atomlar katı küre formunda Şekil 3.1’de görülmektedir. HADDOCK paket yazılımının bu konfigürasyonu en yüksek olasılıklı olarak vermesi beklenmeyen bir durum olmakla birlikte imkansız bir durum değildir. Çünkü, HADDOCK algoritması bazı durumlarda yanılabilir. Ancak, yine de bu durumu da diğer durumla beraber incelemek gereklidir.

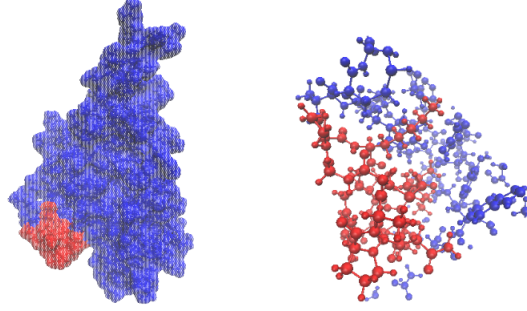
HADDOCK simülasyonu sonrası elde edilen D2 durumu Şekil 3.2’de görülmektedir. Bu durum,  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin asetilkolin bağlanma bölgesinde olduğu için mantıklı gözükmemektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi HADDOCK paket yazılımı notlandırma sırasında yanılabilir. Özellikle büyük biyolojik yapıların etkileşimi tahmin edilirken serbestlik derecesi ve dolayısıyla olası durum sayısı çok yüksek olduğundan lokal minimuma inerken başka bir minimum enerji bölgesinde takılabilir ve bu da yanlış puanlandırmaya

yol açar [83]. Ancak, kenetlenme simülasyonları sonrası puanlandırmanın doğruluğu hemen yargılanamaz. MD simülasyonlarıyla dinamik mekanizmayı araştırmak gereklidir.



Şekil 3.1: D1 sisteminin kenetlenme simülasyonu sonrası potansiyel yüzeyi (solda) ve katı küreler (sağda) formlarında durumu. Katı küreler formunda gösterilen şekil, bağlanma bölgesinin yakın çevresidir.

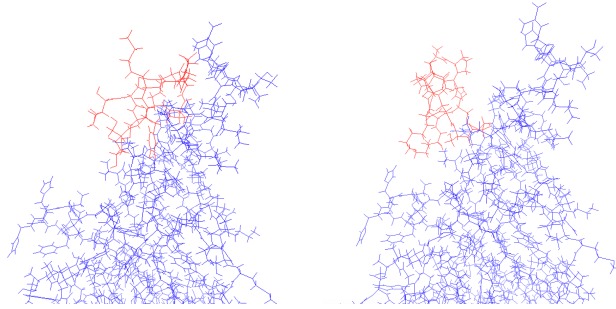
Kenetlenme simülasyonları yalnızca statik yapılar vereceğinden dinamik bir mekanizmayı açıklayabilmek için MD simülasyonları yapmak gerekmektedir. Bu tez çalışmasında HADDOCK simülasyonları sonrası elde edilen yapılar, MD simülasyonları ve OKP hesaplarıyla analiz edilmiştir.



Şekil 3.2: D2 sisteminin kenetlenme simülasyonu sonrası potansiyel yüzeyi (solda) ve katı küreler (sağda) formlarında durumu. Katı küreler formunda gösterilen şekil, bağlanma bölgesinin yakın çevresidir.

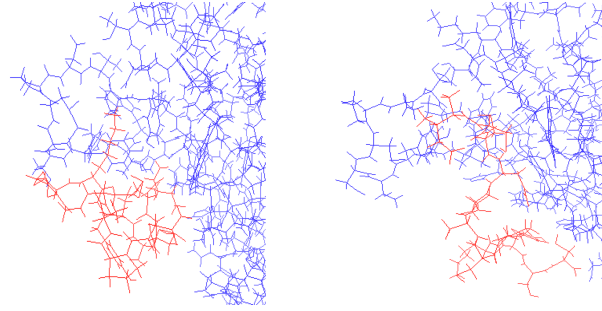
### 3.2 Moleküler Dinamik Simülasyonları

HADDOCK simülasyonlarından elde edilen yapıları birbirlerinden bağımsız ve aynı koşullar altında MD simülasyonları yapılmıştır. Bütün MD simülasyonları sistem dengeye gelene kadar devam ettirilmiştir. D1 konfigürasyonu ve D2 konfigürasyonları için 20 ns süreyle MD simülasyonları yapılmıştır. Bu simülasyonların başlangıcında ve sonunda elde edilen pozisyonlar D1 ve D2 konfigürasyonları için sırasıyla Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmiştir. En yüksek puanı alan iki duruma ek olarak HADDOCK paket yazılımının



Şekil 3.3: D1 sisteminin MD simülasyonu başlangıcında (solda) ve sonundaki (sağda) durumu.

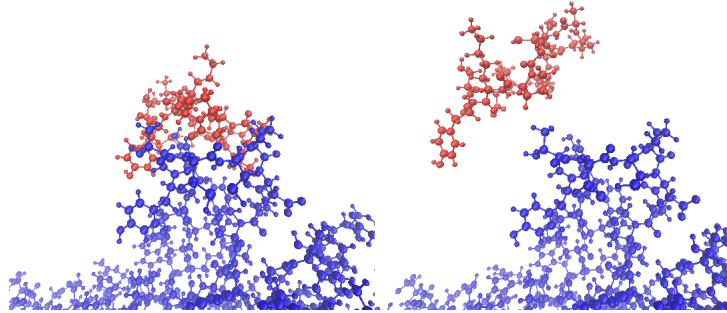
puanlandırmasından 3. en yüksek puanı alan durum için de 10 ns MD simülasyonu



Şekil 3.4: D2 sisteminin MD simülasyonu başlangıcında (solda) ve sonundaki (sağda) durumu.

yapılmış ancak simülasyon sonunda  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin nm-nAChR proteininden uzaklaştığı görülmüştür (Şekil 3.5). Bu nedenle bu yapının detaylı analizine gerek duyulmamıştır.

En yüksek puanı alan iki durum için de simülasyon başlangıcı ve sonundaki görüntüleri yorumlamak yetersiz olacaktır. Kaldı ki, simülasyon bize dinamik bir mekanizmayı açıklama avantajı sağlar. Bu yüzden iki durum için de olası tüm etkileşimler için simülasyon analizleri yapılmıştır.

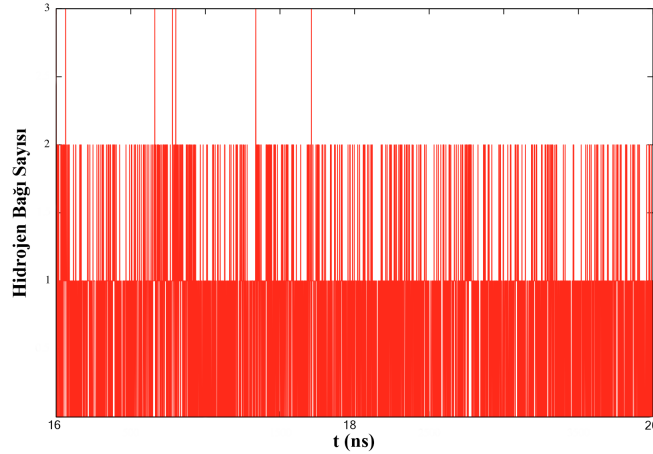


Şekil 3.5: HADDOCK puanlandırmasından en yüksek 3. puanı alan sistemin MD simülasyonu başlangıcında (solda) ve sonundaki (sağda) durumu.

### 3.2.1 D1 Durumu için Simülasyon Analizi

Protein - peptid etkileşimlerinde bağlanmaya neden olabilecek mekanizmalar arasında Hidrojen bağları ilk sırada bulunabilir düşüncesiyle D1 durumu için simülasyonun son 5 ns süresindeki hidrojen bağları araştırılmıştır. Şekil 3.6’de son 5 ns sürede oluşan hidrojen bağlarının sayısı verilmiştir.

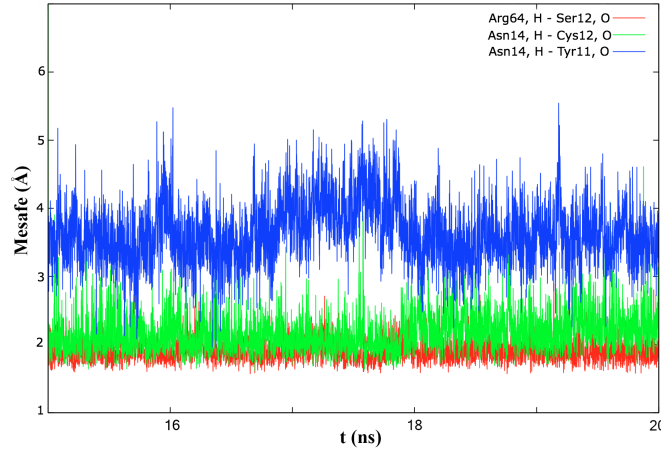
Şekil 3.6’den son 5 ns boyunca en az iki adet ve zaman zaman da üç adet hidrojen bağı oluştuğu açıkça görülebilir. Bu hidrojen bağlarının hangi atomlar arasında ve ne kadar süreyle oluştukları da önemlidir. Değişen hidrojen bağları,  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin yürümesine yol açabilecekken, kararlı hidrojen bağlarıysa yerinde kalmasına neden olabilir. Bu amaçla bu hidrojen bağlarına neden olan aminoasitler tespit edilmiştir. Şekil 3.7’e bu hidrojen bağlarına neden olan atomlar arası uzaklıkların son 5 ns içinde değişimi verilmiştir.



Şekil 3.6: D1 konfigürasyonu için MD simülasyonlarının son 5 ns’inde oluşan hidrojen bağı sayısı.



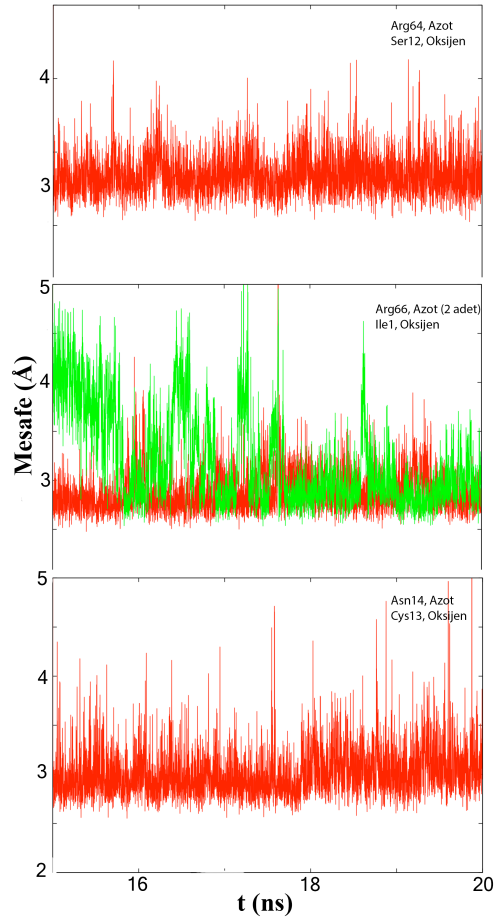
Şekil 3.7'deki grafik, Şekil 3.6'deki hidrojen bağ sayısını gösteren grafikle birebir uyum içindedir. Bu da bu süre boyunca oluşan hidrojen bağlarının söz konusu amino asitler olduğu fikrini doğrulamaktadır; hidrojen bağlarının kararlı olduğu ve sürekli değişmediği de açıkça görülmektedir. Burada üç amino asit üzerinde durmak gerekmektedir. Bu amino asitler, nm-nAChR proteinin Asn14 aminoasidi ve  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin Cys12 ve Tyr11 amino asitleridir. İki durumda da nm-nAChR proteini donör ve  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidi alıcı olarak davranmaktadır. Söz konusu üç amino asit de polar özellikte olduğundan aralarında hidrojen bağı oluşturması doğal bir sonuçtur ve simülasyon analizi de bu amino asitler arasında hidrojen bağı oluştuğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.7: D1 pozisyonu için MD simülasyonlarının son 5 ns'sinde oluşan hidrojen bağı oluşturan amino asitler ve atomlar arası mesafe değişimi.

Hidrojen bağları dışında protein - peptid etkileşimlerinden sorumlu olabilecek bir diğer faktör, yüklü aminoasitlerin elektrostatik etkileşimleridir. Bu amaçla, öncelikle hidrojen

bağı analizinin dışında simülasyon boyunca meydana gelen yakın etkileşimler araştırılmıştır. Simülasyonun son 5 ns'sinde meydana gelen 3 önemli yüklü etkileşim vardır. Bunlardan bir tanesi, nm-nAChR proteinin Arg64 amino asidi ve  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin Ser12 amino asidi arasındadır ve etkileşim grafiği Şekil 3.8'da verilmiştir. Diğer bir etkileşim, nm-nAChR proteinin Arg66 amino asidi ile  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin Ile1 amino asidi arasındadır. Bu etkileşim de Şekil 3.8'da verilmiştir. Son etkileşim, nm-nAChR proteinin Asn14 amino asidi ile  $\alpha$ -Conotoxin SI peptidinin Cys13 amino asidi arasındadır. Daha önce de bahsedildiği gibi Asn, Tyr ve Cys asmino asitleri polar özellikte

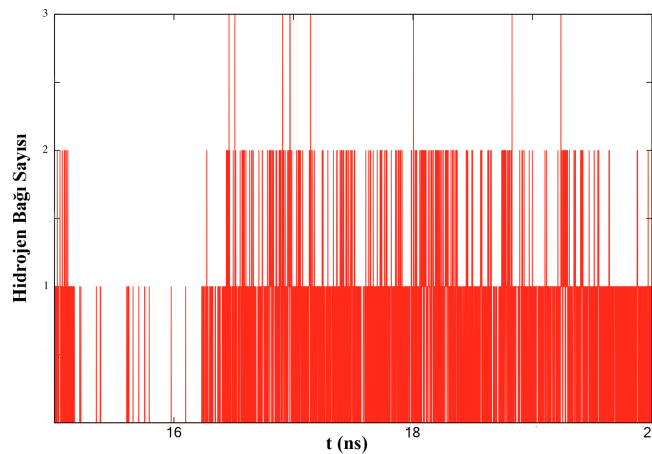


Şekil 3.8: nm-nAChR proteini ile  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi arasındaki elektrostatik etkileşimler.

olan amino asitlerdir ve aralarında yüklü etkileşim olması doğaldır. Ayrıca söz konusu nm-nAChR proteininin Asn14 amino asidinin, hidrojen bağı analizleri sırasında Cys12 ve Tyr11 aminoasitleriyle hidrojen bağı yaptığı da bulunmuştur. Bu durumda başta söz konusu Asn14 amino asidi başta olmak üzere bu bölgede yeterli sayıda hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim saptanmıştır.

### 3.2.2 D2 Durumu için Simülasyon Analizi

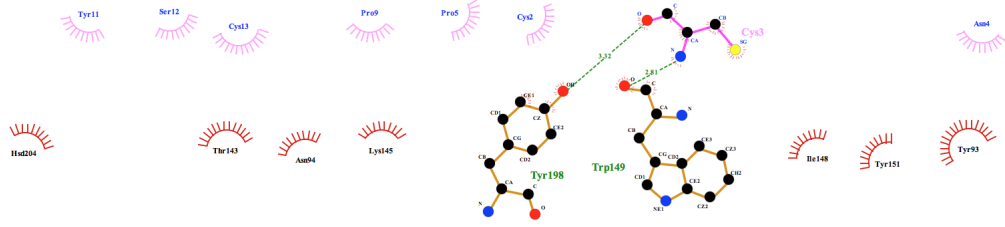
D1 durumunun analizinde olduğu gibi, D2 durumu için de hidrojen bağı analiziyle başlanmıştır. Şekil 3.9’da D2 durumunun son 5 ns süresinde bulunan hidrojen bağlarının sayısı görülebilir. Bu durumda da en az bir hidrojen bağı kararlılığını devam ettirmekte ve ikinci bir hidrojen bağı da zaman zaman olmakla birlikte, azımsanmayacak ölçüde ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, D1 durumunda olduğu gibi bu hidrojen bağına neden olan amino asitler de araştırılmıştır. Ancak, kararlı hidrojen bağları söz konusu değildir. Oluşan hidrojen bağları değişiklik göstermektedir. Başka bir deyişle bir hidrojen bağı kopmakta, başka bir hidrojen bağı oluşmaktadır. Ancak hidrojen bağı sayısı değişmemektedir.



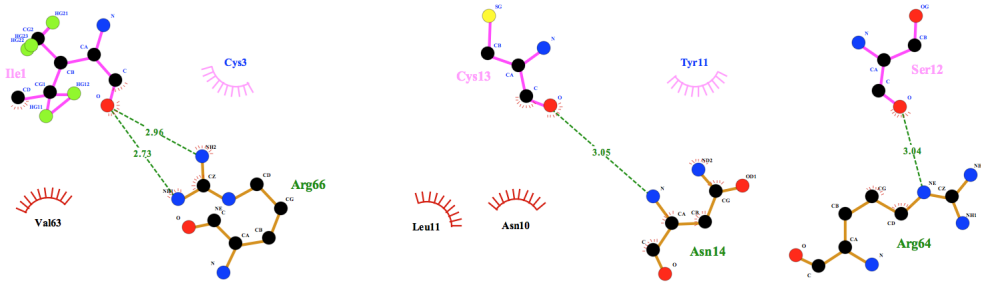
Şekil 3.9: D1 konfigürasyonu için MD simülasyonlarının son 5 ns'inde oluşan hidrojen bağı sayısı.

Yine de kuvvetli bir etkileşimden söz ediyorsak tek bir hidrojen bağı bu etkileşime neden olamayabilir. Bu yüzden D1 durumunda olduğu gibi yüklü etkileşimler olup olmayabileceği araştırılmıştır. Aynı kararlı hidrojen bağları tespit edilemediği gibi kararlı elektrostatik etkileşimler de tespit edilememiştir. Söz konusu etkileşimin elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarından kaynaklanmadığı açıktır. Protein-peptid etkileşimlerinin en önemli nedenlerinden birisi de hidrofobik etkileşimlerdir [84]. Bağlanmaya hidrofobik etkileşimlerin neden olabileceği düşüncesiyle simülasyonun son 5 ns'indeki hidrofobisite haritası elde edilmiştir. Hidrofobisite haritası LigPlot+ yazılımıyla [82] elde edilmiştir. LigPlot+ yazılımı, sonuçları iki boyutlu bir harita şeklinde verir. Hidrofobisite haritası Şekil 3.10'de verilmiştir. Şekil 3.10'den de görülebileceği gibi yüksek sayıda hidrofobik etkileşim vardır ve bu da peptidin o bölgede kararlı kalabilmesi için bir nedendir. Aynı analiz D1 durumu için de yapılmıştır (Şekil 3.11). Ancak elde edilen haritada Şekil 3.8'de görülen elektrostatik etkileşimler dışında önemli derece hidrofobik etkileşim gözlenmemiştir.

MD simülasyonları için yapılan analizler, mekanizmayla ilgili bir çok fikir verse de bağlanma enerjilerini hesaplamak gerekir. Bu amaçla iki konfigürasyon için de ŞÖ simülasyonlarıyla  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin her iki durum için bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.



Şekil 3.10: D2 durumu için hidrofobisite haritası. Kahverengi çizgiler proteindeki kovalent bağları, pembe çizgiler, liganddaki kovalent bağları, kesikli çizgiler, yüklü etkileşimleri gösteriyor. Hidrofobik grupların çevresinde birer yay ve bu hidrofobik gruplara yanıt veren atomların çevresinde daha küçük birer yay vardır.



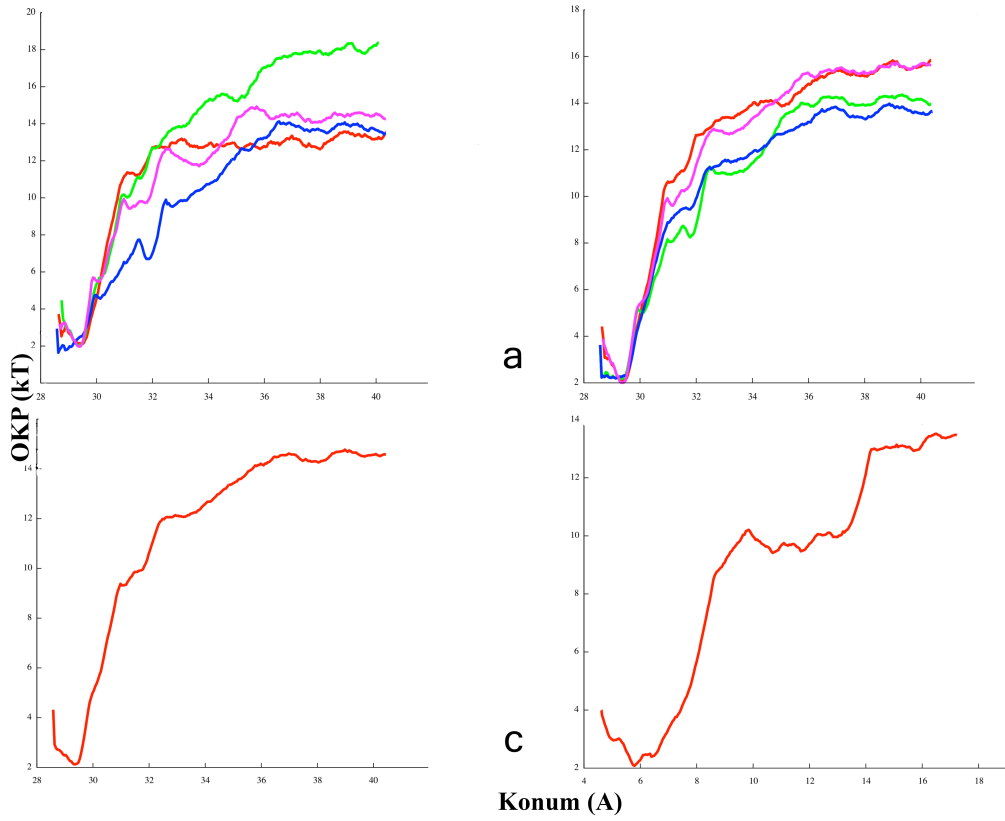
Şekil 3.11: D1 durumu için hidrofobisite haritası. Kahverengi çizgiler proteindeki kovalent bağları, pembe çizgiler, liganddaki kovalent bağları, kesikli çizgiler, yüklü etkileşimleri gösteriyor. Hidrofobik grupların çevresinde birer yay ve bu hidrofobik gruplara yanıt veren atomların çevresinde daha küçük birer yay vardır.

### 3.3 Şemsiye Örneklemesi Simülasyonları ve Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesapları

#### 3.3.1 D1 Konfigürasyonu için Ortalama Kuvvet Potansiyeli Analizi

D1 durumu için yapılan ŞÖ simülasyonlarının AHAY analizlerinden elde edilen serbest enerji profilleri Şekil 3.12'de görülmektedir. Şekil 3.12.a'da her pencere için yapılan

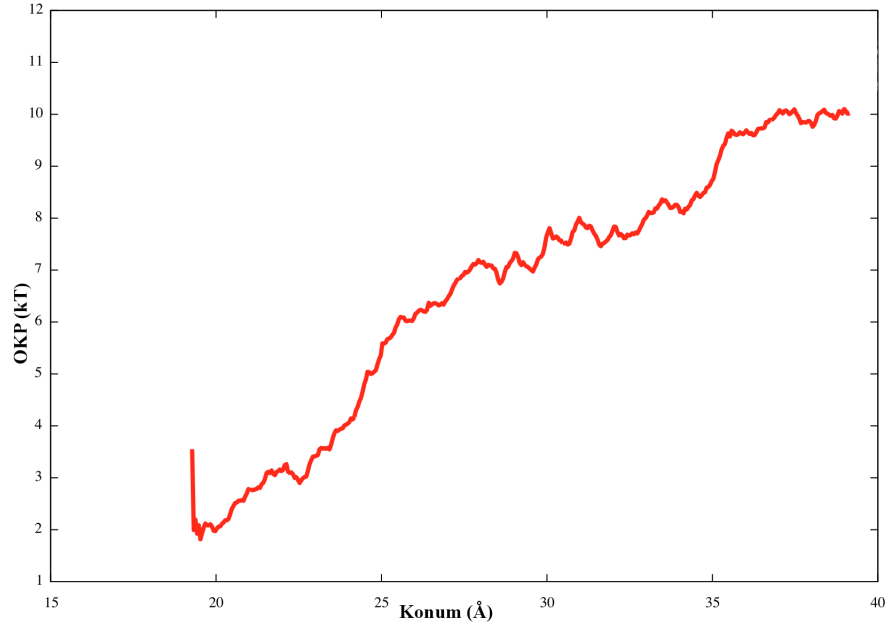
toplam 4 ns'lik simülasyondan elde edilen OKP eğrisi her 1 ns için verilmiştir. Buradan OKP eğrisinin 2 ns'den sonra 12 kT değerine yakınsadığı görülmüştür. Ancak, emin olabilmek için 1-2, 3-4, 1-3 ve 2-4 ns aralıklarında OKP eğrileri de ayrı ayrı incelenmiştir ve yine 12 kT değerinde bir yakınsama görülmüştür (Şekil 3.12.b). Tüm 4 ns'lik OKP eğrisine de bakıldığında durum değişmemektedir (Şekil 3.12.c). Son olarak  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi için, y yönünde de 3 ns ŞÖ simülasyonu yapılarak OKP eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.12.d). x yönünde elde edilen OKP ile karşılaştırıldığında profil olarak farklılıklar görüle bile bariyer yüksekliği yaklaşık aynıdır. Bu sonuç OKP hesaplarının doğruluğunu göstermektedir.



Şekil 3.12: D1 durumu için Ortalama Kuvvet Potansiyeli eğrileri. a) 0-1 (kırmızı), 1-2 (yeşil), 2-3 (mavi), 3-4 (pembe) ns. b) 1-3 (kırmızı), 2-4 (yeşil), 1-2 (mavi), 3-4 (pembe) ns. c) 4 ns. d) y yönünde 3 ns.

### 3.3.2 D2 Konfigürasyonu için Ortalama Kuvvet Potansiyeli Analizi

D2 sistemi için aynı ŞÖ simülasyonu D1 durumunda 2 ns’de yakınsama görüldüğü için toplamda 2 ns yapılmış ve Şekil 3.13’de görüldüğü gibi yaklaşık 10 kT değerine yakınsamıştır. D1 durumuyla arasındaki 2 kT’den daha az bir fark vardır; buysa istatistiksel hata sınırları içindedir.



Şekil 3.13: D2 durumu için Ortalama Kuvvet Potansiyeli eğrisi.

## 4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında nm-nAChR proteini ve  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin deneysel olarak tespit edilmiş 3 boyutlu yapılarının HADDOCK paket yazılımı kullanarak muhtemel bağlanma durumları elde edilmiş ve iki en muhtemel durum üzerinde durulmuştur. Bu durumların MD simülasyonları ve OKP hesapları yapılarak, durumların bağlanma özellikleri incelenmiştir.

HADDOCK paket yazılımının puanlandırma sonucu verdiği iki en muhtemel durumların analizleri yapılmış ve puanlandırmaya göre D1 ve D2 şeklinde isimlendirilmiştir. D1 durumu normalde en muhtemel olması beklenmeyen bir bölgededir. Çünkü  $\alpha$ -Konotoksin SI felce neden olduğu bilinen bir peptiddir. Felç mekanizmasıyla ilgili bir takım senaryolar öne sürmek mümkündür. Sonuç olarak felç hareket edememe durumu olarak düşünülürse, öncelikle hareketin nasıl meydana geldiği ile işe başlanabilir. nm-nAChR proteini hücre membranına gömülü olarak bulunan bir proteindir ve ortasında bir delik bulunur. Görevi,  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içine girmesini sağlamaktır. Bu mekanizma şu şekilde çalışır: Vücudumuzda bulunan Asetilkolinesteraz enzimleri tarafından Asetilkolin adındaki moleküller üretilir. Hücre zarına gömülü olarak bulunan nm-nAChR proteininin ortasındaki deliğin çapı normalde  $\text{Na}^+$  iyonlarının geçişine imkan vermez. Ancak, eğer iki adet Asetilkolin molekülü nm-nAChR proteini ile etkileşirse, söz konusu proteinde meydana gelecek küçük bir değişim nedeniyle deliğin çapı genişler ve  $\text{Na}^+$  iyonları hücre içine girebilir. Bu durumda iki önemli durum,  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin felç edici özelliğine neden olabilir. Bunlardan ilki;  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin, Asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmesi ve dolayısıyla vücutta Asetilkolin molekülünün üretiminin durmasıdır. Ancak bu durumda, dışarıdan Asetilkolin ya da onun agonisti olan Nikotin molekülünün vücuda verilmesi tedavi edici olacaktır. Ancak literatürde nikotinin bu felç durumunu tedavi ettiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. İkinci bir ihtimal de  $\alpha$ -Konotoksin SI



peptidinin, nm-nAChR proteini üzerinde Asetilkolin molekülünün bağlandığı bölgeleri işgal etmesidir. Böylece bölgeye Asetilkolin molekülü bağlanamaz ve dahası bölgenin de nm-nAChR proteininde bulunan deliğin çapının genişlemesine neden olacak değişiklik meydana gelmezse bu durum  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içine girememesiyle sonuçlanır. Böylece kas kasılması için gerekli sinyal iletimi gerçekleşemez. Bu tez çalışmasında ikinci ihtimal üzerinde durulmuş ve muhtemel bir asetilkolin bağlanma bölgesi için bağlanma durumları araştırılmıştır.

D1 durumunun HADDOCK paket yazılımı tarafından en yüksek olasılıklı durum olarak değerlendirilmesi başta beklenmeyen bir durumdur. Ancak, HADDOCK her zaman doğru puanlandırma yapamayabilir. Bu yüzden sıradışı bir durum söz konusu değildir. Yine de bu durumun geçersiz olacağını düşünüp araştırmamak doğru değildir. İlk olarak bu durum araştırıldı. MD simülasyonlarına başlamadan keskin yorumlar yapmak zor olsa da ilk dikkat çeken şeyler, hangi amino asitlerin birbiriyle etkileşimde bulunduğuydü. Çünkü, eğer elektrostatik etkileşimler hidrojen bağları varsa, bu durum güçlü bir etkileşime işaretler. Kenetlenme simülasyonları sonrası elde edilen yapılar, dinamik olmayan durumlar olsa da, MD simülasyonları, bu durumları yorumlama şansı tanımıştır.

İki durum için de MD simülasyonları sonunda önemli bir noktaya değinmek gerekir. Çünkü, MD simülasyonları sonrası yapılan analizlerde, D1 durumu için kararlı elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarının varlığı, D2 durumu için de hidrofobik etkileşimlerin varlığı bağlanmanın kararlılığına ilk işaretler. Dahası, yapılan OKP hesaplamalarında, iki durum da eşit olasılıkta çıkmıştır. Aradaki 2 kT civarı enerji farkı istatistiksel hata sınırları içindedir. Bu analizlerden sonra HADDOCK hesaplamalarından şüphe duymamıza gerek kalmamıştır. En önemli olan durumsa D2 durumudur. Çünkü gerçek asetilkolin bağlanma bölgesi burasıdır ve yapılan analizler sonucunda hidrofobik etkileşimler nedeniyle kararlı bir bağlanma sergilediği görülmüştür ve OKP hesaplarıyla bu bölgeye  $\alpha$ -Konotoksin

SI peptidinin yüksek afiniteyle bağlandığı belirlenmiştir. D2 durumunun felç edici mekanizmayı açıklamasının yanında, deneysel çalışmalarda görülen nm-nAChR proteini üzerindeki  $\alpha$  alt birimleri arasındaki seçicilik davranışı da D1 durumunun tartışmaya eklenmesiyle açıklanabilir.

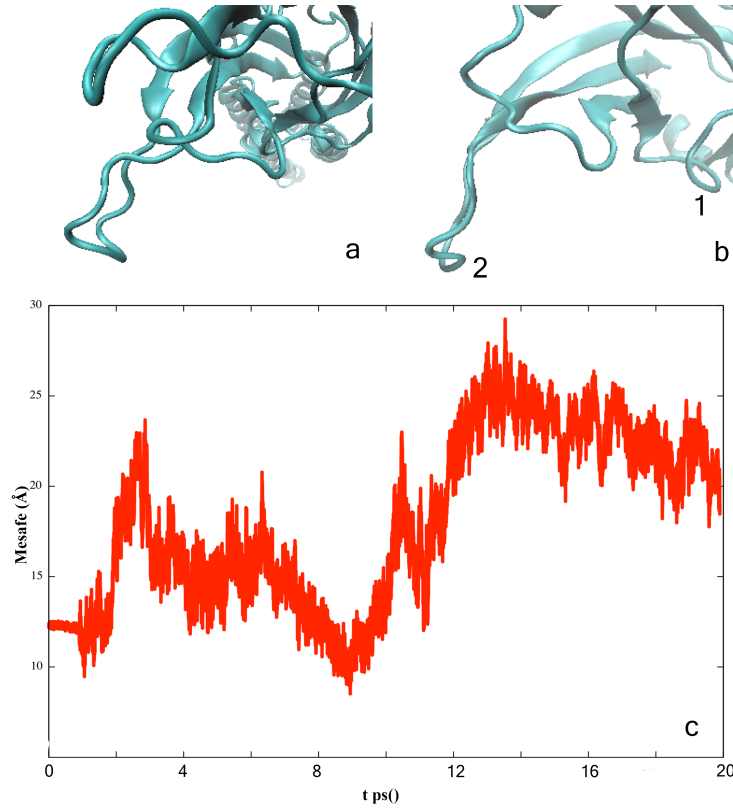
Daha önceki çalışmaların gösterdiği üzere, asetilkolin molekülü, nm-nAChR proteininin C-Döngü bölgesiyle etkileşime girdiğinde söz konusu bölge proteine doğru kapanmakta ve proteinde yapısal bir değişikliğe neden olarak deliğin açılmasını sağlamaktadır [85, 86] ve söz konusu değişiklik Şekil 4.1’de de açıkça görülmektedir. Şekil 4.1’ye göre, asetilkolin, nm-nAChR proteininin C-Döngü bölgesine bağlandığında, bu bölgeyi içeri doğru kapatacak ve  $\text{Na}^+$  iyonu, nm-nAChR proteinindeki yapısal değişiklikler sonucu açılan delikten hücre içine girecektir. Bu bölgeyle etkileşime girecek inhibitör bir ligandın



Şekil 4.1: Nöromusküler Nikotinik Asetilkolin Reseptörüne asetilkolin bağlanması durumunda C-Döngü bölgesinin yaptığı kapanma hareketi. Kırmızı renk, açık durumu, gri renk asetilkolin bağlı durumu göstermektedir [85]. C-Döngü bölgesi 1 numaralı kare ile gösterilmektedir.

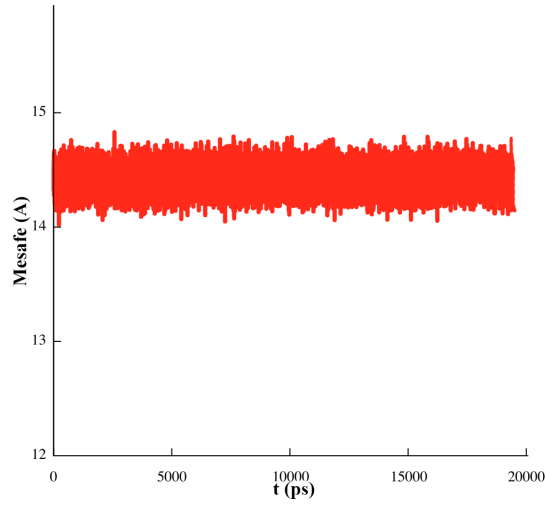
bu bölgenin içeriye doğru kapanmamasını sağlaması nm-nAChR proteininin deliğinin

açılmamasını sağlayacaktır; dolayısıyla böyle bir durumda kas kasılması için gerekli mekanizma çalışmaz. Bu tez çalışmasında da D2 durumunda böyle bir mekanizma keşfedilmiştir. Öncelikle, OKP hesaplarından da açıkça görüldüğü üzere  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi bölgeye kararlı olarak bağlanmaktadır. Ayrıca asetilkolin bağlanma bölgesini dışarıya doğru açmaktadır (Şekil 4.2). nm-nAChR proteininin C-Döngü bölgesinin



Şekil 4.2: D2 durumunda C-Döngü bölgesinin  $\alpha$ -Konotoksin SI (gösterilmemiştir) bağlandığında açılmaktadır. a) C-Döngü bölgesine ligand bağlı değilken. b) C-Döngü bölgesine  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi bağlıyken. c) 2 numarayla gösterilen C-Döngü bölgesinin 1 numaralı bölgeden uzaklaştığı mesafe

açık olarak kalması, asetilkolin bağlı olması durumundaki değişikliğin tam tersidir; bu durum nm-nAChR proteininin deliğinin açılmaması ve kas kasılmasını sağlayacak sinyal iletimini taşıyan  $\text{Na}^+$  iyonunun hücre içine girememesiyle sonuçlanır.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi, reseptörü bloke etmektedir. D1 durumundaysa C-Döngü bölgesinde bir



Şekil 4.3: D1 durumunda C-Döngü bölgesinin Şekil 4.2.b'deki 1 ve 2 numaralı bölgelerin arasındaki mesafenin zaman içinde değişimi.

değişiklik olmamaktadır (Şekil 4.3), yani D1 şeklindeki bir bağlanma durumunu C-Döngü bölgesinin açılmasını ya da kapanmasını etkilememektedir. Bu tez çalışmasında felç mekanizmasına neden olan bağlanmanın  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin nm-AChR proteininin  $\alpha$  alt birimindeki C-Döngü bölgesiyle etkileşimi olduğu gösterilmiştir.

Toksin peptidlerinden ilaç tasarımında en önemli adım toksin peptidinin hedef proteine bağlanma mekanizmasının anlaşılmasıdır. Bu tez çalışmasında da  $\alpha$ -Konotoksin peptidinin nm-nAChR proteinine bağlanma mekanizması bu amaç doğrultusunda araştırılmıştır. Hedef proteinler çok büyük olduklarında bağlanma bölgelerinin belirlenmesi gereklidir. Bağlanma mekanizmasının çok karmaşık olabileceği gibi büyük peptidler için bağlanmaya neden faktörler de farklı olabilir. Örneğin, elektrostatik etkileşimler ya da proteinde yapısal su varsa, bu yapısal su peptidinin bağlanmasında etkin rol oynuyor olabilir.

$\alpha$ -Konotoksin SI gibi büyük peptidlerin aminoasitlerinin değiştirilebiliyor olması da ilaç tasarımında çok önemli bir rol oynar. Bu işleme mutasyon denmektedir. Mutasyon çalışmalarlarıyla afiniteyi değiştirmek ve kalite artırma ya da doz ayarlama gibi işlemler yapmak

mümkündür. Bu tez çalışmasında  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinin felç edici mekanizmasının anlaşılması aynı zamanda nm-nAChR üzerinde bağlanma bölgesinin de belirlenmesini sağlamıştır. Bu mekanizma dinamik simülasyonlarla anlaşıldığından bağlanmada etkin rol alan aktif amino asitler de belirlenmiştir (Şekil 3.10). Bu çalışmanın devamında etkileşimde aktif rol oynayan amino asitler farklı amino asitlerle değiştirilerek peptidin bağlanma özellikleriyle oynanabilir ve bir analjezik tasarlanabilir.

Çalışmanın devamında yapılması gereken şeylerden biri de bu çalışmada kullanılan 3 boyutlu yapıdan (Torpedo Marmorata'dan alınmıştır) yola çıkılarak insanda bulunan proteinin modellenmesidir.  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidinden geliştirilecek bir ilaç insanlarda kullanılmak için geliştirilecektir ve insanda bulunan nm-nAChR proteiniyle etkileşiminin araştırılması önemlidir. Proteinin amino asit diziliminde bir farklılık olmasa bile 3 boyutlu yapıda küçük de olsa değişiklikler olabilir. Etkileşimde bulunan amino asitler bu tez çalışmasında belirlendiğinden, insanda bulunan nm-nAChR proteini Torpedo Marmorata'dan alınan protein yapısındaki benzerliklerden faydalanarak (Homoloji Modelleme) modellenen yeni yapıyla  $\alpha$ -Konotoksin SI peptidi arasındaki etkileşim incelenerek, ilaç tasarımında önemli adımlardan biri daha kat edilebilir.