



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Voltaj Bağımlı Sodyum Kanallarına Spesifik Toksinlerin
Etkisinin Yapısal Olarak İncelenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Selin Sezer

Haziran 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Voltaj Bağımlı Sodyum Kanallarına Spesifik Toksinlerin
Etkisinin Yapısal Olarak İncelenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Selin Sezer

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Haziran 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Selin Sezer tarafından hazırlanan "Voltaj Bağımlı Sodyum Kanallarına Spesifik Toksinlerin Etkisinin Yapısal Olarak İncelenmesi" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Doç. Dr. Günseli BAYRAM AKÇAPINAR
Acıbadem Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Semran İPEK
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 20 / 06 / 2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun Vancouver kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Selin Sezer

ÖZET

Voltaj Bağımlı Sodyum Kanallarına Spesifik Toksinlerin Etkisinin Yapısal Olarak İncelenmesi

Sezer, Selin

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Aaabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Haziran, 2023.

Bu çalışmada hedeflenen voltaj kapılı sodyum kanalları (NaV), hücrelerde Na⁺ iyonlarının akışına izin verir ve nörolojik fonksiyonun anahtar transmembran proteinleridir. Sodyum kanal proteinlerinin aktivasyonu, sinyallerin iletilmesindeki aksiyon potansiyelinin ilk yükselişine neden olur ve bu da kas kasılması ve nöronal ateşlemeye yol açan diğer fizyolojik olayları tetikler. Bu kanallarda meydana gelen bozulmalar epilepsi, ağrı, miyotoni, kardiyak aritmiler ve yetersizlikler ile kanserin de dahil olduğu bir dizi hastalığı içerir ve tedavisi için NaV transmembran proteinleri önemli terapötik hedefler arasındadır [1].

Zehirli hayvanlardan veya bitkilerden gelen sayısız toksin, voltaj kapılı sodyum (NaV) kanallarını hedeflemek üzere evrilmiştir. NaV kanallarında oluşan sorunlar çeşitli hastalıklara sebebiyet vermektedir ve bu hastalıkların tedavilerinde yüksek potansiyel taşıyan toksin peptidleri yeni tedaviler için bize önemli bir kaynak sunmaktadır. Bu alandaki çalışmalar yapısal ve fonksiyonel olarak henüz aydınlatılamamıştır.

Önerilen tezde sodyum kanalları ile yapı-fonksiyon ilişkileri incelenecek olan tarantula zehrinde bulunan delta-theraphotoxin-Hm1a (Hm1a), delta-theraphotoxin-Hm1b (Hm1b) peptidleri [2] ve akrep zehrinde bulunan delta-buthitoxin-Hj1a (Hj1a) peptidi [3] voltaj kapılı sodyum kanallarından Nav1.1'i hedef aldığı yapılan çalışmalarda öne çıkmıştır. Hm1a peptidi direk olarak bu kanalı hedef alırken diğer sodyum kanalları, kalsiyum ya da potasyum kanalları ile etkileşim göstermediği de belirtilmiştir. Bu sayede hedefe yönelik tedavilerde toksin peptidlerinin yüksek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile seçici bağlanma mekanizması moleküler kenetlenme çalışmalarıyla ilk defa moleküler seviyede gösterilmiştir. Protein-ligand yapıları incelenen voltaj bağımlı sodyum kanalları ve bu kanalları spesifik olarak hedefleyen Hm1a, Hj1a ve beta/delta-theraphotoxin-Pre1a (Pre1a) toksinleri arasındaki moleküller arası etkileşimler kenetlenme çalışmaları ile belirlenmiş, bağlanma bölgeleri açığa çıkartılmıştır. Çalışmanın devamında yapılan moleküler dinamik simülasyonları ile çeşitli toksinlerin kanal aktivitesi üzerindeki etkisi ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalları, Toksin peptidleri, Peptid İlaç Tasarımı, Moleküler Kenetlenme, Moleküler Dinamik Simülasyonu

ABSTRACT

A Structural Analysis Of The Effect Of Specific Toxins On Voltage Dependent Sodium Channels

Sezer, Selin

Master Thesis, Department of Bioengineering

Consultant: Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

June, 2023.

The voltage-gated sodium channels (NaV) targeted in this study allow the flow of Na⁺ ions in cells and they are key transmembrane proteins of neurological function. Activation of sodium channel proteins causes an initial rise of the action potential in the transmission of signals, which triggers other physiological events that lead to muscle contraction and neuronal firing. Disruptions in these channels can cause epilepsy, pain, myotonia, cardiac arrhythmias and deficiencies, and a number of diseases, including cancer. NaV transmembrane proteins are among important therapeutic targets for its treatment [1].

Numerous toxins from venomous animals or plants have evolved to target voltage-gated sodium (NaV) channels. Problems in NaV channels cause various diseases and toxin peptides with high potential in the treatment of these diseases offer us an important resource for new treatments. Studies in this area have not yet been clarified structurally and functionally.

In the proposed thesis, the structure-function relationships with sodium channels will be examined, and the delta-theraphotoxin-Hm1a (Hm1a), Hm1b peptides in tarantula venom [2] and delta-buthitoxin-Hj1a (Hj1a) peptide [3], found in scorpion venom, has come to the fore in studies that target Nav1.1, one of the voltage-gated sodium channels. It was also stated that while the Hm1a peptide directly targets this channel, it does not interact with other sodium channels, calcium or potassium channels. In this way, it is thought that toxin peptides have a high potential in targeted therapies.

In this thesis, the selective binding mechanism was demonstrated for the first time at the molecular level by molecular docking studies. Intermolecular interactions between voltage-dependent sodium channels and Hm1a, Hj1a and beta/delta-theraphotoxin-Pre1a (Pre1a) toxins that specifically target these channels, whose protein-ligand structures were examined, were determined by docking studies, and their binding sites were revealed. In the continuation of the study, the effect of various toxins on channel activity was revealed by molecular dynamics simulations.

Keywords: Voltage Dependent Sodium Channels, Toxin peptides, Peptide Drug Design, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation

TEŞEKKÜR

Bizlere her zaman destek olarak arkamızda duran, yol gösteren, değerli bilgileri ile akademik çalışmalarım boyunca yoluma ışık olmuş akademik hayata bakışında umut vermiş kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal'a , emek dolu bu çalışmamızda öneri ve yönlendirmelerini hiç esirgmeden paylaştığı için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kısmi hesaplamalar için kullanılan Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi, TRUBA, kaynaklarının kullanımına olanak sağlayan TÜBİTAK ULAKBİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında her zaman beni destekleyen annem Fatma Sezer ve babam Çetin Sezer'e, sevgili kardeşlerim Pelin Sezer ve Gülçin Sezer'e, kardeş bildiğim değerli kuzenim Yunus Tezanlar'a, her zaman yanlarında olamasam da kalbimde taşıdığım ve cesaret bulduğum sevgileri için teşekkürlerimi sunarım. Özel bir teşekkür olarak da yıllar içerisinde ailemizin bir üyesi olmuş can dostumuz Paşa ve Bella'ya huzurlu ve destekleyici aile ortamımızda yanımızda olduğu için nice uzun ömür dileklerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

Akademik hayat ile iş hayatını birlikte yönetmeye çalıştığım bu zorlu dönemimde çalışmalarımı ilerletmem konusunda destekleyici ve cömert tavrı ile bilgi ve yardımlarını esirgemeyen gelecekteki meslektaşım Onur İşçil'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ JÜRİSİ ONAYI.....	i
BEYANLAR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
GİRİŞ.....	1
1. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
1.1. Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalları.....	3
1.2. Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalları ile İlişkili Hastalıklar.....	4
1.3. NaV Kanalı ile İlişkilendirilen Toksinler.....	6
1.4. Toksinlerin Sodyum Kanalları Üzerindeki Etkilerini Gösteren Deneysel Çalışmalar.....	8
1.5. Toksinlerin NaV üzerindeki potansiyel bağlanma bölgeleri.....	9
1.6. Peptitler İçin Moleküler Kenetlenme.....	10
1.7. Moleküler Dinamik Simülasyonu (MDS).....	12
1.7.1. MDS Yörünge Analizleri.....	13
2. MATERYAL VE METOT.....	14
2.1. Voltaja Bağımlı Sodyum Kanalları ve Toksinlerin Seçilmesi.....	16
2.2. Voltaja Bağımlı Sodyum Kanallarının Karşılaştırması.....	16
2.3. Kanal ve Toksin Yapılarının Elde Edilmesi.....	17
2.4. Yapı Dosyalarının Düzenlenmesi.....	18
2.5. Kenetlenme Çalışmalarında Kullanılacak Hedef Bölgelerin Belirlenmesi.....	18
2.6. Moleküler Kenetlenme Çalışmaları.....	18
2.7. Etkileşim Noktalarının Açığa Çıkartılması.....	19
2.8. Kanal Proteinlerinin Yeniden Modellenmesi.....	20
2.9. Tekrarlanan Kenetlenme Çalışması.....	21
2.10. Yapıların Membrana Oturtulması.....	21
2.11. Moleküler Dinamik Simülasyonları.....	23
2.11.1. Enerji Minimizasyonu, Sistem Eşitlemeleri.....	24
2.11.2. Simülasyonların Yürütülmesi.....	25
2.11.3. Yörünge Analizlerinin Yapılması.....	25

3. <i>BULGULAR</i>	25
3.1. Potansiyel Bölgelerde Moleküler Kenetlenme Sonuçları.....	25
3.2. Membran Eklenen Kenetlenme Sonuçlarının Yapısal Analizi.....	30
3.3. NaV Kanalları ve Hm1a Arasında En Sık Tekrarlayan Etkileşim Bölgeleri.....	31
3.4. NaV1.1 ve NaV1.2'nin Yeniden Modellenmesi.....	32
3.5. Kısıtlanmış Aktif Bölgeler ile Tekrarlanan Kenetlenme Çalışması	33
3.5.1. Kenetlenme Çalışmalarının Karşılaştırılması	35
3.6. İkinci Kenetlenme Çalışmasından Elde Edilen Etkileşim Noktaları	36
3.7. Moleküler Dinamik Simülasyonu Sonuçları	40
3.7.1. RMSD Analizi.....	41
3.7.2. RMSF Analizi	42
3.7.3. Bağlanma Enerjisi Değişimi.....	43
4. <i>TARTIŞMA</i>	44
5. <i>SINIRLAMALAR</i>	47
6. <i>GELECEK ÇALIŞMALAR VE ÖNERİLER</i>	48
KAYNAKÇA	49

KISALTMALAR

NaV: Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalı

PDB: Protein Data Bank

PPI: Protein-Protein Etkileşimleri

RMSD: Kök Ortalama Kare Sapma

DS: Dravet Sendromu

PD: Gözenek Alanı (Pore Domain)

CNS: Merkezi Sinir Sistemi (Central nervous system)

AIS: Akson başlangıç segmenti (Axon initial segment)

BTX: Batrachotoxin

TTX: Tetrodotoksin

STX: Saksitoksin

Hm1a: Delta-theraphotoxin-Hm1a

Hj1a: Delta-buthitoxin-Hj1a

Pre1a: Beta/delta-theraphotoxin-Pre1a

Pre1a:

MDS: Moleküler Dinamik Simülasyonu

LPS: Lipopolisakkaritler

LOS: Lipooligosakkaritler

ns: Nanosaniye

fs: Femtosaniye

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Voltaj kapılı sodyum kanalı alfa alt birimlerinin terminolojisi ve bazı işlevleri	4, 5
Tablo 2. Homolog alanlarda ve farklı NaV kanallarında S1-S2 ve S3-S4 hücre dışı döngülerinin aminoasit içerikleri	17
Tablo 3. Çalışmada kullanılan NaV Kanallarına ilişkin bilgiler	17
Tablo 4. Çalışmada kullanılan seçilmiş toksinlere ilişkin bilgiler	17
Tablo 5. Çalışmada kullanılan NaV aktif bölgeleri	19
Tablo 6. NaV1.1 ve NaV1.2 için seçilen aktif bölgeler	21
Tablo 7. Hm1a ve Hj1a için seçilen aktif bölgeler	21
Tablo 8. CHARMM-GUI ile oluşturulan membranlarda kullanılan lipitler ve yaklaşık miktarı	23
Tablo 9. MDS için kullanılan yapılar ve çalışma süreleri	25
Tablo 10. DIV S1-S2 bölgesinde gerçekleştirilen kenetlenme çalışmaları HADDOCK skorları	26
Tablo 11. S1-S2 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri	26
Tablo 12. S1-S2 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri ve ısı haritası	27
Tablo 13. DIV S3-S4 bölgesinde gerçekleştirilen kenetlenme çalışmaları HADDOCK skorları	27
Tablo 14. S3-S4 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri	28
Tablo 15. S3-S4 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri ve ısı haritası	28
Tablo 16. Hm1a ve NaV1.1 ikinci kenetlenme çalışması sonuçları	32
Tablo 17. Hm1a ve NaV1.2 ikinci kenetlenme çalışması sonuçları	33
Tablo 18. Hj1a ve NaV1.1 ikinci kenetlenme çalışması sonuçları	33
Tablo 19. Hm1a ve NaV1.1 birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarının karşılaştırılması	34
Tablo 20. Hm1a ve NaV1.2 birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarının karşılaştırılması	34
Tablo 21. Hj1a ve NaV1.1 birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarının karşılaştırılması	35

Tablo 22. Hm1a ve NaV1.1 arasındaki etkileşim noktaları	35
Tablo 23. Hj1a ve NaV1.1 arasındaki etkileşim noktaları	36
Tablo 24. Hm1a ve NaV1.2 arasındaki etkileşim noktaları	36

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sodyum kanal yapısı	3
Şekil 2. NaV kanal görünümü	4
Şekil 3. NaV kanallarının voltaja duyarlı alanları (VDS) ile etkileşime giren toksinler ve etkileri	6
Şekil 4. NaV kanallarının gözenek bölgesi ile etkileşime giren toksinler ve etkileri	7
Şekil 5. NaV kanalları ile etkileşime giren farklı canlılardan elde edilen toksin çeşitleri ..	8
Şekil 7. Farklı toksinler için önerilen DIV S3-S4 alanı hedef bağlanma bölgeleri	10
Şekil 8. MD simülasyonları için kullanılan klasik kuvvet alanları	13
Şekil 9. Çalışma basamakları ve kullanılan yöntemlerin özet gösterimi	15
Şekil 10. Farklı NaV kanallarında DIV S1-S2 ve DIV S3-S4 bölgesinde bulunan aminoasitler	16
Şekil 11. PDBsum analiz sonuçları örneği	19
Şekil 12. Nöronal membran lipidleri	22
Şekil 13. Aktif bölge olarak tanımlanan S1-S2 hücre dışı döngüsü, kenetlenme sonuçlarının PYMOL kullanılarak görselleştirilmesi	29
Şekil 14. Aktif bölge olarak tanımlanan S3-S4 hücre dışı döngüsü, kenetlenme sonuçlarının PYMOL kullanılarak görselleştirilmesi	29
Şekil 15. Hm1a ve 7 farklı NaV kanalı arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri	30
Şekil 16. Hm1a ve 7 farklı NaV kanalı arasındaki tuz köprüleri	30
Şekil 17. NaV1.1 kanalına ait homoloji modelleme analiz sonuçları	31
Şekil 18. NaV1.2 kanalına ait homoloji modelleme analiz sonuçları	32
Şekil 19. NaV1.1- Hm1a etkileşim noktalarının PYMOL ile görselleştirilmesi.....	38
Şekil 20. NaV1.2- Hm1a etkileşim noktalarının PYMOL ile görselleştirilmesi.....	39
Şekil 21. NaV1.1- Hm1a etkileşim noktalarının PYMOL ile görselleştirilmesi.....	40

Şekil 22. NaV1.1 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSD analiz grafiği.....	41
Şekil 23. NaV1.2 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSD analiz grafiği.....	41
Şekil 24. NaV1.1 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSD analiz grafiği.....	41
Şekil 25. NaV1.1 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSF analiz grafiği.....	42
Şekil 26. NaV1.2 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSF analiz grafiği.....	42
Şekil 27. NaV1.1 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSF analiz grafiği.....	43
Şekil 28. NaV1.1- H1a etkileşiminin MDS boyunca toplam bağlanma enerjisi değişim grafiği.....	43
Şekil 29. NaV1.2- H1a etkileşiminin MDS boyunca toplam bağlanma enerjisi değişim grafiği.....	44
Şekil 30. NaV1.1- H1a etkileşiminin MDS boyunca toplam bağlanma enerjisi değişim grafiği.....	44
Şekil 31. NaV1.1 ve H1a bağlanmasında en sık tekrarlayan etkileşim noktaları ve etkilenen bölge analizi.....	45
Şekil 32. NaV1.2 ve H1a bağlanmasında en sık tekrarlayan etkileşim noktaları ve etkilenen bölge analizi.....	45
Şekil 33. NaV1.1 ve H1a bağlanmasında en sık tekrarlayan etkileşim noktaları ve etkilenen bölge analizi.....	46

GİRİŞ

Voltaj kapılı sodyum kanalları, sodyum iyonlarına seçici olarak geçirgen olan ve zar potansiyelindeki değişikliklere yanıt olarak açılan veya kapanan iyon kanallarıdır. Bu kanallar, nöronlar ve kas lifleri gibi uyarılabilir hücrelerin zarlarında bulunur ve burada aksiyon potansiyellerinin başlatılmasında ve yayılmasında çok önemli bir rol oynarlar. Membran potansiyeli daha pozitif hale geldiğinde sodyum iyonlarının hücreye hızlı akışına izin vererek, böylece zarı depolarize ederek ve bir aksiyon potansiyelinin başlamasını tetikleyerek işlev görürler. Voltaj kapılı sodyum kanalları, çoklu alt birimlerden oluşur ve hem voltaj hem de diğer çeşitli sinyal molekülleri tarafından düzenlenir [4].

NaV kanallarında oluşan sorunlar epilepsi, ağrı, miyotoni, kardiyak aritmiler ve yetersizlikler, kanser gibi çeşitli hastalıklara sebebiyet vermektedir [5]. Bu kanallardaki bozukluklar ve NaV kanallarını önemli birer terapötik hedef haline getirmektedir.

Birçok toksin ve zehir bileşeni, hücre dışı veya transmembran alanlarla etkileşimler yoluyla kanalın aktive edilmiş konformasyonunu stabilize ederek bu aktivasyon mekanizmasını ele geçirmek için evrimleşmiştir. Bu bileşikler, kanalın elektrofizyolojik özellikleri üzerindeki spesifik etkiler önemli ölçüde değişebilmesine rağmen, net kanal etkinleştiricisi ya da engelleyicisi olarak işlev görür [6], [7]. Zehirli hayvanlardan veya bitkilerden gelen sayısız toksin, voltaj kapılı sodyum (NaV) kanallarını hedeflemek üzere evrilmiştir.

Yapılan çalışmalarda NaV kanallarında, altısı çeşitli toksinler için reseptör bölgeleri olan voltaj sensör domain 2 ve 4 başta olmak üzere en az sekiz farklı bağlanma bölgesi önerilmiştir [2]. Bu bağlanma bölgelerinin tanımı genellikle karmaşıktır, çünkü bunlar, kanalın diğer bağlanma bölgeleriyle önemli ölçüde örtüşen çoklu alanları ve segmentleri üzerindeki önemli amino asitleri içerir [2]. NaV kanal hastalıklarının tedavilerinde yüksek potansiyel taşıyan toksin peptidleri yapılan çalışmalarda kanıtlanan hedefe spesifik moleküller olduğundan yeni tedaviler için bize önemli bir kaynak sunmaktadır. Bu alandaki çalışmalar yapısal ve fonksiyonel olarak henüz aydınlatılamamıştır.

İlaç geliştirmede öncü bir molekül olabilmesi için, bir molekülün hedef proteine sıkıca bağlanabilmesi gerekir; yani yüksek bir afiniteye sahip olmalıdır. Bir reseptör (örneğin bir protein) ve onun bağlanma ortağı (örneğin ilaç veya inhibitör) arasındaki çekim derecesi, ayrılma sabitinin (K_d) termodinamik değeri ile veya inhibitörler durumunda (K_i) ifade edilebilen bağlanma afinitesi ile ölçülür. Bir protein-ligand kompleksinin bağlanma afinitesini (inhibisyon sabiti, ayrılma sabiti ve bağlanma enerjisi gibi) tahmin etmek, verimli ve etkili rasyonel ilaç tasarımı için kritik öneme sahiptir [8].

Yapılan tez çalışmasında sodyum kanalları ile yapı-fonksiyon ilişkileri incelenen tarantula zehrinde bulunan Hm1a, Hm1b peptidleri [3]; akrep zehrinde bulunan Hj1a peptidi [3], voltaj kapılı sodyum kanallarından Nav1.1'i hedef aldığı yapılan çalışmalarda öne çıkmıştır. Hm1a peptidi direkt olarak bu kanalı hedef alırken diğer sodyum kanalları, kalsiyum ya da potasyum kanalları ile etkileşim göstermediği de belirtilmiştir. Bu sayede hedefe yönelik tedavilerde toksin peptidlerinin yüksek potansiyele sahip olduğu

düşünülmektedir. Bu seçici bağlanma mekanizması moleküler kenetlenme çalışmalarıyla moleküler seviyede ilk defa bu tez çalışmasında gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılacak yapılar PDB veri bankasından elde edilmiş, PYMOL üç boyutlu yapı görselleştirme ve analiz aracı kullanılarak düzenilmiş, HADDOCK kenetlenme programı ile moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır. Toksin ve sodyum kanallarının aktif bölgeleri bağlanma noktaları açığa çıkartılarak belirlenmiştir. Son olarak kenetlenme sonuçları arasından seçilen yapılar MD simülasyonları için hazırlanmış, GROMACS ile yapılan MD simülasyon çalışmaları sonucunda yukarıda bahsedilen konularda elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda protein-ligand yapılarının incelenerek, moleküller arası etkileşimlerin belirlenmiş, kenetlenme çalışmaları yapılarak bağlanma bölgeleri açığa çıkartılmıştır. Küçük moleküllerin belirli biyolojik hedeflere bağlanma afinitesini hesaplamalı olarak tahmin etme yeteneği, matematiksel bir modelin protein-ligand etkileşimlerinin belirlemesine izin verdiği için, ilaç keşfinin ilk aşamalarında son derece yararlıdır. Yapılan çalışmalar, bu toksin peptidlerinin teröpotik ilaç potensiyellerini anlamamızda bize katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda voltaj kapılı sodyum kanalları ve toksin peptidler arasındaki fonksiyonel yapı ilişkilerinin tanımlanmasında literatüre katkı sağlamaktadır.

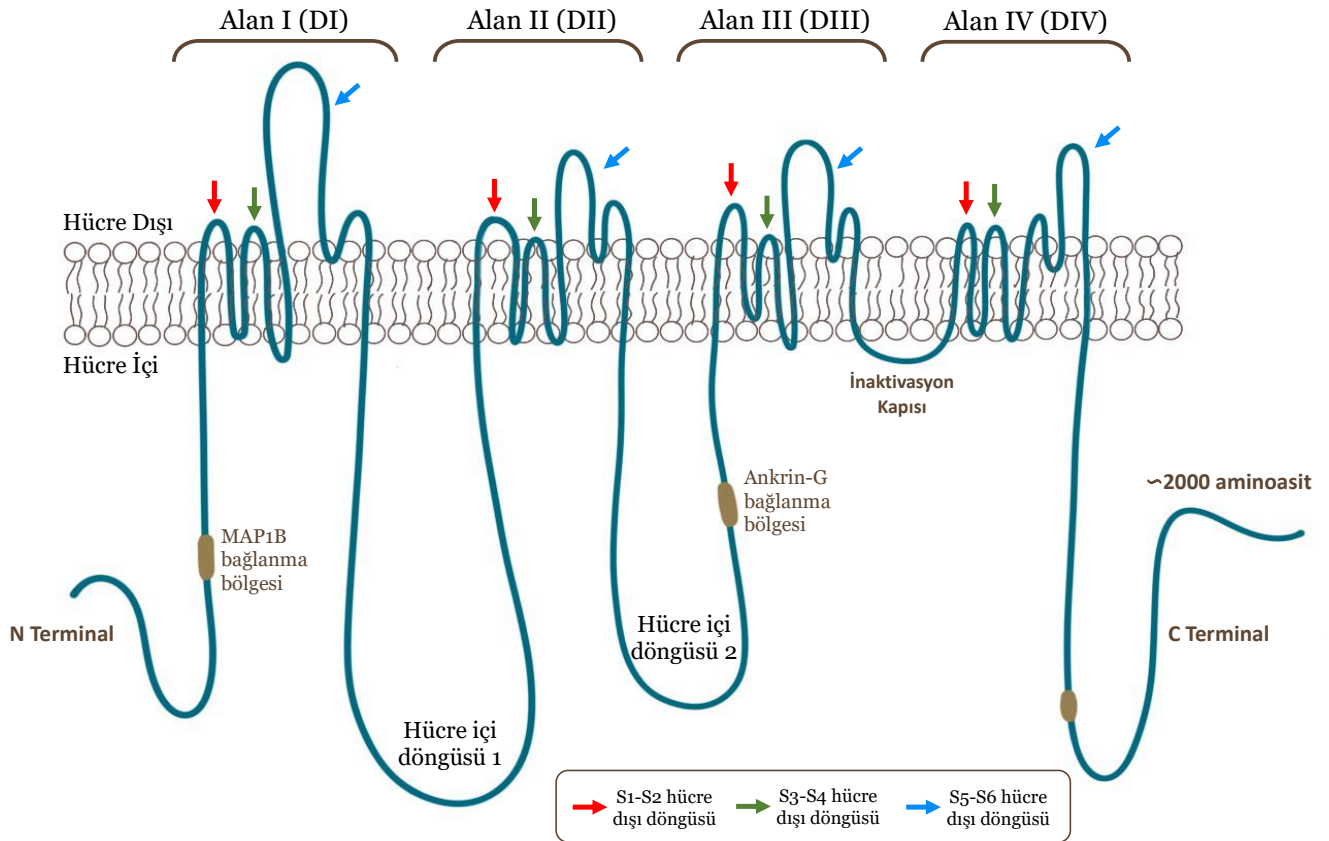
1. LİTERATÜR ÖZETİ

1.1. Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalları

Voltaj kapılı sodyum (NaV) kanalları, uyarılabilir ve uyarılabilir olmayan hücrelerde Na⁺ akışına izin veren anahtar transmembran proteinlerdir. Sodyum kanal proteinlerinin aktivasyonu, sinyallerin iletilmesindeki bileşik aksiyon potansiyelinin ilk yükselişine neden olur ve bu da kas kasılması ve nöronal ateşlemeye yol açan diğer fizyolojik olayları tetikler. Voltaja bağımlı sodyum kanalları zar potansiyelinin ayarlanması, aksiyon potansiyelinin başlatılması ve yayılması, hücre hareketliliği ve çoğalması gibi önemli görevlere sahiptir [1].

Sodyum kanalları, akson başlangıç segmentinde (AIS) ve miyelinli nöronların Ranvier düğümlerinde konsantrasyon ile nöronal hücre zarında lokalizedir. Aksiyon potansiyelleri AIS'de başlatılır ve iki yönde yayılır. Distal AIS'den (hücre gövdesinden daha uzağa) ileriye doğru yayılma, aksondan sinir terminaline doğru iletimi başlatır [9].

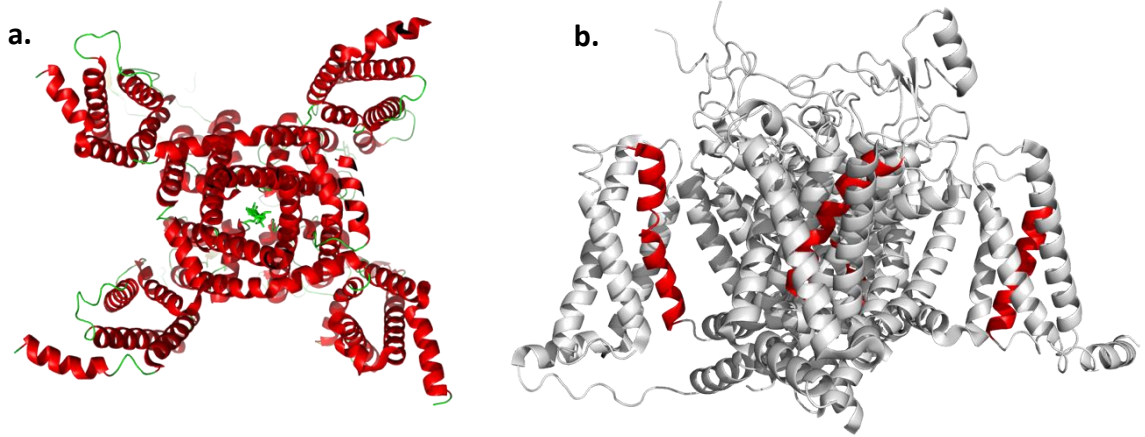
İnsanlarda 9 farklı voltaja duyarlı sodyum kanalı tanımlanmıştır. Sırasıyla NaV1.1, NaV1.2, NaV1.3, NaV1.4, 12 NaV1.5, NaV1.6, NaV1.7, NaV1.8 ve NaV1.9 kanalları SCN1A, 13 SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A ve SCN11A genleri tarafından kodlanmakta ve farklı ifade profillerine sahiptir [1], [6].



Şekil 1. Sodyum kanal yapısı.

Her kanal, 6 α -sarmal transmembran segmenti (S1-S6), Gözenek alanı (Pore Domain (PD)) ve voltaj algılama alanı (VSD) içerir. Dizi, her biri yüksek sekans korumalı 5 hidrofobik segment (S1, S2, S3, S5, S6) ve bir pozitif yüklü segment (S4) içeren 4 dahili tekrar içerir [6]. Yapıda düşük sekans korumalı iki büyük sitoplazmik (hücre içi) döngü,

yüksek oranda korunmuş bir inaktivasyon kapısı bulunur (Şekil 1). Voltaj kapılı sodyum kanalları normalde iyon iletim gözeneklerini oluşturan bir alfa alt biriminden ve kanal geçidi modülasyonu da dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip bir ila iki beta alt biriminden oluşur. Nöronal hücre zarında SCN1B, SCN2B, SCN3B ve SCN4B genleri tarafından kodlanan β -alt birimleri, α -alt birimleri ile ilişkilidir. β -alt birimleri, α -alt birimlerinin elektrofizyolojik özelliklerini etkiler, ancak kendileri kanal aktivitesine sahip değildir. Yalnızca alfa alt biriminin ifadesi, işlevsel bir kanal oluşturmak için yeterlidir.



Şekil 2. NaV kanal görünümü. a. Kanalin alttan görünümü, 4 homolog alan ve gözenek alanı (Pore Domain). b. Kanalin yandan görünümü, kırmızı renkte boyalı sarmallar pozitif yüklü S4 segmentini göstermektedir.

NaV kanallarının aktivatörü membran voltajıdır. Yükün membran çift katmanları boyunca dağılımı sırayla yüklü transmembran segmentlerinin pozisyonunu etkileyerek merkezi Na^+ geçirgen gözeneğin açılmasına veya kapanmasına yol açar. Bunu sağlayan pozitif yüklü S4 segmentinin membran voltajına bağlı olarak aşağı ve yukarı hareketidir (Şekil 2) [10].

1.2. Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalları ile İlişkili Hastalıklar

Sodyum kanalları, insan genomundaki en yüksek düzeyde evrimsel olarak korunan genler arasındadır ve omurgasız ve prokaryotik sodyum kanallarına dizi özdeşliğinin birçok bölgesini korur. Normal kanal işlevinden sapmalar, nöbetler, zihinsel yetersizlik, davranış anormallikleri ve hareket bozuklukları dahil olmak üzere önemli klinik sonuçlara yol açar (Tablo 1).

Tablo 1. Voltaj kapılı sodyum kanalı alfa alt birimlerinin terminolojisi ve bazı işlevleri [11].

Protein	Gen	İfade profili	İlişkili insan kanalopatileri
NaV1.1	SCN1A	Merkezi nöronlar, [periferik nöronlar] ve kardiyak miyositler	Febril epilepsi, GEFS+, Dravet sendromu, sınırdan SMEI (SMEB), West sendromu, Doose sendromu, inatçı çocukluk çağı epilepsisi genelleştirilmiş tonik-klonik nöbetler (ICEGTC), Panayiotopoulos sendromu, ailesel hemiplejik migren (FHM), ailesel otizm, Rasmussens ensefaliti ve Lennox-Gastaut sendromu [12]

NaV1.2	SCN2A	Merkezi nöronlar, periferik nöronlar	Kalıtsal ateşli nöbetler, epilepsi ve otizm spektrum bozukluğu
NaV1.3	SCN3A	Merkezi nöronlar, periferik nöronlar ve kardiyak miyositler	Epilepsi, ağrı, beyin malformasyonları[13], [14]
NaV1.4	SCN4A	İskelet kası	Hiperkalemik periyodik felç, paramiyotoni konjenita ve potasyumla ağırlaştırılmış miyotoni
NaV1.5	SCN5A	Kardiyak miyositler, innerve edilmemiş iskelet kası, merkezi nöronlar, gastrointestinal düz kas hücreleri ve Cajal'ın interstisyel hücreleri	Kardiyak: Uzun QT sendromu Tip 3, Brugada sendromu, progresif kardiyak iletim hastalığı, ailesel atriyal fibrilasyon ve idiyopatik ventriküler fibrilasyon [15] Gastrointestinal: İrritabl bağırsak sendromu [16]
NaV1.6	SCN8A	Merkezi nöronlar, dorsal kök gangliyonları, periferik nöronlar, kalp, glia hücreleri	Epilepsi [17], ataksi, distoni, titreme[18]
NaV1.7	SCN9A	Dorsal kök gangliyonları, sempatik nöronlar, Schwann hücreleri ve nöroendokrin hücreler	Eritromelalji, PEPD, kanalopati ile ilişkili ağrıya karşı duyarsızlık ve yakın zamanda fibromiyaljinin engelleyici bir formu keşfedildi (rs6754031 polimorfizmi) [19]7.07.2023 00:08:00
NaV1.8	SCN10A	Dorsal kök gangliyonları	Ağrı [14], nöropsikiyatrik bozukluklar
NaV1.9	SCN11A	Dorsal kök gangliyonları	Ağrı [14]

SCN1A (Nav1.1'i kodlayan), SCN2A (Nav1.2'yi kodlayan) ve SCN8A (Nav1.6'yı kodlayan) genleri birlikte beyin sodyum kanalı transkriptlerinin %95'inden fazlasını oluşturur ve beyindeki bilinen sodyum kanalopatilerinin çoğundan sorumludur. Yapılan bir çalışmada, epilepsi ve nörogelişimsel bozukluğu olan 8.565 kişinin %5'i bu genlerden birinde bir varyant taşıdığı tespit edilmiştir [20].

Nav1.1'i kodlayan gen olan SCN1A'nın bir alelindeki de novo fonksiyon kaybı mutasyonları Dravet sendromuna (DS) neden olur [21]. DS, çocukluk çağında başlayan polimorfik nöbetlerle ilişkili, genellikle vücut sıcaklığındaki küçük bir artışla hızlandırılan, katastrofik bir epileptik ensefalopatidir [22]. DS'lu hastalar daha sonra bilişsel eksiklikler, psikomotor gerileme, otistik özellikler ve artmış erken ölüm riski dahil olmak üzere çoklu nöropsikiyatrik hastalıklar geliştirir. DS'nin tanımlayıcı özelliklerinden biri, çoğu anti-epileptik ilaca dirençli olmasıdır [2].

Ağrı, mevcut veya potansiyel doku hasarı nedeniyle rahatsız edici bir duyuşsal deneyim ile ilişkili doğal bir savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizma, periferik sinir sistemindeki iyon kanalları ve reseptörler yoluyla zararlı uyarıların algılayan birincil duyuşsal nöronları ve aksonları içerir ve bu sinyalleşmede NaV kanalları önemli bir rol oynar. Daha yakın zamanlarda yapılan araştırmalar, bazı NaV kanallarının alt tiplerinin ağrı yollarına katılımını daha ayrıntılı olarak göstermiştir [23].

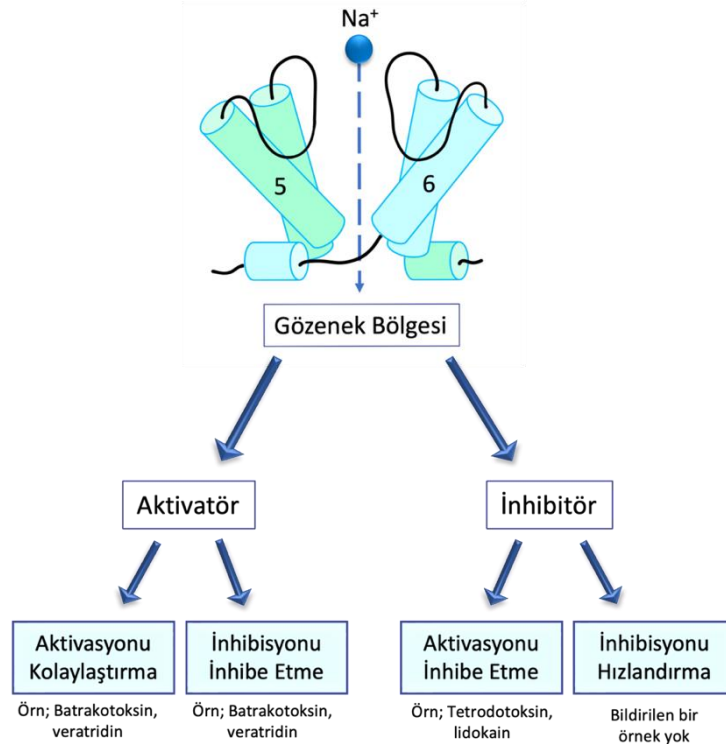
SCN3A, CNS gelişiminin erken dönemlerinde yüksek düzeyde ve yetişkin CNS'de daha düşük bir seviyede ifade edilen bir sodyum kanalını kodlar. Küçük ama artan sayıda

SCN3A mutasyonu, epileptik ensefalopati [24] ve polimikrogiri ve mikrosefali [13] dahil olmak üzere kortikal malformasyonlarla ilişkilendirilmiştir.

1.3. NaV Kanalı ile İlişkilendirilen Toksinler

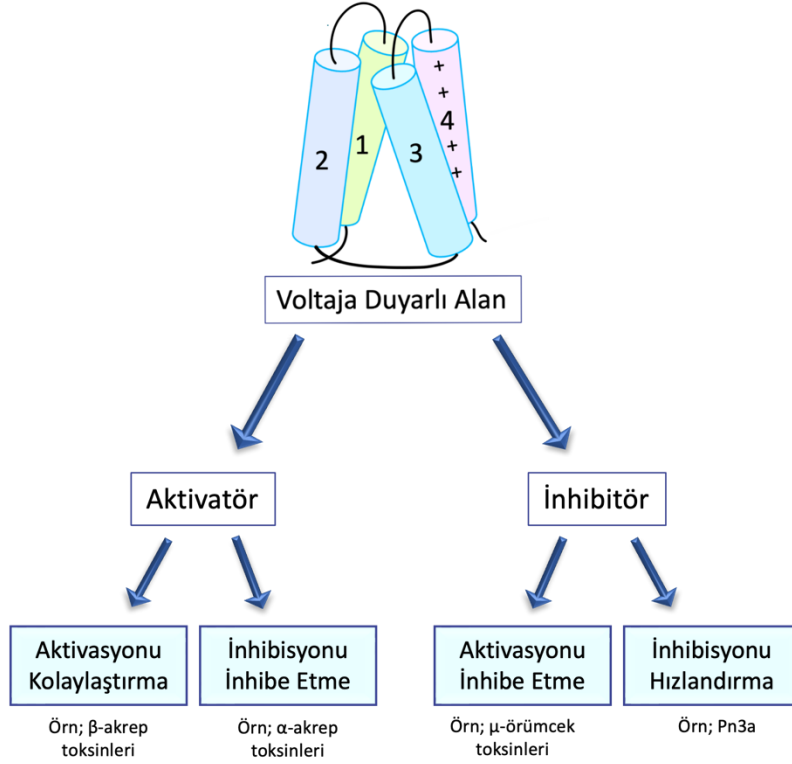
NaV kanallarında oluşan sorunlar çeşitli hastalıklara sebebiyet vermektedir ve bu hastalıkların tedavilerinde seçici bağlanma özelliklerinden dolayı yüksek potansiyel taşıyan toksin peptidleri yeni tedaviler için bize önemli bir kaynak sunmaktadır. Literatürde çeşitli canlılardan elde edilen birçok toksinin NaV kanalları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Voltaj kapılı sodyum kanalı bozuklukları ve toksinler karmaşık bir ilişkiye sahiptir. NaV kanallarını hedefleyen toksinler, spesifik özelliklerine bağlı olarak hücreler ve organizmalar üzerinde çeşitli etkilere sahip olabilir. Bazı toksinler kanalları bloke ederek aksiyon potansiyellerinin başlamasını engelleyebilir ve felce veya ölüme yol açabilirken, diğerleri kanalların aşırı aktivasyonuna neden olarak nöbetlere veya diğer semptomlara yol açabilir. Bu toksinlerin örnekleri arasında alkol, böcek ilaçları ve bazı ilaçlar bulunur. Öte yandan, bazı toksinler de anormal kanalların aktivitesini bloke ederek bu bozukluklar üzerinde terapötik etkilere sahip olabilir. Örneğin, kabuklu deniz hayvanlarında bulunan saksitoksin toksini, sinir hasarının neden olduğu ağrı için bir tedavi olarak kullanılmıştır. Ek olarak, zehirden türetilen bazı bileşikler, çeşitli kanalopatiler ve nöropatik ağrı için tedavi potansiyeli göstermiştir. Özetle, bazı toksinler voltaj kapılı sodyum kanallarına zararlı olabilirken, diğerleri de faydalı olabilir ve terapötik uygulamaları olabilir [25].



Şekil 3. NaV kanallarının voltaja duyarlı alanları (VDS) ile etkileşime giren toksinler ve etkileri.

Genel olarak, Nav kanalı işlevini etkileyen toksinler, bunu iki farklı mekanizma aracılığıyla yapar. Gözenek bloke edici toksinler, dış girişe veya iyon iletim gözeneginin



Şekil 4. NaV kanallarının gözenek (pore) bölgesi ile etkileşime giren toksinler ve etkileri.

içine bağlanarak Na⁺ akışını engellerken [26], geçit değiştirici (gating-modifier) toksinler ise kanalın açılması sırasında konformasyon değiştiren bir bölge ile etkileşime girer [27].

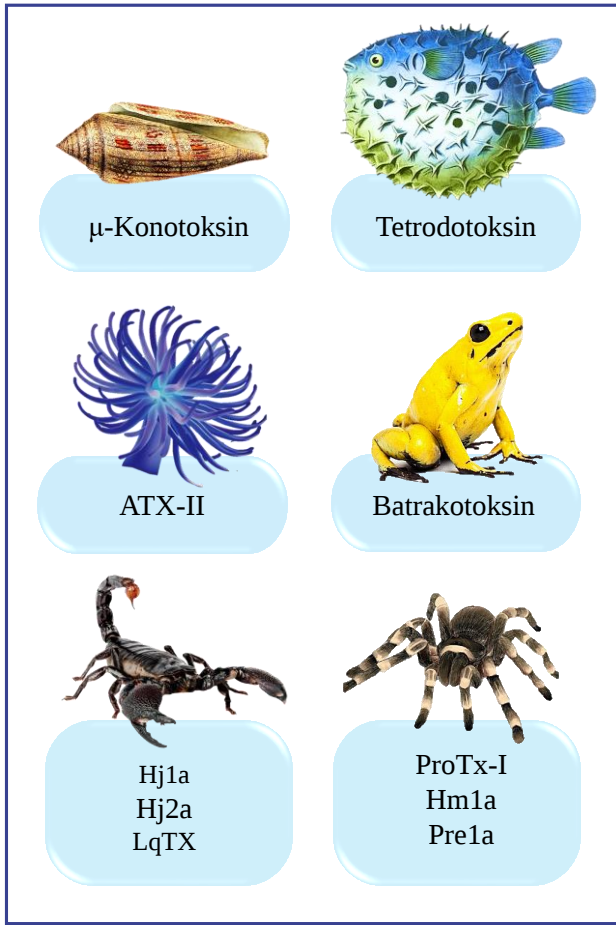
Örneğin (Şekil 5) koni salyangoz zehrinde bulunan gözenek bloke edici μ-konotoksin peptitleri, en iyi karakterize edilmiş Nav kanalı antagonistleri arasındadır. NaV kanalı gözenek bloke edici yeni koni salyangozu zehirlerinin belirlenmesi, 700 koni salyangoz türü için oluşturulan moleküler filogeni çerçevesi kullanılarak mümkün olmuştur [27].

Doğal olarak oluşan deniz toksinleri tetrodotoksin (TTX) ve saksitoksin (STX), Na⁺ geçirgenlik yolunu tıkamak için Nav kanalı gözenek bölgesi ile güçlü bir şekilde etkileşime girer [28]. ATX-II, *Anemonia Sulcata* deniz anemonunda bulunur ve Nav kanalının hızlı etkisizleştirilmesini engeller [27].

Batrachotoxin (BTX) özellikle kurbağa türlerinde bulunur. BTX iyon geçirgenlik yolunu kısmen tıkayabilir ve böylece Na⁺'nın bir kısmının gözenekten geçmesi için yer bırakır. BTX gözenek bölgesi içinde bağlanabilse de toksin aynı zamanda hızlı ve yavaş inaktivasyonu ortadan kaldırır ve NaV kanal açıklığını normalde kapalı olduğu voltajlara kaydırır. Böylece in vivo olarak tekrarlanan depolarizasyonlara ve kaslar nöronal sinyallere karşı duyarsız hale geldikçe nihai felce yol açar. BTX, ilaç tasarımı için uygun olmasada, radyoaktif BTX, dokularda ve veziküllerde NaV kanal tanımlaması için ve potansiyel terapötiklerin taranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [27], [29].

Yaklaşık 400 milyon yıllık evrim boyunca akrepler, memeli veya böcek iyon kanalı ailelerini spesifik ve güçlü bir şekilde hedeflemek için peptit toksinlerini geliştirdiler. Bu nedenle, akrep zehri üzerine yapılan klasik araştırmalar, Nav kanalı voltaj sensörü

işlevine müdahale edebilen toksinlerin varlığını kabul etmiştir [30], [31]. İşlevsel etkilerine dayalı olarak iki Nav kanalı akrep toksini sınıfı tanımlanmıştır [32].



Şekil 5. NaV kanalları ile etkileşime giren farklı canlılardan elde edilen toksin çeşitleri

olarak kanal açılmasını engellemesidir [34], [35]. Diğer bir sonuç ise toksinin alan IV hareketini bozarak hızlı inaktivasyonu geciktirmesidir [36]. Son olarak toksin, aktivasyon voltajını daha hiperpolarize değerlere kaydırarak kanal açılmasını kolaylaştırabilir [37].

1.4. Toksinlerin Sodyum Kanalları Üzerindeki Etkilerini Gösteren Deneysel Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada ilginç bir şekilde ProTx-I, sıçan DRG nöronlarında Nav1.9 aracılı akımları güçlendirirken, diğer TTX dirençli kanal Nav1.8'i inhibe ettiği tespit edilmiştir [35]. İlgili tarantula toksini ProTx-II, incelenen diğer Nav kanalı izoformlarına kıyasla en az 100 kat daha yüksek bir afinite ile çeşitli ağrı sendromlarında yer alan bir NaV kanalı izoformu olan Nav1.7'yi seçici olarak hedeflediği bildirilmiştir [38].

Bir çeşit tarantula *Heteroscodra Maculata*'dan elde edilen Hm1a toksin peptidinin Nav1.1 üzerindeki seçiciliğini doğrulamak için yapılan bir çalışmada, xenopus oositlerde Nav1.1–1.8 α alt birimlerini heterolog olarak ifade edilmiştir. Hm1a, hNav1.1 inaktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir, hNav1.2 ve hNav1.3 üzerinde zayıf etkiler tespit edilmiş ve hNav1.4 üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür. Hm1a

peptidi direk olarak Nav1.1 kanalını hedef alırken diğer sodyum kanalları, kalsiyum ya da potasyum kanalları ile önemli ölçüde etkileşim göstermediği de belirtilmiştir [23].

Hj1a ve Hj2a, Nav1.1'in güçlü agonistleridir ve kanalın hem aktivasyon hem de inaktivasyon özelliklerini değiştirerek ikili α/β aktivitesi sunarlar [3]. Örneğin, SCN1A'nın heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları, şiddetli bir pediatrik epilepsi olan Dravet sendromuna (DS) yol açabilmektedir. Yakın zamanda Hj1a peptidinin fareye enjeksiyonu ile Nav1.1 inaktivasyonunun seçici inhibisyonu sağlanmıştır ve DS fare modelinde nöbetleri ve erken ölümü önlediğini gösterilmiştir. Bu nedenle toksinlerin, Nav1.1'in seçici modülatörleri, altta yatan moleküler açığı hedefledikleri için DS'nin tedavisi için faydalı terapötikler olabileceği düşünülmektedir [2].

Pre1a, Nav1.3'ün hızlı inaktivasyonunu tercihen inhibe ettiği, Nav1.2, Nav1.6 ve Nav1.7'nin aktivasyonunu inhibe ettiği ve Nav1.1'in hem aktivasyonunu hem de hızlı inaktivasyonunu inhibe ettiği nöronal NaV kanalı alt tipleri arasında benzersiz ve karmaşık bir farmakolojik profil sergilediği görülmüştür. Yapılan deneylerde Pre1a'nın mikromolar altı konsantrasyonlarda Nav1.4 veya Nav1.5 üzerinde etkisi olmadığı tespit edilmiştir[39]. Bu işlevsel profil, NaV kanalı VSD'lerinin DII ve DIV S3-S4 döngüleri ile klasik etkileşimler tarafından belirlenir. Bağlanma bölgelerinin analizi yoluyla, NaV kanalları arasındaki S1-S2 döngülerinin değişkenliğinin, özellikle hızlı etkisizleştirme ile ilgili Pre1a seçiciliğine büyük ölçüde katkıda bulunduğu belirtilmiştir. DIV S2 sarmalındaki bir serin aminoasitinin, Pre1a'nın Nav1.1 ve 1.3'ün hızlı inaktivasyon süreci üzerindeki güçlü ve seçici inhibitör etkisini açıklamak için yeterli olduğu bildirilmiştir [39].

1.5. Toksinlerin NaV üzerindeki potansiyel bağlanma bölgeleri

Teröpotik hedef olan NaV kanallarında toksin bağlanma bölgelerinin tespiti için floresan bazlı testler ve otomatik yama-kelepçe elektrofizyolojisi dahil olmak üzere NaV kanal modülatörlerinin aktivitesini taramak ve profillemek için birkaç yüksek verimli analiz geliştirilmiştir [40], [41]. Floresan bazlı deneyler, floresan boya ile membran potansiyeli veya hücre içi sodyum iyonu konsantrasyonundaki değişiklikleri saptayarak NaV kanal fonksiyonunun dolaylı bir ölçümünü sağlar [40].

Yapılan çoklu dizi hizalaması deneylerinde, Nav1.1 ve Nav1.2 alan IV S1-S2 hücre dışı döngülerinin LqhII ve Hm1a toksin peptidleri bağlanmasında önemli aminoasit rezidüleri içerdiği bildirilmiştir (Şekil 6). Farklı NaV kanallarında alan IV S3 - S4 hücre dışı döngüsünün δ -örümcek toksinleri Cg1a, Cg3a ve Hm1a β -pompilidotoxin, the α -scorpion toxins LqTx, LqhII and LqhIII, the δ -conotoxin SVIE, ve deniz anemonu toksinleri ATX-II and ApB bağlanmasında önemli rezidüleri içerdiği bildirilmiştir (Şekil 7) [1].

Şimdiye kadar karakterize edilen NaV kanalı modüle edici örümcek zehiri peptitlerinin çoğu, inhibe edici sistein düğümünün (ICK) ortak bir yapısal motifini paylaşır ve kısmen tanımlanmış reseptör bölgelerinde dört VSD'den biriyle etkileşime girer [35], [42].

Tarantula *Psalmopoeus reduncus*'un zehirinden β/δ -TRTX-Pre1a'yı (Pre1a) kullanılarak NaV kanalları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda Pre1a'nın NaV kanalı VSD'lerinin DII ve DIV S3-S4 döngüleri ile etkileşime geçtiği bildirilmiştir. Bununla birlikte kanıtlar S1-S2 döngülerinin Pre1a tarafından gösterilen izoform

seçiciliğini için kritiktir. Bu nedenle Pre1a, NaV kanal ailesinin üyeleri arasındaki DII ve DIV etkileşim sitelerindeki ince farkları incelemek için değerlidir [39].

Genel olarak, akrep toksinleri, belirli durumlarda NaV kanallarının voltaj sensörlerini stabilize etmek için S3 ve S4 arasındaki hücre dışı döngülerle etkileşime girer [32]. α -akrep toksinlerinin alan IV voltaj sensöründe aynı konuma bağlanmak için rekabet ettikleri bulunmuştur [32]. β -akrep toksinlerinin alan II voltaj sensörü içindeki kürek motifini hedeflediği ve onu aktif bir durumda yakaladığı düşünülmektedir [33].

	DIV S1	DIV S1-S2	DIV S2
NaV1.1	L N M V T M M V	E T D D Q S E Y V T T	I L S R I N L V F I
NaV1.2	.	.	Q E M T N . . Y W
NaV1.3	.	.	G K . M . L V
NaV1.4	.	.	N . . Q L K V D . . Y N . . M I . .
NaV1.5	.	.	P E K I N . . A K . . . L . V
NaV1.6	.	.	T . . K Q M E N . . Y W V
NaV1.7	.	.	K E G . . Q H M . E V . . Y W . . V . .

Benzerlik

Hm1a LqhII

Şekil 6. Farklı toksinler için önerilen DIV S1-S2 alanı hedef bağlanma bölgeleri. J.R. Deuis ve ark. 2017 yılında yaptığı çalışmadan alınmıştır[1].

	DIV S3	DIV S3-S4	DIV S4
NaV1.1	S I V G M F L A E L I	E K - - Y F V S P T L F	R V I R L A R I G R
NaV1.2	.	.	.
NaV1.3	.	.	.
NaV1.4	.	.	.
NaV1.5	.	.	.
NaV1.6	.	.	.
NaV1.7	.	.	.

Benzerlik

LqhII LqhII, LqTx, ATX-II Cg1a, Cg3a, ApB LqhIII β -pompilidotoksin, ATX-II LqhII, SVIE ATX-II Hm1a

Şekil 7. Farklı toksinler için önerilen DIV S3-S4 alanı hedef bağlanma bölgeleri. J.R. Deuis ve ark. 2017 yılında yaptığı çalışmadan alınmıştır[1].

1.6. Peptitler İçin Moleküler Kenetlenme

Protein-peptit etkileşimleri, sinyal iletimi, hücresel lokalizasyon, bağışıklık sistemi ve apoptotik yolları içeren çeşitli biyolojik süreçlerde esastır. Bu tür etkileşimler, tüm makromoleküler etkileşimlerin yaklaşık %40'ında yapısal bileşenler olarak işlev görür. Peptitler, istenmeyen protein-protein etkileşimleri nedeniyle proteinlerin fonksiyon bozukluğunu içeren hastalıkları önlemek için kullanılabilir. Geçmişte spesifik olarak peptit bazlı terapötikler alanında birçok veri tabanı ve algoritma geliştirilmiştir. Çeşitli hastalıkların tedavisi için FDA tarafından onaylanan 200'den fazla terapötik peptit vardır.

Peptitler, proteinlerden daha esnek ve çok sayıda konformasyon benimseme eğilimindedir. Bu nedenle, protein-peptit etkileşimlerinin modellenmesi zorlu ve zaman alan bir iştir. Bir peptit-protein kompleksinin oluşumu, genellikle reseptöre bağlandıktan sonra esnek peptitin katlanması içerir [43]. Peptid-protein etkileşiminin atomik tanımı ve önemli atomistik etkileşimlerin (örneğin hidrojen bağları, tuz köprüleri ve hidrofobik etkileşimler) özetlenmesi çok önemli bir adımdır.

Protein-peptit komplekslerinin yapısal tayini için geçmişte çok sayıda yerleştirme yöntemi geliştirilmiştir. Genel olarak, bu yöntemler aşağıdaki 3 kategoride sınıflandırılabilir; i) protein-peptit kenetlenmesi, ii) protein-protein kenetlenmesi ve iii) protein-küçük molekül kenetlenmesi. HADDOCK[44], PepATTRACT [45], FlexPepDock [46], PEP-SiteFinder [47], vb. gibi protein-peptit yerleştirme yöntemleri bulunmaktadır. Benzer şekilde, küçük molekülleri bir proteine yerleştirmek için geliştirilen bazı yazılımlar, peptidi bir proteine yerleştirmek için de kullanılabilir, örneğin AutoDock Vina [48].

Özetle, doğrudan veya dolaylı olarak peptidi bir protein üzerine yerleştirmek için kullanılabilen çok çeşitli yerleştirme yöntemleri geliştirilmiştir [49]. Peptid aracılı etkileşimler, proteinler arasındaki dinamik etkileşimleri içeren birçok düzenleyici süreçteki baskın rolleri nedeniyle artan ilgi görmektedir. Bu tür etkileşimlerin yapıları, karakterizasyonları ve manipülasyonları için mükemmel bir başlangıç noktası sağlar ve hedeflenen inhibitör tasarımı için ipuçları sağlayabilir. Nispeten az sayıdaki deneysel olarak belirlenmiş peptit-protein kompleks yapıları, son yıllarda artan doğruluk ve her zamankinden daha fazla sisteme uygulanabilirlik ile tanıtılan modelleme yaklaşımlarının gelişmesi ile tamamlanabilir.

Peptidin omurga yapısı hakkında çok az veya hiç ön bilgi bulunmadığında, doğala yakın yapıların ziyaret edildiğinden emin olmak için örneklemenin arttırılması gerekir. Rosetta FlexPepDock ab-initio [50], herhangi bir keyfi omurga konformasyonundan başlayarak, bir sorgu peptidinin önerilen bir bağlama cebine eş zamanlı olarak başlangıçtan itibaren katlanmasını ve yerel olarak yerleştirilmesini gerçekleştirir. Lokal bağlanma yeri, katlanmamış peptidi yakınına yerleştirerek veya Rosetta yazılımının standart bağlanma yeri sınırlamaları kullanılarak belirlenebilir. HADDOCK yazılımı kullanılarak, bu peptit konformasyonlarının her biri daha sonra bir HADDOCK kısıtlama seti olarak belirtilen bilinen bağlanma bölgesi içinde gevşetilir ve rafine edilir[51].

Çalışmalarda genel olarak bağlanma bölgesini belirlemede yüksek bir başarı oranı bildirilse de model geliştirme dahil edilmiş olsa da, elde edilen modellerin kalitesi oldukça sınırlıdır. İyileştirmeye dirençli peptit modelleri, genellikle kusurlu sekonder yapı omurga konformasyonuna işaret eder [52]. Bu nedenle, FlexPepDock ab-initio ve HADDOCK gibi bilinen bir bağlanma bölgesinde kapsamlı omurga örnekleme için optimize edilmiş yerel yerleştirme yöntemleriyle kolaylıkla geliştirilebilirler [51].

Çoğu yerleştirme aracı, model sıralaması için enerji tabanlı puanlama yöntemleri kullanır. Örneğin, Rosetta FlexPepDock, Rosetta enerji fonksiyonunu veya onun modifikasyonunu ab initio değişkeninde [50] kullanır; HADDOCK, Poisson-Boltzmann yüzey alanı algoritması [53] ile hesaplanan bağlanma serbest enerjisine dayalı bir yöntem kullanır; ve pepATTRACT, kısa MD simülasyonlarından [54] türetilen karmaşık bağlanma enerjisine göre en iyi modelleri seçer. Enerji bazlı puanlama dışında, bazı protein-peptit yerleştirme araçları, model seçimini iyileştirmek için yapısal kümeleme ve en büyük kümelerin seçimi [55], [56], birlikte evrimsel bilgilerin dahil edilmesi [57] veya mutajenez verileri [58] gibi ek yöntemler kullanır [59].

1.7. Moleküler Dinamik Simülasyonu (MDS)

Son yıllarda, protein dinamiklerini anlamak için proteinlerin doğal konformasyonel esnekliği hakkında bilgi veren NMR gevşemesi, floresans spektroskopisi ve zamana bağlı X-ışını kristalografisi gibi birkaç deneysel yöntem oluşturulmuştur [60]. Ancak, bu deneysel yöntemlerin sağladığı sınırlı bilgi nedeniyle, nanosaniyeden mikrosaniyeye dinamikleri aydınlatmak için bilgisayar simülasyon teknikleri tercih edilmektedir. Yöntemin geliştirilmesinden bu yana, MDS en yaygın ve üzerinde çalışılan hesaplamalı simülasyon tekniğidir [60], [61]. MD'de, protein moleküllerinin zamanın bir fonksiyonu olarak nasıl yeniden düzenlendiğini simüle etmek için fizik tabanlı potansiyel enerji fonksiyonu kullanılır [62]. Başka bir deyişle, MD tüm atomların konumlarının izlenmesine veya gerekirse tüm atomların, büyük makromoleküler kompleksler veya membrana gömülü proteinler dahil olmak üzere değişen zamanla birlikte kaba taneli temsiline izin verir [63].

Simülasyonlar, proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin davranışını tam atomik ayrıntıda ve çok ince zamansal çözünürlükte yakalayarak karmaşık bir ortam içinde ligand etkileşimleriyle reseptörün serbest enerji değerlerini oluşturur [64]. Biyoaktif peptitlerin etkileşimleri gibi karmaşık sistemler söz konusu olduğunda MDS, hedef proteinlerle, kuvvet alanı (FF) denklemlerini kullanarak sistemdeki her parçacığın (örneğin atomlar ve moleküller) hareket denklemlerini çözebilen çok güçlü bir tekniktir [65]. Günümüzde MDS, peptitlerin etrafındaki sıcaklık ve iyonlardan, su, organik çözücüler veya iyonik sıvılar gibi çözücünün hacmi, geometrisi ve türü gibi sistem parçacıklarının gömüldüğü çözücünün özelliklerine kadar deneyin fiziksel koşullarını hassas bir şekilde kontrol edebilmektedir. Ayrıca, in vitro ve in silico deneylerle karşılaştırmak için MDS, peptitlerin başlangıç koordinatları, protonasyon durumları, iyonlar ve zarlar gibi çevreleyen parçacıklar, sıcaklık, elektrik potansiyelleri, voltaj kapıları, membran potansiyelleri gibi diğer özellikler üzerinde fiziksel ve kimyasal kısıtlamalar getirebilir [66].

Newton'un ikinci hareket yasasına (Denklem 1) dayanan temel MD algoritması ve teknolojiye gelişmeler, MD simülasyonlarının kullanımının büyük ölçüde artmasına neden olmuştur [63], [67].

$$(\vartheta_{ix}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \exp \left(-\frac{m_i \vartheta_{ix}^2}{2k_B T} \right)$$

Denklem 1. Maxwell-Boltzmann dağılım denklemi. $p(\theta_{ix})$, x yönünde θ_{ix} hızına sahip m_i kütleli i parçacığı olasılığıdır, T ilgili sıcaklıktır ve k_B , Boltzmann sabitidir.

MD simülasyon süreci, sistemin hazırlanması ile başlar. Gerekli ilk atomistik koordinatlar çoğunlukla nükleer manyetik rezonans (NMR), kristalografik veya homoloji modelleme verilerinden toplanır ve yapı, MD simülasyonundan önce minimizasyona tabi tutulur [67]. İlk koordinatların yanı sıra, başlangıç hızlarına da ihtiyaç vardır ve bunlar Maxwell-Boltzmann dağılımından rastgele atanabilir [68].

Sistem kurulduktan sonra her adım için potansiyel enerji fonksiyonu kullanılarak her bir atoma etki eden kuvvetler hesaplanır (Şekil 9) [63]. Dahası, kuvvet alanları atomik konumların bir fonksiyonu olarak potansiyel enerji fonksiyonlarıdır ve atomlar arasındaki

bağlı ve bağlı olmayan etkileşimleri öyle basitleştirilmiş bir şekilde temsil ederler ki bilgisayar gücü MD simülasyonunu sürdürmek için yeterlidir [68]. Günümüzde MD simülasyonlarında kullanılan AMBER, CHARMM ve GROMOS gibi çoklu kuvvet alanları bulunmaktadır [67]. Herkes tarafından kullanılan enerji fonksiyonu denklemi basitçe aşağıdaki gibi gösterilebilir (Şekil 8) [68], [69].

$$\begin{aligned}
 U(R) = & \sum_{Bağ} k_r (r - r_{eq})^2 \\
 & + \sum_{Açı} k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
 & + \sum_{Dihedral} k_\phi (1 + \cos[n\phi - \gamma]) \\
 & + \sum_{Uygunsuz} k_\omega (\omega - \omega_{eq})^2 \\
 & + \sum_{i < j}^{Atom} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \sum_{i < j}^{Atom} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}
 \end{aligned}$$

Bağ

Açı

Dihedral

Uygunsuz

Van der Waals

Elektrostatik

Şekil 8. MD simülasyonları için kullanılan klasik kuvvet alanları: (Sağda) bir kuvvet alanındaki potansiyel enerji terimleri ve (Solda) moleküler hareket için atomik kuvvetleri türetmek için kullanılan enerji fonksiyonu. r bağ uzunluğudur; θ atomik açıdır; ϕ dihedral açıdır; ω uygun olmayan dihedral açıdır; r_{ij} , i ve j atomu arasındaki mesafedir; k_r , k_θ , k_ϕ ve k_ω kuvvet sabitleridir; r_{eq} , θ_{eq} ve ω_{eq} denge konumlarıdır; dihedral terim, bir kuvvet sabiti (k_ω), çokluk (n) ve faz kayması (γ) ile karakterize edilen periyodik bir terimdir; ϵ_{ij} , Lennard-Jones kuyu derinliği ile ilgilidir; r_m , potansiyelin minimuma ulaştığı mesafedir; q_i ve q_j ilgili atomların yükleridir; ve ϵ_0 dielektrik sabitidir [69].

Enerji fonksiyonunu hesaplamak için gerekli parametreler, deneysel verilere veya ab-initio kuantum kimyasal hesaplamalarına göre belirlenir ve en yaygın kullanılan kuvvet alanları, denklemde kullanılan enerji terimlerinin sayısı ile kullanılan parametrelerin modellenmesine göre birbirinden ayrılır.

1.7.1. MDS Yörünge Analizleri

MDS sonrası yapılan en önemli analizlerden biri olan ortalama karekök sapması (RMSD (Root Mean Square Deviation)), iki proteinin omurga karbon alfa atomlarını veya aynı proteinin farklı konformasyonlarını karşılaştırmak için bir ölçüdür. MD yörünge analizi için, her konformasyonun omurga atomları, başlangıç yapısının omurga atomlarına hizalanarak hesaplamalar yapılır [70]. RMSD hesaplamalarında kullanılan denklem aşağıdaki gibidir (Denklem 2).

$$RMSD(a + b) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (a_{ix} - b_{ix})^2 + (a_{iy} - b_{iy})^2 + (a_{iz} - b_{iz})^2}$$

Denklem 2. Basit gösterim ile RMSD eşitliği. Formülde, a_i sırasıyla 1. molekülün atomlarını ve b_i sırasıyla 2. molekülün atomlarını ifade eder. x, y, z alt simgeleri, her atom için x-y-z koordinatlarını belirtir.

Bir diğer analiz çeşidi olan ortalama karekök dalgalanması (RMSF), bir parçacığın (örneğin bir protein rezidüsü) bir referans konumundan (tipik olarak parçacığın zaman ortalamalı konumu) zaman içindeki ortalama sapmasını ölçerek yanının esnekliği ve hareketliliği hakkında bilgi sunar [71]. RMSF, yapının ortalama yapısından en fazla (veya en az) dalgalanan kısımlarını analiz eder. RMSF hesaplamalarında kullanılan denklem aşağıdaki gibidir (Denklem 3).

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum (x_i(t_j) - x_{ref})^2}{T}}$$

Denklem 3. Basit gösterim ile RMSF eşitliği. Formülde, T zamandır, $x_i(t_j)$ i atomunun t zamanındaki konumudur ve x_{ref} atomun ortalama konumudur.

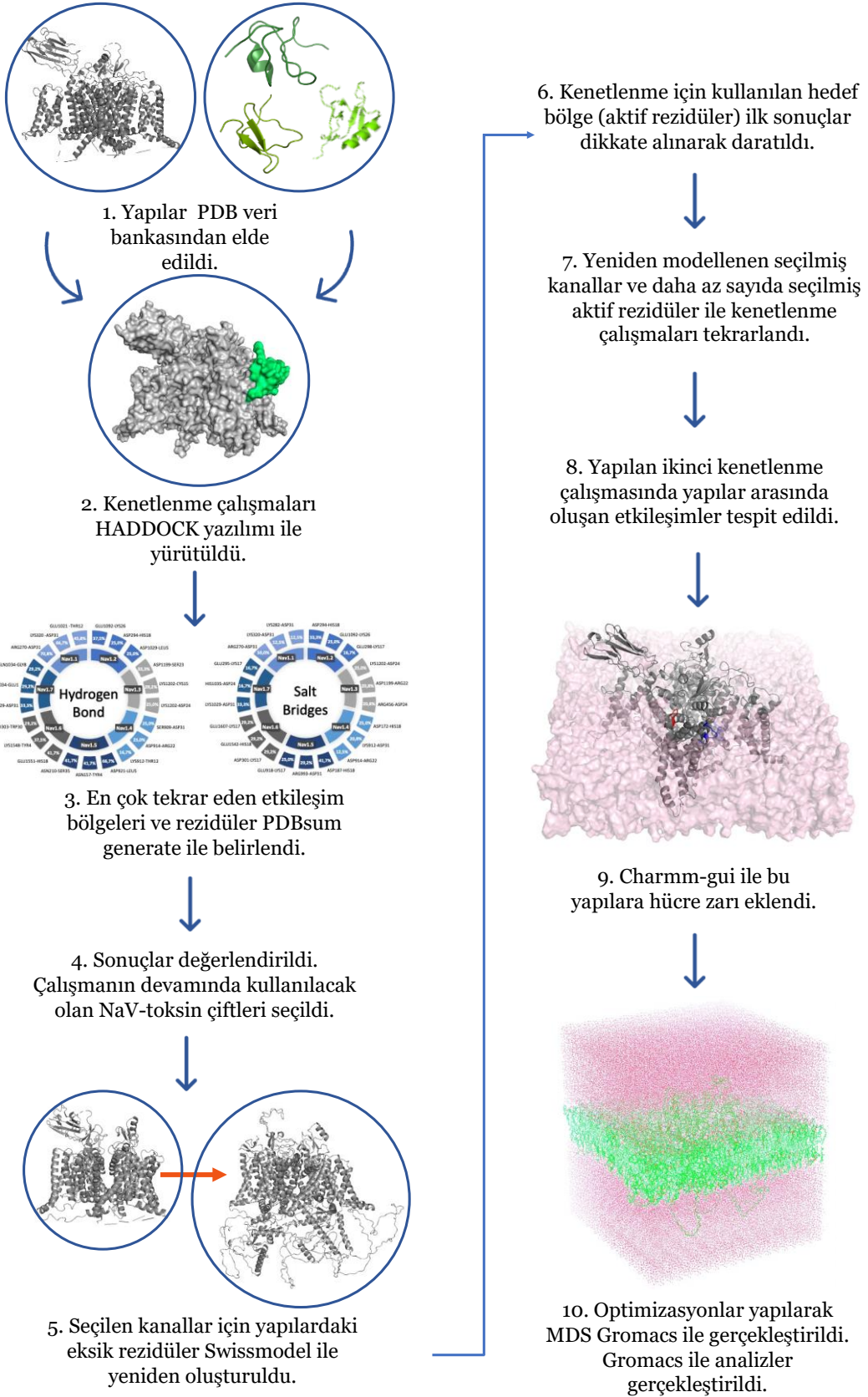
2. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında ilk olarak tarantula ve akrep gibi farklı canlılardan elde edilen ve yapılan literatür taramasında voltaja bağımlı sodyum kanallarına olan özgüllüğü kanıtlanmış toksinler belirlenmiştir. Terapötik ilaç potansiyeli en yüksek görülen üç toksin ve hastalıklar ile ilişkilendirilen 7 farklı voltaja bağımlı sodyum kanalı çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tezin ilk aşamasında toksinlerin etkilerini moleküler düzeyde incelemek ve farklı kanallara olan ilgisini belirlemek için moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır. Literatürde toksinlerin hedeflediği belirtilen, reseptör üzerinde bulunan 2 farklı bağlanma bölgesi denenmiştir. Çok tekrarlı olarak gerçekleştirilen kenetlenme çalışmaları incelenerek farklı toksinlerin farklı kanallar ile yapmış olduğu hidrojen bağları, tuz köprüleri ve bağılı olmayan etkileşimler tespit edilerek analiz edilmiştir. Böylelikle toksinler ve NaV kanalları için aktif bölgeler, bağlanmada yüksek öneme sahip aminoasit rezidüleri belirlenmiştir. Ayrıca yapılar görselleştirilerek bağlanma modelleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

İkinci kenetlenme çalışması öncesinde yapılardaki eksik rezidü kısımları homoloji modelleme ile tamamlanmıştır. Daha önce kullanılan aktif bölgelere kısıtlamalar getirilerek ikinci bir kenetlenme çalışması yapılmış ve bağlanma sonuçlarında iyileştirme sağlanmıştır. Tezin ikinci aşamasında NaV kanallarına bağlanan toksinlerin kanal aktivitesi üzerinde yarattığı etkileri görmek için moleküler dinamik simülasyon (MDS) çalışmaları yapılmıştır. Gerçeğe yakın bir model oluşturmak adına kanal proteinleri hücre zarı ile çevrenmiştir. Oluşturulan hücre zarının lipid içeriği literatürde belirtilene yakın olacak şekilde düzenlenmiştir. MDS öncesinde optimizasyon basamakları tamamlanmıştır. MDS çalışmaları TÜBİTAK Yüksek Başarımlı ve Grid Hesaplama Merkezi, Truba sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak elde edilen veriler RMSD, RMSF, etkileşim enerjisi analizleri ile değerlendirilmiştir.

Bu tezde yapılan çalışmalar Şekil 9’da özetlenmiştir.



Şekil 9. Çalışma basamakları ve kullanılan yöntemlerin özet gösterimi.

2.1. Voltaja Bağımlı Sodyum Kanalları ve Toksinlerin Seçilmesi

Yapılan literatür taramasında özellikle Hm1a, Hj1a ve Prela toksin peptidlerinin NaV1.1'e olan ilgileri dikkat çekmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar bu toksinlerinin spesifik bir hedef belirlediğini düşündürmektedir. Çalışma için seçilen bu üç toksin NaV1.1'in aktivitesinde değişikliğe sebep olurken diğer kanallar ile daha kısıtlı bir etkileşimde bulunmaktadır.

Hj1a ile NaV1.1 inaktivasyonunun seçici inhibisyonu sağlandığı yapılan hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır [2]. Aynı şekilde Prela'nın hızlı inaktivasyon sürecinde NaV1.1 ve NaV1.3 üzerinde seçici bir etkisi vardır [39]. Hm1a toksin peptidinin NaV1.1 ve NaV1.3 (daha düşük oranda) ile etkileşime girdiği bunun haricinde diğer sodyum ve potasyum kanallarının aktivitesinde bir değişiklik oluşturmadağı literatürde belirtilmiştir [23]. Spesifik hedef seçtiği bilinen ve faydalı terapötikler olarak görülen bu toksin peptidlerinin moleküler düzeydeki etkileri keşfedilmeye değerdir.

Voltaja bağımlı sodyum kanallarından hastalıklar ile en çok ilişkilendirilen Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 ve Nav1.7 çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu çalışmada toksinler hem hedef seçtikleri kanallar ile, hem de aktivitesini etkilemediği bilinen diğer kanallar ile denenecektir.

2.2. Voltaja Bağımlı Sodyum Kanallarının Karşılaştırması

Yapılan literatür taramasından elde edilen sonuçlara göre seçilen toksinler için DIV S1-S2 ve DIV S3-S4 hedef bağlanma bölgesi olarak önerilmiştir. Bu bölgeler farklı sodyum kanalları için EMBL-EBI sunucusundaki Clustel Omega Multiple Sequence Alignment [72] kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 10). Toksinlerin seçtikleri kanala yönelik spesifik bağlantılar oluşturmalarını dizilerdeki aminoasit farklılıkları etkilemektedir. Homolog alanlardaki benzer hücre dışı döngülerindeki dizi farklılıkları toksinlerin neden alan IV üzerinde bağlanma eğilimi olduğunu açıklamaktadır (Tablo 2).

Gen	Gen Dizisi	No
sp P35498 SCN1A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVDFVTRQVFDISIMILICLNMTMMVETDDQSEYVT	1570
sp Q99250 SCN2A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRANKFQGMVDFVTRQVFDISIMILICLNMTMMVETDDQSEMT	1560
sp Q9NY46 SCN3A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRANKFQGMVDFVTRQVFDISIMILICLNMTMMVETDDQSKYMT	1555
sp P35499 SCN4A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRQNKIQGMVYDLVTKQAFDITIMILICLNMTMMVETDNQSQLVK	1382
sp Q14524 SCN5A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRPLNKYQGFIFDITVTKQAFDVTIMFLICLNMTMMVETDDQSPKIK	1557
sp Q9UQD0 SCN8A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRPLNKIQGIVDFVTRQAFDIVIMMLICLNMTMMVETDTQSKQME	1551
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	MKKLGSKKPQKPIPRPGNKIQGCIFDLVTNQAFDISIMVLICLNMTMMVEKEGQSCHMT	1544
DIV S1-S2 loop		
***** * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
sp P35498 SCN1A_HUMAN	TILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYFFITIGWNIFDFVVLISIVGMFLAELIEKYFV	1630
sp Q99250 SCN2A_HUMAN	NILYWINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYFFITIGWNIFDFVVLISIVGMFLAELIEKYFV	1620
sp Q9NY46 SCN3A_HUMAN	LVLSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYFFITIGWNIFDFVVLISIVGMFLAELIEKYFV	1615
sp P35499 SCN4A_HUMAN	DILYNINMIFIIIFTGECVLKMLALRQYYFTVGWNIFDFVVLISIVGLALSLLDIQKYFV	1442
sp Q14524 SCN5A_HUMAN	NILAKINLLFVAIFTGECIVKLAALRHYFFITNSWNIFDFVVLISIVGTVLSDIIQKYFF	1617
sp Q9UQD0 SCN8A_HUMAN	NILYWINLVFVIFFTGECVLKMFALRHYFFITIGWNIFDFVVLISIVGMFLADIIKYFV	1611
sp Q15858 SCN9A_HUMAN	EVLYWINVVFIIIFTGECVLKLISLRHYFFITVGWNIFDFVVLISIVGMFLADLIETYFV	1604
DIV S3-S4 loop		
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		

Şekil 10. Farklı NaV kanallarında DIV S1-S2 ve DIV S3-S4 bölgesinde bulunan aminoasitler.

Tablo 2. Homolog alanlarda ve farklı NaV kanallarında S1-S2 ve S3-S4 hücre dışı döngülerinin aminoasit içerikleri.

	Alan I		Alan II	
	S1-S2	S3-S4	S1-S2	S3-S4
NaV1.1	TMSNPP	EFVDLGNVSA	EHYPMT	GLANVEGL
NaV1.2	TMSNPPDWT	FVDLGNVSAL	EHYPMTEQ	ANVEGL
NaV1.3	TLSNPPDW	EFVSL--VSA	EHYPMTEQ	SNVEGL
NaV1.4	TMSDPPPW	DLGNISA	MEHYPMT	ANVQGLS
NaV1.5	AQHDPWPWT	EFVDLGNVSAL	EHYNNMYS	SRMSNLSVL
NaV1.6	TFSNPPD	FVNLGNV	EHHPMTP	LADVEGL
NaV1.7	TMNNPPD	FVNLG	MEHHPM	LFL----LS
	Alan III		Alan IV	
	S1-S2	S3-S4	S1-S2	S3-S4
NaV1.1	LAFEDIYIDQRKT	GYSELG	ETDDQS	LAELIEKYFVS
NaV1.2	EDIYIEQRKTI	YSELGA	ETDDQS	EKYFVS
NaV1.3	EDYIEQRKT	GYSELG	ETDDQG	KYFVS
NaV1.4	LAFEDIYIEQRR	GYSELGPIKSL	ETDNQS	YFVSPTL
NaV1.5	LAFEDIYLEERK	FAEMGP	ETDDQS	SDIIQKYFFSPTL
NaV1.6	FEDIYIEQR	GYSELG	ETDTQS	EKYFVS
NaV1.7	LAFEDIYIERKK	GYSDLGP	EKEGQS	FVS

2.3. Kanal ve Toksin Yapılarının Elde Edilmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan 7 adet voltaja bağımlı sodyum kanalı X-Ray yapıları ve 3 farklı toksinin (Hm1a, Hj1a ve Pre1a) NMR yapıları PDB veri bankasından ‘pdb’ formatında elde edilmiştir. Yapılara ait detaylı bilgiler aşağıdaki tabloda bulunmaktadır (Tablo 3 ve 4). Çalışmaya başlandığında NaV1.6 için deneysel yapı olmadığından AlphaFold [73] yapı tahmini ile modellenen NaV1.6 (AlphaFold: Q9UQD0) çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan NaV Kanallarına ilişkin bilgiler

PDB Kodu	Kanal Proteini	Aminoasit Sayısı	Modellenmiş Rezidü
7dtd	NaV1.1	2280	1249
6j8e	NaV1.2	2186	1277
7w7f	NaV1.3	2433	1424
6agf	NaV1.4	2097	1311
7dtc	NaV1.5	2059	1151
Q9UQD0	NaV1.6	1980	1980
6j8h	NaV1.7	2464	1433

Tablo 4. Çalışmada kullanılan seçilmiş toksinlere ilişkin bilgiler

PDB Kodu	Toksin	Aminoasit Sayısı
2n6o	Hm1a	35 aa
6ohx	Hj1a	67 aa
5i1x	Pre1a	36 aa

2.4. Yapı Dosyalarının Düzenlenmesi

Kenetlenme çalışması öncesinde yapı dosyaları çalışma için uygun hale getirilmiştir. Kullanılan yapıların düzenlenmesi için HADDOCK kurucusu Bonvinlab'ın sunmuş olduğu PDB Tools versiyon 2.3.1 [74] kullanılmıştır. Düzenleme öncesinde çalışmayı engelleyen farklı zincir numaraları, toksinlerde aynı rezidülerin çoklu formları gibi hatalar bu sayede giderilmiştir. Yapılan düzenlemeler sonucu rezidü numaralarında kaymalar oluşmuştur. Çalışmanın devamı bu kaymalar dikkate alınarak yapılmıştır.

2.5. Kenetlenme Çalışmalarında Kullanılacak Hedef Bölgelerin Belirlenmesi

Yapılan literatür taramasından elde edilen verilere göre çoğunlukla DIV S1-S2 ve DIV S3-S4 örümcek ve akrep toksinleri için bağlanma bölgesi olarak önerilmiştir. Tezin ön çalışmalarında bu iki alan hedeflenmiştir. Devamında ise en iyi bağlanma gösteren bölge seçilerek çalışmaya devam edilmiştir.

2.6. Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Tüm yerleştirme çalışmaları, HADDOCK, yüksek belirsizlikle çalışan biyomoleküler kenetlenme, (High Ambiguity Driven protein-protein Docking) web sunucusu (sürüm 2.1) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HADDOCK, güç alanı yaklaşımlarını kısıtlamayla yönlendirilen yerleştirme ile birleştirir ve biyomoleküler komplekslerin tahmini için yaygın olarak kullanılır. HADDOCK, NMR'den gelen mesafe ve yönlendirme bilgilerinin yanı sıra çapraz bağlama çalışmalarından veya bölgeye yönelik mutagenezden elde edilen deneysel verileri kullanarak çalışmaktadır.

Sisteme verilen deneysel veriler, kenetlenme sürecini yönlendirmek için kullanılan belirsiz etkileşim kısıtlamaları (AIR'ler) koleksiyonuna veya belirli, yüksek düzeyde güvenilir, kesin mesafe kısıtlamalarına (UDR'ler) dönüştürülür. AIR, bir molekül (A) üzerindeki belirli bir rezidü (veya atom) ile başka bir molekül (B) üzerindeki potansiyel etkileşim ortakları (rezidüler veya atomlar) arasındaki bir kısıtlamadır. Arayüzlerdeki rezidüler "aktif" ve "pasif" olarak adlandırılır: Aktif kalıntılar kullanıcı tarafından seçilir ve normalde bağlanma ile ilişkili olduğu deneysel olarak gösterilen rezidülerdir. Pasif rezidüler, kullanıcı tarafından sağlanabilir veya HADDOCK tarafından otomatik olarak seçilebilir. AIR'ler, her bir aktif rezidünün ortak molekül üzerindeki bir veya daha fazla aktif/pasif rezidüye yakın (belirli bir eşik mesafesi içinde) olmasını sağlamak için kullanılır [44], [75].

HADDOCK sistemine veri girişi üç aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada reseptör ve ligand sisteme yüklenir veya tanımlanır. Bu kısımda ligand ve reseptör için ek bilgiler girilebilir. Yapılan çalışmada ligand her seferinde peptit olarak tanımlanmıştır. Böylelikle sistem tarafından önerilen, peptitler için özelleştirilmiş ayarlar otomatik olarak atanmıştır. Sisteme ligand eklenirken NMR yapısı bozulmamıştır. Farklı 20 ligand konformasyonuna sahip dosya tek dosya halinde sisteme yüklenmiştir.

Veri girişinin ikinci aşamasında ligand ve reseptör için aktif veya pasif rezidüleri belirleyebileceğimiz alan bulunur. Yapılan ilk kenetlenme çalışmalarında sodyum kanalları için alan IV üzerinde bulunan S1-S2 ve S3-S4 hücre dışı döngüleri (Tablo 5),

toksinler için ise bütün rezidüler aktif bölge olarak tanımlanmıştır. Diğer aktif ve pasif bölgeleri tanımlayabilmesi için sisteme izin verilmiştir.

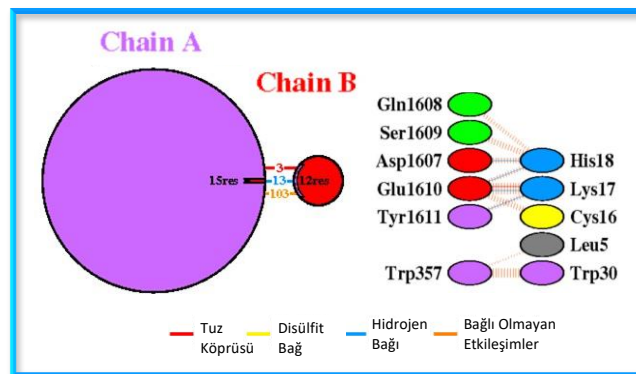
Tablo 5. Çalışmada kullanılan NaV aktif bölgeleri

	Alan IV (DIV)			
	S1-S2	Rezidü Numarası	S3-S4	Rezidü Numarası
NaV1.1	VETDDQS	1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019, 1020	LAELIEKYFVS	1075, 1076, 1077, 1078, 1079, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085
NaV1.2	VETDDQS	1026, 1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032	EKYFVS	1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097
NaV1.3	ETDDQG	1196, 1197, 1198, 1199, 1200, 1201	KYFVS	1262, 1263, 1264, 1265, 1266
NaV1.4	VETDNQS	903, 904, 905, 906, 907, 908, 909	YFVSPTL	971, 972, 973, 974, 975, 976, 977
NaV1.5	VETDDQS	917, 918, 919, 920, 921, 922, 923	SDIIQKYFFSPTL	979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991
NaV1.6	VETDTQS	1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547	EKYFVS	1607, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612
NaV1.7	VEKEGQS	1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033	FVS	1096, 1097, 1098

Veri girişinin üçüncü aşamasında ise sistemin peptit-protein kenetlenmesi için önerdiği ayarlar değiştirilmeden kullanılmıştır. Tezin bu kısmında 3 farklı toksin peptidi, 7 farklı sodyum kanalı ve 2 farklı bağlanma bölgesi kullanılmış ve bütün çalışmalar 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Toplamda 126 kenetlenme çalışması yürütülmüştür. Her çalışma için en iyi 10 kümelenmeyi ve her kümelenme için en iyi 4 bağlanma yapısını HADDOCK ‘pdb’ formatında bize sunmaktadır. Yapılan her çalışma için en iyi bağlanma enerjisine sahip her 2 kümenin 4’er en iyi sonucu saklanmıştır. Kısaca her kenetlenme çalışması için 8 olası sonuç elde edilmiştir.

2.7. Etkileşim Noktalarının Açığa Çıkartılması

Kenetlenme sonrası toksinler ve NaV kanalları arasında oluşan etkileşimlerin en hızlı ve doğru şekilde belirlenebilmesi, yapısal analizlerin gerçekleştirilebilmesi için PDBsum Generate [76] arayüzü kullanılmıştır. PDBsum Generate, kendi PDB biçimli dosyamızı sisteme yükleyerek eksiksiz bir yapısal analiz seti oluşturmamıza olanak tanır. Ayrıca kullanıcı tarafından yüklenen PDB dosyalarını işleyerek yaklaşık 3 ay boyunca parola korumalı olarak saklayabilmektedir. Tuz köprüleri, disülfid bağları, hidrojen bağları ve diğer bağlı olmayan etkileşimleri listeler ve bu bilgileri dosya halinde, ‘txt’ formatında indirmemize olanak sağlar (Şekil 11).



Şekil 11. PDBsum analiz sonuçları örneği

PDBsum, PROCHECK [77] ve ProMotif [78] programlarının çıktılarını kullanarak Ramachandran grafiği, χ_1 ve χ_2 burulma açılarının çizimleri ve bozuk geometriye sahip herhangi bir bağı, açığı veya düzlemsel grubu gösteren diyagramlar oluşturmakta ve böylece bir protein yapısının kalitesiyle ilişkili bir dizi stereokimyasal özellik analizi sunabilmektedir [76].

Kenetlenme çalışmalarında her iki bölge için de en iyi enerji değerine sahip 6 yapı PYMOL görselleştirme aracı ile görselleştirilerek ve örnek bir membrana oturtularak incelenmiştir. Buna göre S3-S4 bölgesi sonuçları gerçeğe uyumsuz çıkmıştır. Bağlantı noktalarının analizleri S1-S2 bölgesi için yapılmıştır. Spesifik bağlanma yapabildiği yönünde literatürde dikkatimizi çeken Hm1a peptinin farklı kanallardaki etkileşim noktaları açığa çıkartılmıştır. 7 farklı NaV kanalı ve Hm1a peptit toksini arasında en çok etkileşimde bulunan, tekrar eden rezidüler oransal olarak tespit edilmiştir. Tekrar yüzdeleri hesaplanmıştır.

Kenetlenme çalışması ilk sonuçlarına göre dikkat çeken bir diğer bağlanma NaV1.1- Hj1a arasında oluşmuştur. NaV1.1-Hj1a ikilisi için de en çok etkileşimde bulunan, tekrar eden rezidüler oransal olarak tespit edilmiştir.

2.8. Kanal Proteinlerinin Yeniden Modellenmesi

Protein yapılarının modellenmesi genellikle yapısal biyolojide kapsamlı uzmanlık ve modelleme sürecinin her bir adımı için son derece uzmanlaşmış bilgisayar programlarının kullanılmasını gerektirir. Farklı kökenlerden gelen proteinler çok benzer dizilere sahip olabilir ve genel olarak yüksek dizi benzerliğinin farklı yapı benzerliği tarafından yansıtıldığı kabul edilir. Bu gerçek, ilgili aile üyelerinin bilinen 3 boyutlu yapısından (şablonlar) yeni bir (hedef) dizi için yapının ekstrapolasyonundan oluşan karşılaştırmalı protein modelleme yöntemlerinin geliştirilmesi için başlangıç noktası oluşturmıştır.

Karşılaştırmalı protein modelleme süreci, SWISS-MODEL [79] homoloji modelleme sunucusu ile otomatikleştirilmiş ve uygulanmıştır. Sürekli geliştirilmekte olan SWISS-MODEL, protein modelleme hizmeti, internet tabanlı, entegre uzman bilgisine sahip, kullanımı kolay, bir otomatik modelleme tesisi ve çalışma alanıdır. Halka açık en yaygın kullanılan modelleme sunucusudur [80].

Süreç, hedef dizi ile dizi benzerliklerine dayalı olarak uygun şablon yapılarının tanımlanmasıyla başlar. Bu, dizi hizalama araçları BLAST [81] ve FASTA [82] kullanılarak, bilinen 3 boyutlu yapıya sahip dizilerin bir veritabanında arama yapılarak elde edilir. Daha sonra, ProMod'un (Protein Modelleme aracı) [83] 3 boyutlu süperpozisyon modülü kullanılarak şablonların yapısal olarak düzeltilmiş çoklu dizi hizalaması oluşturulur. Hedef sekans daha sonra SIM [84] kullanılarak yukarıdaki çoklu hizalamaya eklenir. Bu son hizalama, her hedefin ve şablon kalıntısının uzamsal karşılıklarını tanımlar ve model oluşturma prosedürü için kılavuz görevi görür.

Model koordinatlarının üretimi ProMod'da otomatikleştirilmiştir ve şu adımları takip eder: (i) bindirilmiş şablon yapılardan ortalama bir çerçevenin oluşturulması; (ii) yukarıda açıklanan çoklu dizi hizalaması kullanılarak ortalama çerçeveden türetilen atomik koordinatların oluşturulması; (iii) yapısal homoloji araştırmaları yoluyla korunmamış döngülerin (hem eklemeler hem de silmeler dahil) "saplarından" yeniden oluşturulması;

(iv) en iyi X-ışını yapılarından (<2Å çözünürlük) elde edilen omurga elemanları (pentapeptitler) kütüphanesi kullanılarak ana zincirin tamamlanması; (v) eksik yan zincirlerin yeniden oluşturulması ve izin verilen rotamerler kütüphanesi kullanılarak mevcut olanların düzeltilmesi [85].

MDS çalışmalarında eksik rezidüler kabul edilmemektedir. MDS çalışması yapılacak olan NaV1.1 ve Nav1.2 kanal proteinleri SWISS-MODEL [86] kullanılarak yeniden modellenmiştir. NaV1.1 ve NaV1.2 hedef dizi olarak FASTA formatında sisteme girilmiştir. Arayüzün sağ tarafındaki menüde bulunan kullanıcı şablonu bölümüne ‘pdb’ formatındaki şablon eklenmiştir. Kanal proteinlerimizden NaV1.6 (AlphaFold: Q9UQD0), yapısında eksik rezidü bulunmadığından modellemeye şablon olarak kullanılmıştır. Tamamlanmış modeller ve modellere ilişkin yapı analizleri sistem tarafından bize sağlanmıştır.

2.9. Tekrarlanan Kenetlenme Çalışması

Yapılan ikinci kenetlenme çalışması için ilk çalışmanın sonuçları değerlendirilmiştir. Daha iyi sonuçlara sahip alan (S1-S2 hücre dışı döngüsü) üzerine yoğunlaşmıştır. İlk çalışmanın prosedüründen farklı olarak hem toksin hem de NaV kanalları için aktif bölgeler kısıtlanmıştır. Reseptör olarak yeniden modellenen sodyum kanal yapıları kullanılmıştır. Tekrarlanan kenetlenme çalışmasında kullanılan aktif bölgeler NaV1.1 ve NaV1.2 için Tablo 6 ve Hm1a ve Hj1a toksinleri için Tablo 7’deki gibidir. Modelleme sonrası rezidü numaralarında değişiklikler oluşmuştur. Sonuçlar değerlendirilirken bu değişiklik dikkate alınmıştır.

Tablo 6. NaV1.1 ve NaV1.2 için seçilen aktif bölgeler

	Aktif Rezidüler DIV S1-S2 hücre dışı döngüsü	Rezidü Numarası
NaV1.1	MVETDDQS	1602,1603,1604,1605,1606,1607,1608,1609
NaV1.2	MVETDDQS	1592,1593,1594,1595,1596,1597,1598,1599

Tablo 7. Hm1a ve Hj1a için seçilen aktif bölgeler

	Aktif Rezidüler
Hm1a	17, 27, 31
Hj1a	8, 18, 61, 64, 65

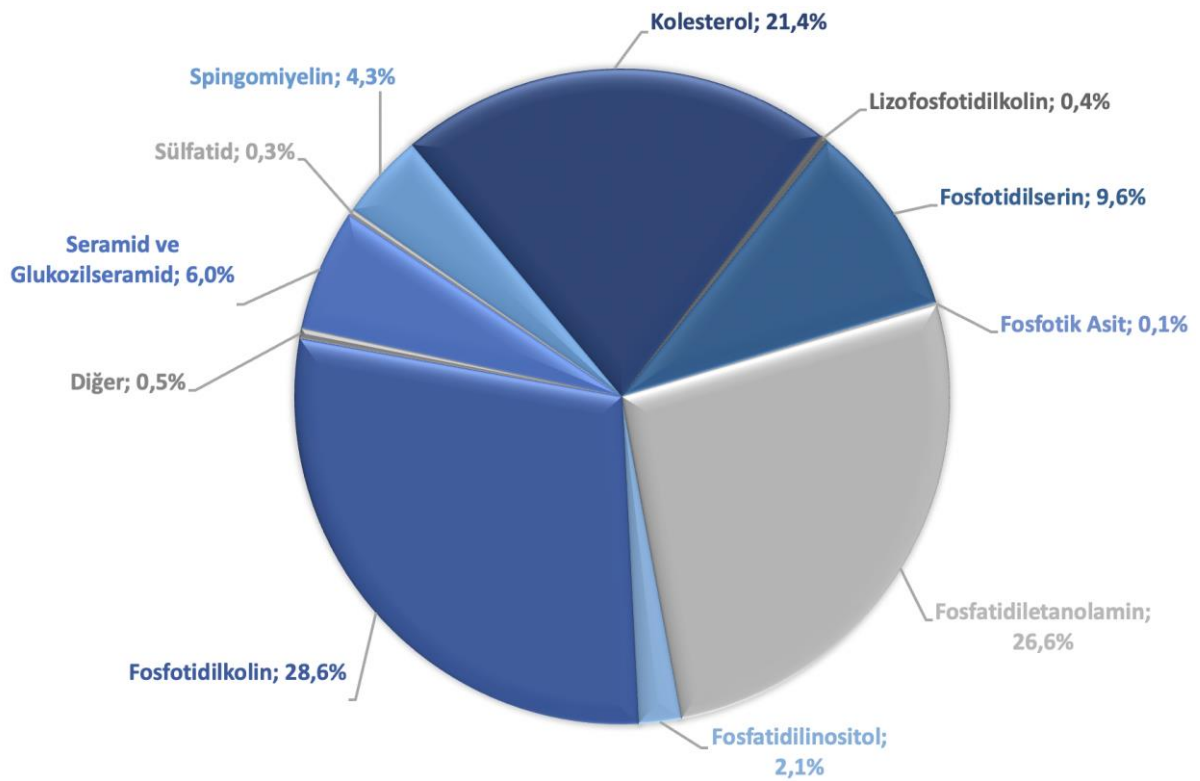
2.10. Yapıların Membrana Oturtulması

Glikolipidler (glikogliserolipidler, glikosfingolipidler ve glikosilfosfatidilinositol gibi) ve lipoglikanlar (lipopolisakkaritler (LPS), lipooligosakkaritler (LOS), mikobakteriyel lipoarabinomannan ve mikoplazma lipoglikanları gibi) tipik olarak hücre zarlarının yüzeyinde bulunur ve çeşitli hücre fonksiyonlarda çok önemli roller oynarlar.

Hücre zarı yapılarını ve dinamiklerini moleküler düzeyde karakterize etmek, kanal proteinlerinin biyolojik rollerini anlamak için esastır, ancak glikolipid ve lipoglikan yapılarının oluşturulması, lipit yapıları ve glikan dizilerindeki (karbonhidrat türleri) büyük farklılıklar nedeniyle zordur. Halka açık bir web tabanlı araç olan CHARMM-GUI [87] Membrane Builder, 2007'deki ilk sürümünden bu yana, karmaşık membran sistemlerinin oluşturulmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Membrane Builder artık

fosfolipitler, fosfoinositidler, kardiyolipin, sfingolipidler, bakteriyel lipitler, ergosterol, yağ asitleri ve deterjanlar dahil olmak üzere 400'den fazla lipit tipi kullanarak proteinli veya proteinsiz heterojen çift katmanları desteklemektedir.

Kanal proteinleri ve toksinler arasındaki ilişkinin gerçeğe en yakın bir biçimde değerlendirilebilmesi adına CHARMM-GUI Membrane Builder [88] kanal proteinlerinin etrafını zar ile çevrelemek için kullanılmış, glikolipitdLPS/LOS yapıları oluşturulmuştur. Literatürden elde edilen çeşitli nöronal membrane lipit sınıflarının yapıları Membrane Builder sisteminin desteklediği yapılar ile karşılaştırılmış ve gerçeğe en yakın model oluşturulmuştur. Literatürde önerilen nöronal membran lipit kompozisyonu Şekil 12'de özetlenmiştir [89], [90].



Şekil 12. Nöronal membran lipitleri

Sistemi kullanma yöntemimiz ve çalışma basamakları şu şekildedir; Hücre zarını oluşturmak için Membrane Builder yazılımı altında bulunan 'bilayer builder' kullanılmıştır. İlk olarak membran eklenecek yapı sisteme 'pdb' formatında verilir. Bir sonraki basamakta sistem yüklediğimiz yapıya dair bilgileri önümüze çıkartır ve onaylayarak devam etmemizi bekler. Onay sonrası manipülasyon seçenekleri karşımıza çıkar, burada herhangi bir değişiklik yapmadan ilerlemeye devam edilir. Membran eklemenin ilk basamağı burada başlar. Her adımda sistem yapmış olduğu işleri görüntülememize izin verir ve adım adım bir sıkıntı oluşup oluşmadığı bu kısımdan kontrol edilmelidir. Yapı kontrol edildikten sonra adım 1'de 'Oryantasyon Seçenekleri' kısmında 'Run PPM 2.0' seçilir ve bir sonraki aşamaya geçilir. Adım 2'de oluşturulacak membranın lipit içeriği girilir. 'Sistem Büyüklüğü Belirleme Seçenekleri' altında bulunan 3. madde 'XY'nin uzunluğuna bağlı olarak: Lipit bileşenlerinin sayısı' seçilir. Sisteme girilen lipit kompozisyonu yaklaşık olarak Tablo 8'deki gibidir. Her kanal için lipit

sayılarında ufak oynamalar gerekebilmektedir. Sistem bilgisini göster butonu ile sistem büyüklüğü hesaplanır optimum sisteme ulaşıldığında bir sonraki aşamaya geçilir. Adım 3'te sisteme eklemek istediğimiz iyonlar seçilir. Bu aşamada NaCl iyonları sisteme eklenmiştir. Çözücü kompozisyonu hesaplatılarak bir sonraki aşamaya geçilir. Adım 4'te membranın bütün bileşikleri oluşturulmuş olur. Adım 5'te Membrane Builder sistemi; CHARMM [91], GROMACS [92], NAMD [93], AMBER [94], OpenMM [95], GENESIS [96] ve LAMMPS [97] gibi çeşitli MD programları için iyi doğrulanmış simülasyon girdilerini kullanıcıya sağlayarak MD simülasyonu gerçekleştirmelerine olanak tanır [87]. Buradan çalışmanın devamında kullanacağımız GROMACS çıktı dosyaları 'Giriş Oluşturma Seçenekleri' altından seçilir ve son aşamaya devam edilir. Son olarak 6. adımda dosyamız indirilebilir hale gelmiş olur.

Tablo 8. CHARMM-GUI ile oluşturulan membranlarda kullanılan lipitler ve yaklaşık miktarı

	Üst Yaprak Üzerindeki Lipid Sayısı	Alt Yaprak Üzerindeki Lipid Sayısı
Steroller		
Cholesterol	134	130
PC (fosfatidilkolin) Lipitler		
DLPC	132	130
PE (fosfatidiletanolamin) Lipitler		
YOPE	127	119
PS (fosfatidilserin) Lipitler		
OEPS	53	50
SM (sfingo) ve Seramid Lipitleri		
PSM	30	26
CER160	39	36

Yapılan ilk kenetlenme çalışması sonuçlarına göre dikkat çeken 12 yapıya membran eklenerek yapısal olarak incelenmiştir. Yapılan ikinci kenetlenme çalışması sonrası toksinsiz NaV1.1 ve NaV1.2 kanalları, toksin içeren NaV1.1-Hm1a, NaV1.1-Hj1a ve NaV1.2-Hm1a protein-peptid çiftleri için tekrardan membran eklenerek moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

2.11.Moleküler Dinamik Simülasyonları

Daha önce de belirtildiği gibi MDS için gerekli bütün dosyalar CHARMM-GUI'den ayrı bir dosya halinde elde edilmiştir. Bu dosya, GROMACS formatlı CHARMM36 kuvvet alanlarını (force field), PDB yapısının optimize edilmiş halini, gerekli bütün parametre ve GROMACS girişlerini içerir. Bu sayede topoloji dosyalarının hazırlanması, kutunun ve çözeltinin tanımlanması, iyon eklenmesi basamakları atlanmış ve dosyalar uygun formatta elde edilebilmiştir. Lipit membran MDS çalışmalarında daha optimum sonuçlar vermesi sebebiyle CHARMM36M kuvvet alanı kullanılmıştır.

MDS çalışmaları TÜBİTAK bünyesinde bulunan Yüksek Başarımli ve Grid Hesaplama Merkezi, Truba sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş, GROMACS 2021 versiyonu hesaplamalar için kullanılmıştır. Sırasıyla enerji minimizasyonu ve sistem eşitlemeleri yapılarak moleküler dinamik simülasyonları yürütülmüştür. Gerekli kodlar ve işlemler için GROMACS'in sunduğu öğretici çalışma takip edilmiştir [98].

Truba sisteminin bize sunduğu hesaplama kümelerinden 'Barbun-cuda' ve 'Aky-cuda' bu çalışmada kullanılmıştır. Barbun-cuda ve Aky-cuda hesaplama kümeleri güçlü ekran kartına sahip, güçlü ve ağır işlem yüküne dayanabilen grafik işlemci birimini (GPU) kullandığından bu çalışma için uygun görülmüştür.

2.11.1. Enerji Minimizasyonu, Sistem Eşitlemeleri

Gromacs ile yapılan enerji minimizasyonu gromacs fonksiyonları şu şekildedir;

```
mpirun gmx_mpi grompp -f step6.0_minimization.mdp -o minim.tpr -c
step5_input.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm minim
```

Gromacs ile yapılan sistem eşitlemeleri (basınç, sıcaklık) 6 adımda tamamlanmıştır. Bunun için kullanılan gromacs fonksiyonları şu şekildedir;

```
mpirun gmx_mpi grompp -f step6.0_minimization.mdp -o minim.tpr -c
step5_input.gro -r step5_input.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -v -deffnm minim

mpirun gmx_mpi grompp -f step6.1_equilibration.mdp -o e1.tpr -c
minim.gro -r minim.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -deffnm e1

mpirun gmx_mpi grompp -f step6.2_equilibration.mdp -o e2.tpr -c e1.gro -
r e1.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -deffnm e2

mpirun gmx_mpi grompp -f step6.3_equilibration.mdp -o e3.tpr -c e2.gro -
r e2.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -deffnm e3

mpirun gmx_mpi grompp -f step6.4_equilibration.mdp -o e4.tpr -c e3.gro -
r e3.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -deffnm e4

mpirun gmx_mpi grompp -f step6.5_equilibration.mdp -o e5.tpr -c e4.gro -
r e4.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -deffnm e5

mpirun gmx_mpi grompp -f step6.6_equilibration.mdp -o e6.tpr -c e5.gro -
r e5.gro -p topol.top -n index.ndx
mpirun gmx_mpi mdrun -deffnm e6

mpirun gmx_mpi grompp -f step7_production.mdp -o md_1.tpr -c e6.gro -r
e6.gro -p topol.top -n index.ndx
```

Ayrıca sisteme girilen parametreler şu şekildedir;

```
#SBATCH --nodes=1
#SBATCH --ntasks=40
#SBATCH --gres=gpu:4
#SBATCH --time=14-00:10:00
```

```
#SBATCH --output=slurm-%j.out
#SBATCH --error=slurm-%j.err
```

2.11.2. Simülasyonların Yürütülmesi

Son olarak bütün bu işlemler tamamlandıktan sonra ‘mdrun’ fonksiyonu ile simülasyon yürütülmüştür. Dosyaların kontrolünü sağlamak amacıyla başlangıçta her çalışma için 10 nanosaniyelik (ns) kısa çalışmalar yürütülmüştür. Asıl çalışma için her yapı için 200 ns süren MDS çalışması yapılmıştır (Tablo 9). Makromoleküller için optimum adım boyutu olan 2 femtosaniyede (fs) aralıklar ile yani 100.000 adımda 1 çerçeve (frame) alınmış olup, toplamda 200 ns için 1000 çerçeve elde edilmiştir.

Tablo 9. MDS için kullanılan yapılar ve çalışma süreleri

İlk Yapı	MD Çalışma Süresi
NaV1.1	200 ns
NaV1.2	200 ns
NaV1.1 - Hm1a	200 ns
NaV1.1 - Hj1a	200 ns
NaV1.2 - Hm1a	200 ns

2.11.3. Yörünge Analizlerinin Yapılması

Yörünge analizleri GROMACS ile yapılmıştır.

RMSD hesaplaması için aşağıdaki komut kullanılmıştır. Bu komutla birlikte yapı iskeletini (backbone) yapı iskeleti ile karşılaştırmak için seçeneğini seçerek RMSD değerleri hesaplatılmıştır.

```
gmx rms -s md_0_1.tpr -f md_0_1_noPBC.xtc -o rmsd.xvg -tu ns
```

RMSF hesaplaması için aşağıdaki komut kullanılmıştır. Bu komutla birlikte alfa karbon seçeneğini seçerek RMSF değerleri hesaplatılmıştır.

```
gmx rmsf -s md_0_1.tpr -f md_0_1_noPBC.xtc -o rmsf.xvg
```

3. BULGULAR

3.1. Potansiyel Bölgelerde Moleküler Kenetlenme Sonuçları

7 farklı sodyum kanalı ve 3 farklı toksin kullanılarak gerçekleştirilen, NaV kanallarında DIV S1-S2 hücre dışı döngülerini hedef alan kenetlenme çalışması HADDOCK skorları Tablo 10’daki gibidir. DIV S3-S4 hücre dışı döngülerini hedef alan kenetlenme çalışması HADDOCK skorları Tablo 13’deki gibidir. Her kanal ve toksin kenetlenmesi için çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Tablo 10 ve 13’de bulunan enerji değerlerinin ortalaması alınarak sütun grafikleri oluşturulmuştur (Tablo 11, 14). Ortalama enerji sonuçlarının ısı haritası Tablo 12 ve 15’te gösterilmektedir.

Sonuçların değerlendirilebilmesi için benzer bir etkileşim HADDOCK programı ile denenmiştir. Deneysel yapısı bilinen toksin bağlı bir voltaja duyarlı potasyum kanalı skor karşılaştırması için kullanılmıştır. Bu örnek çalışmanın sonuçlarına göre afinite değeri ya

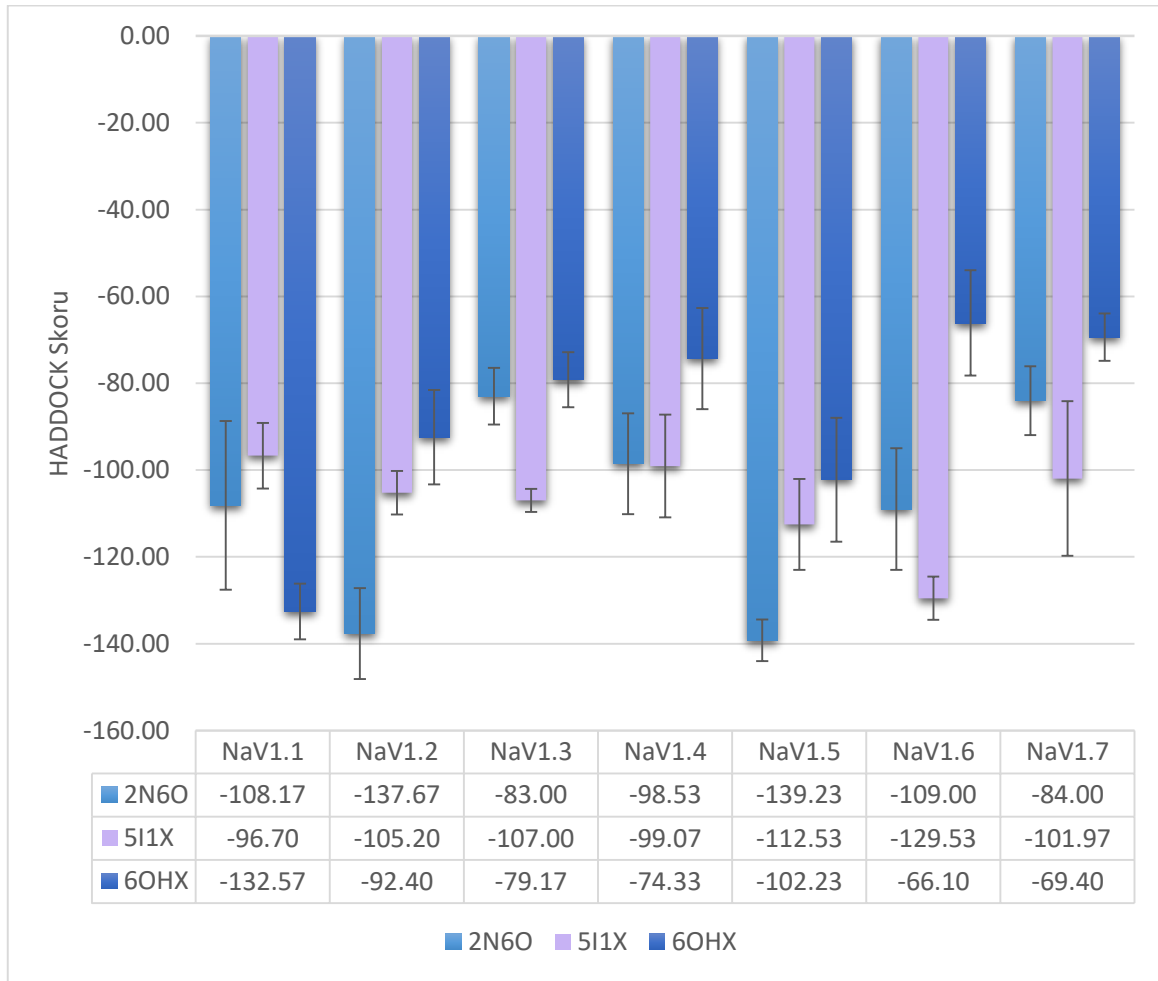
da HADDOCK skoru -100 veya daha düşük deęerler afinitesi yüksek olarak değerlendirilmiştir.

Farklı bölgelerde yapılan kenetlenme sonuçları iki bölge için de iyi enerji değerlerine sahip NaV-Toksin çiftlerinin olduğunu göstermektedir. S1-S2 hücre dışı döngüsünde Hm1a'nın NaV1.2 ve Nav1.5 ile, Prela'nın NaV1.6 ile, Hj1a'nın NaV1.1 ile diğer etkileşimlere göre daha iyi bir afiniteye sahip olduğu görülmektedir (Tablo 12). S3-S4 hücre dışı döngüsünde Hm1a'nın NaV1.4 ve Nav1.5 ile, Prela'nın NaV1.2 ile diğer etkileşimlere göre daha iyi bir afiniteye sahip olduğu görülmektedir (Tablo 15).

Tablo 10. DIV S1-S2 bölgesinde gerçekleştirilen kenetlenme alışmaları HADDOCK skorları

DIV S1-S2		Hm1a	Prela	Hj1a
NaV 1.1	1	-108.4 +/- 32.1	-62.8 +/- 9.4	-131.5 +/- 13.4
	2	-101.7 +/- 10.1	-118.7 +/- 6.3	-133.3 +/- 2.5
	3	-114.4 +/- 16.1	-108.6 +/- 6.9	-132.9 +/- 3.3
NaV 1.2	1	-161.9 +/- 14.2	-104.7 +/- 4.4	-101.7 +/- 12.5
	2	-102.0 +/- 9.4	-104.4 +/- 2.8	-91.5 +/- 9.1
	3	-149.1 +/- 7.9	-106.5 +/- 7.8	-84.0 +/- 11.0
NaV 1.3	1	-84.7 +/- 7.3	-112.7 +/- 3.1	-82.6 +/- 3.7
	2	-84.9 +/- 4.8	-106.3 +/- 3.3	-85.1 +/- 10.0
	3	-79.4 +/- 7.5	-102.0 +/- 1.5	-69.8 +/- 5.3
NaV 1.4	1	-114.0 +/- 7.3	-94.5 +/- 21.0	-72.3 +/- 12.8
	2	-75.1 +/- 7.7	-99.2 +/- 4.7	-67.6 +/- 16.8
	3	-106.5 +/- 19.8	-103.5 +/- 9.8	-83.1 +/- 5.4
NaV 1.5	1	-140.1 +/- 4.2	-117.6 +/- 12.1	-104.5 +/- 17.6
	2	-129.5 +/- 1.1	-105.8 +/- 9.7	-103.9 +/- 11.5
	3	-148.1 +/- 9.1	-114.2 +/- 9.6	-98.3 +/- 13.8
NaV 1.6	1	-94.6 +/- 17.4	-131.8 +/- 6.4	-73.8 +/- 21.4
	2	-114.2 +/- 18.8	-126.8 +/- 2.2	-70.7 +/- 9.5
	3	-118.2 +/- 5.8	-130.0 +/- 6.4	-53.8 +/- 5.6
NaV 1.7	1	-79.0 +/- 7.8	-102.7 +/- 17.2	-73.7 +/- 6.2
	2	-93.8 +/- 7.7	-80.6 +/- 31.1	-63.4 +/- 4.5
	3	-79.2 +/- 8.3	-122.6 +/- 5.1	-71.1 +/- 5.7

Tablo 11. S1-S2 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri



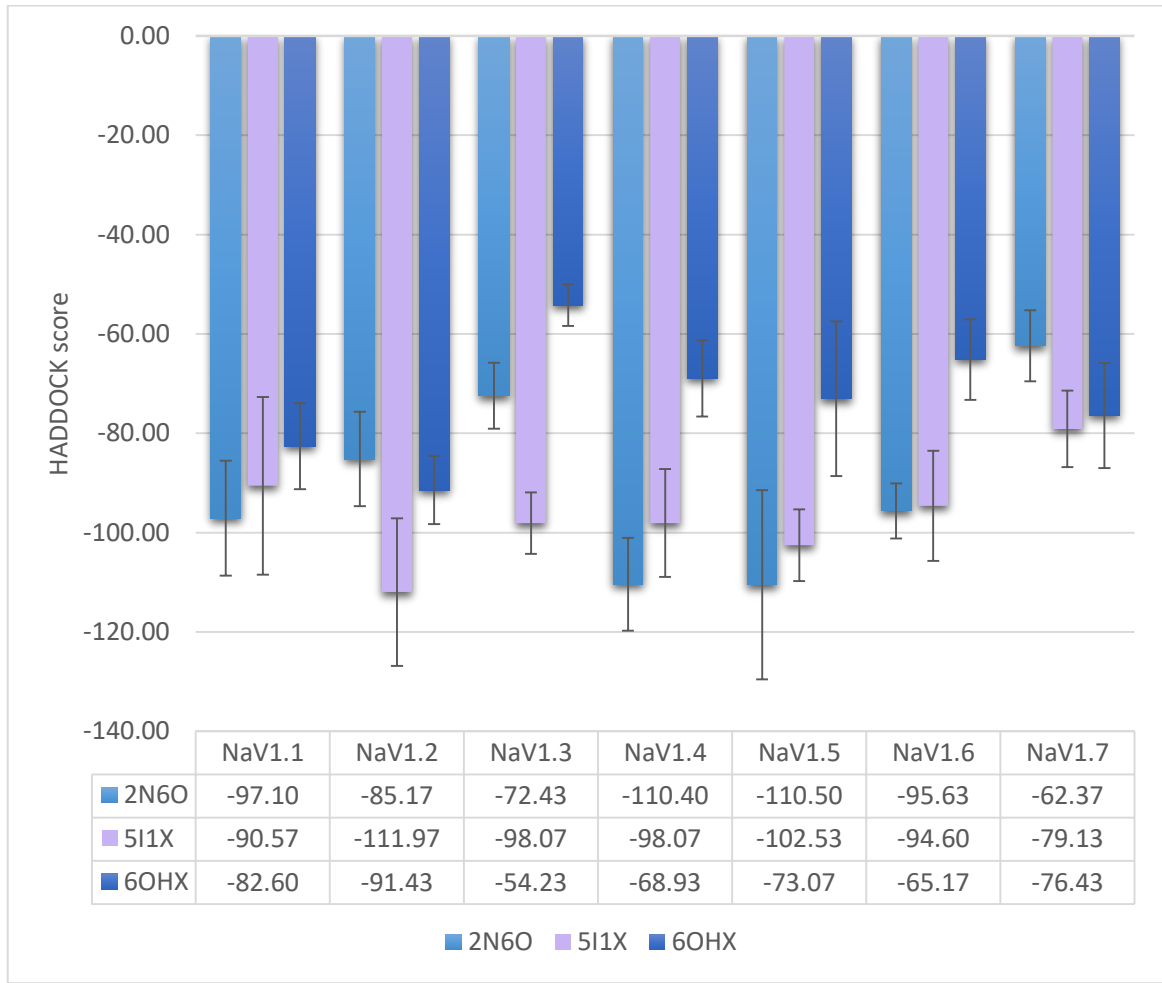
Tablo 12. S1-S2 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri ve ısı haritası

	Hm1a	Pre1a	Hj1a
NaV1.1	-108,17	-96,70	-132,57
NaV1.2	-137,67	-105,20	-92,40
NaV1.3	-83,00	-107,00	-79,17
NaV1.4	-98,53	-99,07	-74,33
NaV1.5	-139,23	-112,53	-102,23
NaV1.6	-109,00	-129,53	-66,10
NaV1.7	-84,00	-101,97	-69,40

Tablo 13. DIV S3-S4 bölgesinde gerçekleştirilen kenetlenme çalışmaları HADDOCK skorları

DIV S2-S3		Hm1a	Pre1a	Hj1a
NaV 1.1	1	-101.6 +/- 13.5	-92.1 +/- 11.1	-79.1 +/- 9.0
	2	-99.5 +/- 13.1	-88.7 +/- 32.9	-83.8 +/- 8.9
	3	-90.2 +/- 8.1	-90.9 +/- 9.6	-84.9 +/- 8.1
NaV 1.2	1	-81.2 +/- 9.2	-111.9 +/- 20.6	-86.6 +/- 2.0
	2	-97.7 +/- 13.9	-115.1 +/- 9.6	-93.2 +/- 7.7
	3	-76.6 +/- 5.5	-108.9 +/- 14.4	-94.5 +/- 10.9
NaV 1.3	1	-69.9 +/- 8.3	-103.1 +/- 5.3	-53.9 +/- 3.9
	2	-77.2 +/- 8.0	-91.3 +/- 7.0	-58.4 +/- 6.3
	3	-70.2 +/- 3.7	-99.8 +/- 6.3	-50.4 +/- 2.3
NaV 1.4	1	-122.0 +/- 15.1	-99.3 +/- 6.2	-67.6 +/- 0.5
	2	-110.3 +/- 6.6	-96.8 +/- 17.2	-70.9 +/- 11.1
	3	-98.9 +/- 6.4	-98.1 +/- 9.2	-68.3 +/- 11.4
NaV 1.5	1	-95.9 +/- 24.1	-99.0 +/- 6.8	-66.6 +/- 10.6
	2	-127.7 +/- 25.8	-98.4 +/- 8.5	-75.7 +/- 13.4
	3	-107.9 +/- 7.2	-110.2 +/- 6.3	-76.9 +/- 22.7
NaV 1.6	1	-97.5 +/- 4.8	-90.1 +/- 4.4	-54.7 +/- 12.3
	2	-86.8 +/- 8.9	-91.3 +/- 13.5	-69.2 +/- 6.4
	3	-102.6 +/- 3.0	-102.4 +/- 15.3	-71.6 +/- 5.7
NaV 1.7	1	-76.8 +/- 10.7	-72.1 +/- 3.6	-73.2 +/- 8.7
	2	-53.2 +/- 4.4	-75.2 +/- 9.1	-79.5 +/- 15.2
	3	-57.1 +/- 6.4	-90.1 +/- 10.4	-76.6 +/- 7.8

Tablo 14. S3-S4 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri

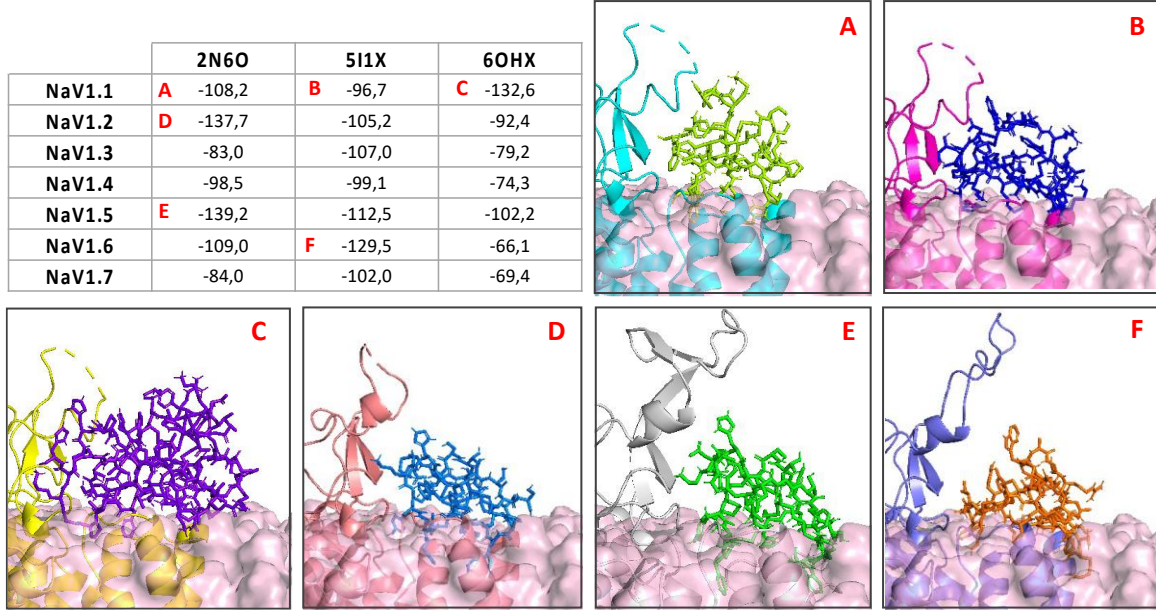


Tablo 15. S3-S4 hücre dışı döngüsünde yapılan kenetlenme çalışmalarının ortalama enerji değerleri ve ısı haritası

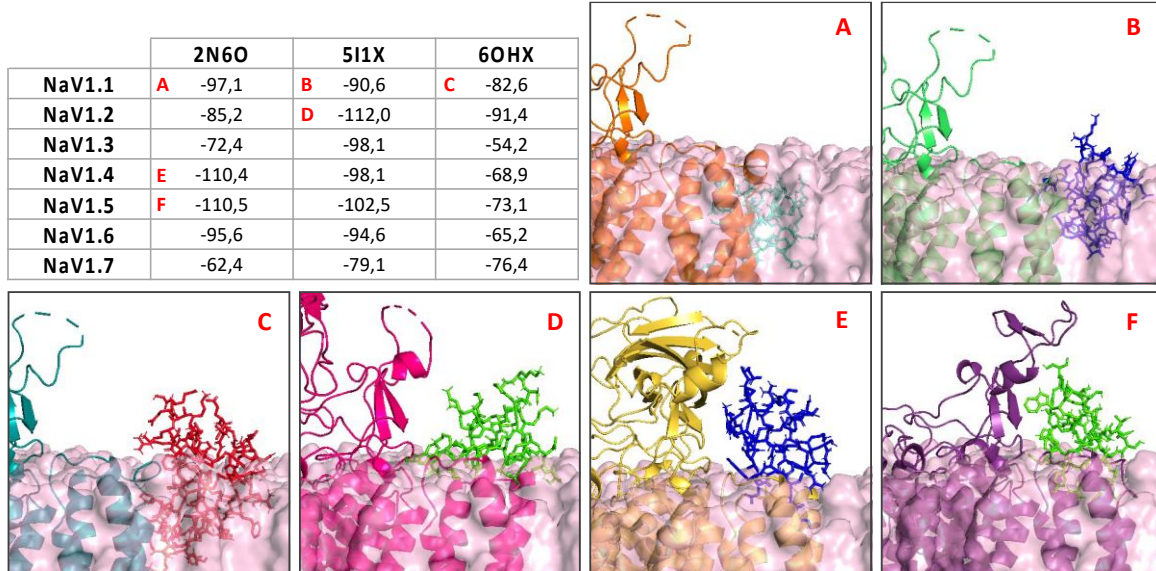
	Hm1a	Pre1a	Hj1a
NaV1.1	-97,10	-90,57	-82,60
NaV1.2	-85,17	-111,97	-91,43
NaV1.3	-72,43	-98,07	-54,23
NaV1.4	-110,40	-98,07	-68,93
NaV1.5	-110,50	-102,53	-73,07
NaV1.6	-95,63	-94,60	-65,17
NaV1.7	-62,37	-79,13	-76,43

3.2. Membran Eklenen Kenetlenme Sonuçlarının Yapısal Analizi

S1-S2 ve S3-S4 bölgesinde yapılan kenetlenme çalışmalarından elde edilen en iyi 6 sonuç PYMOL ile görselleştirilmiştir. S3-S4 bölgesine bağlanan farklı toksinlerin bir kısmı ya da tamamı membrana gömülü pozisyonda durmaktadır (Şekil 14). S1-S2 bağlanma bölgesini hedefleyen çalışmalarda sonuçlarda herhangi bir uyumsuzluk görülmemiştir (Şekil 13). Bu da S1-S2 hücre dışı döngüsünün seçmiş olduğumuz 3 toksinin bağlanması için daha uygun olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 13. Aktif bölge olarak tanımlanan S1-S2 hücre dışı döngüsü, kenetlenme sonuçlarının PYMOL kullanılarak görselleştirilmesi

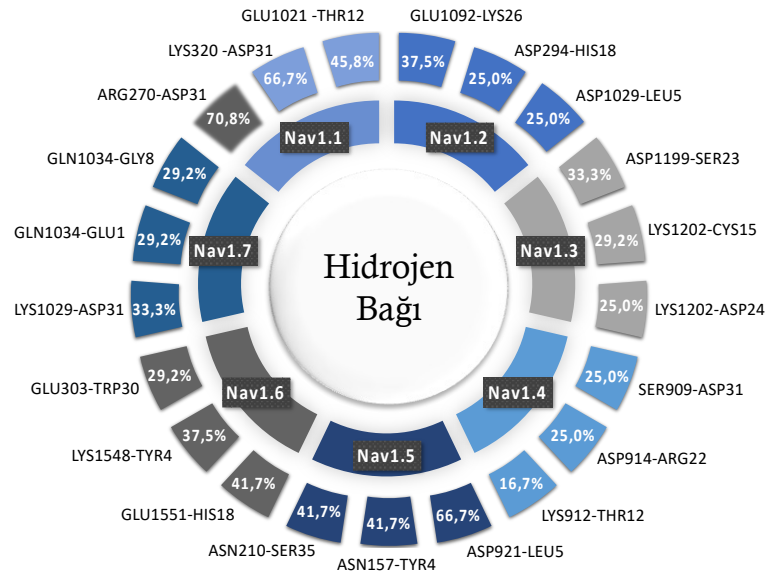


Şekil 14. Aktif bölge olarak tanımlanan S3-S4 hücre dışı döngüsü, kenetlenme sonuçlarının PYMOL kullanılarak görselleştirilmesi

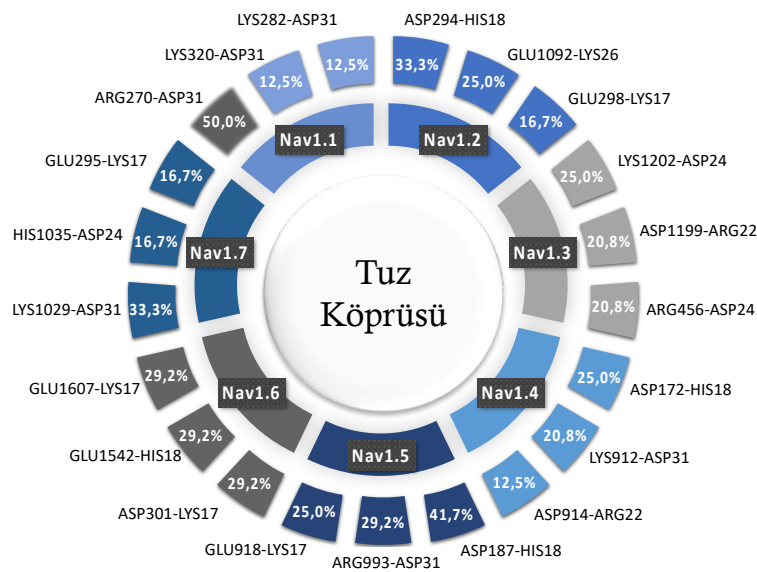
3.3. NaV Kanalları ve Hm1a Arasında En Sık Tekrarlayan Etkileşim Bölgeleri

Hm1a'nın NaV kanalları ile en çok etkileşime girdiği bölgeler tezin 2.7. kısmında açıklandığı gibi hesaplanmıştır. Her ikili için üç tekrarlı yapılan kenetlenme çalışmasının en iyi ilk 2 kümelenme sonucunun 4'er en iyi yapısı alınarak 'PDBsum generate' sisteminde analiz edilmiştir. Yani her bir ikili için toplamda 24 farklı yapı analiz edilmiştir. Bu sayede bu tekrarlı çalışmalarda en çok tekrar eden rezidüler ve bağlantı noktaları oransal olarak belirlenmiştir. Tekrar yüzdeleri 24 çalışma üzerinden hesaplanmıştır.

Hm1a ve 7 farklı sodyum kanalı arasında en çok tekrar eden 3 etkileşim Şekil 13 ve 14'te hidrojen bağı ve tuz köprüleri için ayrı şekilde gösterilmektedir.



Şekil 15. Hm1a ve 7 farklı NaV kanalı arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri

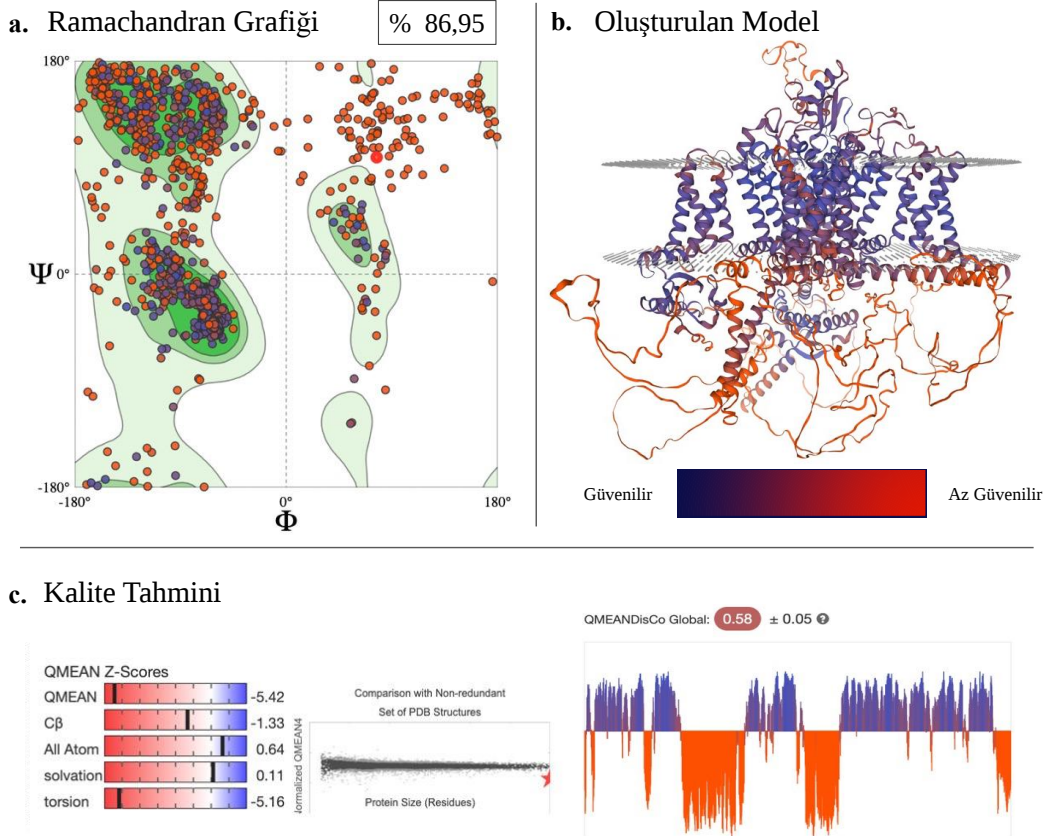


Şekil 16. Hm1a ve 7 farklı NaV kanalı arasındaki tuz köprüleri

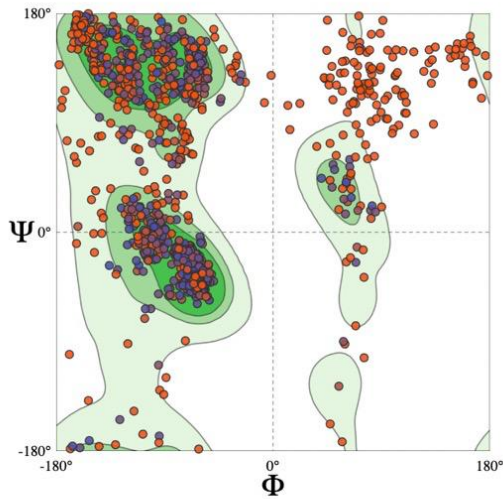
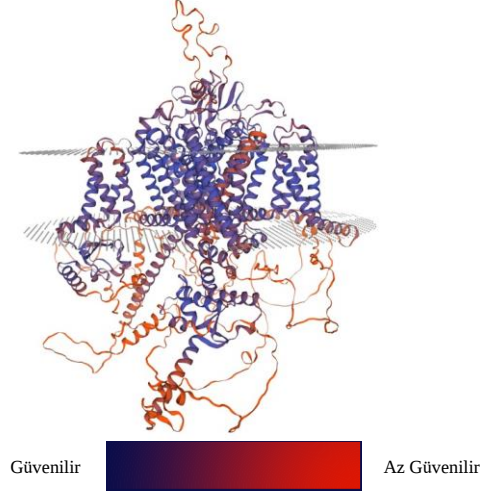
3.4. NaV1.1 ve NaV1.2'nin Yeniden Modellenmesi

Swissmodel ile yeniden modellenen NaV1.1 ve NaV1.2 kanal yapılarına ait analizler Şekil 17 ve 18'de gösterilmektedir. Ramachandran grafiği ile modellenen protein yapılarımızdaki rezidülerin enerji olarak tercih ettikleri burulma açıları (ϕ (ϕ) ve ψ (ψ)) gösterilmektedir (Şekil 17a, 18a). Ramachandran uygunluk yüzdesi NaV1.1 için %86,95, NaV1.2 için %86,81 olarak hesaplanmıştır.

Oluşturulan model bir membran düzleminde olacak şekilde NaV1.1 (Şekil 17b) ve NaV1.2 (Şekil 18b) için görselleştirilmiştir. Kalite tahmini analizleri Şekil 17c ve 18c'de bulunmaktadır. QMEAN, tek bir modelden hem bütün yapı için hem de her bir rezidü için kalite tahminlerini yapan bir puanlama işlevidir. NaV1.1 ve NaV1.2 için oluşturulan modellerde güvenilir olmayan kısımlar istenilenden fazladır. Fakat detaylı olarak incelendiğinde bu az güvenilir kısımlar, bizim ilgi alanımız olan kanal ve bağlanma bölgelerinde değildir. NaV kanal yapılarında bulunan 2 büyük hücre içi döngüsü az güvenilir kısımları oluşturmaktadır. Bu sebeple modellenen kanalların tezin sonraki kısımlarında kullanılmasının sorun teşkil etmediğini düşünmekteyiz.



Şekil 17. NaV1.1 kanalına ait homoloji modelleme analiz sonuçları.

a. Ramachandran Grafiği**% 86,81****b. Oluşturulan Model****c. Kalite Tahmini**

Şekil 18. NaV1.2 kanalına ait homoloji modelleme analiz sonuçları.

3.5. Kısıtlanmış Aktif Bölgeler ile Tekrarlanan Kenetlenme Çalışması

İkililer arasında üç tekrarlı olarak yapılan ikinci kenetlenme çalışmalarından elde edilen sonuçlar Tablo 16, 17 ve 18'de gösterilmiştir. Değerlendirme 3.5.1. bölümde yapılmıştır.

Tablo 16. Hm1a ve NaV1.1 ikinci kenetlenme çalışması sonuçları

Hm1a - NaV1.1			
	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme
HADDOCK skoru	-150.0 +/- 9.5	-114.5 +/- 7.5	-124.4 +/- 8.1
Küme Boyutu	6	5	5
Genel en düşük enerji yapısından RMSD	0.4 +/- 0.3	1.4 +/- 0.0	1.5 +/- 0.1
Van der Waals enerjisi	-58.4 +/- 3.4	-43.9 +/- 3.4	-49.8 +/- 7.4
Elektrostatik enerji	-287.5 +/- 64.2	-241.4 +/- 31.3	-213.1 +/- 47.6
Çözünme Enerjisi	-40.7 +/- 6.8	-27.7 +/- 7.2	-38.3 +/- 3.2
Kısıtlama ihlali enerjisi	66.6 +/- 19.5	54.0 +/- 55.1	63.0 +/- 26.9
Gömülü yüzey alanı	2101.0 +/- 140.6	1804.4 +/- 141.3	1913.3 +/- 169.6
Z-Skoru	-2.8	-2.3	-1.9

Tablo 17. Hm1a ve NaV1.2 ikinci kenetlenme çalışması sonuçları

Hm1a - NaV1.2			
	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme
HADDOCK skoru	-121.5 +/- 20.4	-123.3 +/- 16.1	-118.6 +/- 4.1
Küme Boyutu	6	25	26
Genel en düşük enerji yapısından RMSD	1.5 +/- 0.2	1.6 +/- 0.0	1.7 +/- 0.0
Van der Waals enerjisi	-41.0 +/- 5.7	-37.3 +/- 8.6	-42.6 +/- 6.4
Elektrostatik enerji	-249.8 +/- 49.5	-331.4 +/- 27.8	-280.5 +/- 49.8
Çözünme Enerjisi	-34.2 +/- 9.2	-20.8 +/- 8.4	-22.2 +/- 5.9
Kısıtlama ihlali enerjisi	36.4 +/- 16.8	11.3 +/- 5.2	23.2 +/- 17.6
Gömülü yüzey alanı	1760.8 +/- 141.9	1649.5 +/- 28.3	1770.7 +/- 121.0
Z-Skoru	-1.7	-2.1	-1.9

Tablo 18. Hj1a ve NaV1.1 ikinci kenetlenme çalışması sonuçları

Hj1a- NaV1.1			
	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme
HADDOCK skoru	-150.2 +/- 2.9	-112.1 +/- 5.9	-117.5 +/- 12.3
Küme Boyutu	29	31	4
Genel en düşük enerji yapısından RMSD	1.2 +/- 0.2	1.7 +/- 0.0	0.4 +/- 0.2
Van der Waals enerjisi	-51.0 +/- 7.2	-37.5 +/- 7.9	-47.5 +/- 8.0
Elektrostatik enerji	-357.8 +/- 47.7	-298.2 +/- 33.9	-210.0 +/- 37.9
Çözünme Enerjisi	-29.2 +/- 8.0	-15.3 +/- 7.9	-31.1 +/- 5.1
Kısıtlama ihlali enerjisi	15.8 +/- 11.7	3.6 +/- 1.9	30.6 +/- 19.5
Gömülü yüzey alanı	2023.5 +/- 107.6	1777.5 +/- 167.8	1807.2 +/- 125.6
Z-Skoru	-2.0	-2.0	-1.8

3.5.1. Kenetlenme Çalışmalarının Karşılaştırılması

Birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarından elde edilen en iyi sonuçlar NaV1.1-Hm1a, NaV1.2-Hm1a ve NaV1.1-Hj1a çiftleri için sırasıyla Tablo 19, 20 ve 21’de karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Haddock skor NaV1.1-Hm1a ve NaV1.1-Hj1a çiftlerinde artış göstermiştir. NaV1.2-Hm1a için Haddock skor azalmış olmasına rağmen istenilen düzeydedir.

Tablo 19. Hm1a ve NaV1.1 birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarının karşılaştırılması

NaV1.1 - Hm1a		
	1. Kenetlenme Çalışması	2. Kenetlenme Çalışması
HADDOCK skoru	-114,4 +/- 16,1	-150,0 +/- 9,5
Küme Boyutu	5	6
Genel en düşük enerji yapısından RMSD	0,7 +/- 0,4	0,4 +/- 0,3
Van der Waals enerjisi	-59,6 +/- 3,0	-58,4 +/- 3,4
Elektrostatik enerji	-253,6 +/- 66,2	-287,5 +/- 64,2
Çözünme Enerjisi	-27,4 +/- 5,1	-40,7 +/- 6,8
Kısıtlama ihlali enerjisi	232,8 +/- 53,0	66,6 +/- 19,5
Gömülü yüzey alanı	1765,6 +/- 132,5	2101,0 +/- 140,6
Z-Skoru	-1,9	-2,8

Tablo 20. Hm1a ve NaV1.2 birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarının karşılaştırılması

NaV1.2 - Hm1a		
	1. Kenetlenme Çalışması	2. Kenetlenme Çalışması
HADDOCK skoru	-161,9 +/- 14,2	-123,3 +/- 16,1
Küme Boyutu	26	25
Genel en düşük enerji yapısından RMSD	0,5 +/- 0,3	1,6 +/- 0,0
Van der Waals enerjisi	-70,3 +/- 9,0	-37,3 +/- 8,6
Elektrostatik enerji	-361,7 +/- 27,9	-331,4 +/- 27,8
Çözünme Enerjisi	-33,2 +/- 4,3	-20,8 +/- 8,4
Kısıtlama ihlali enerjisi	139,1 +/- 75,2	11,3 +/- 5,2
Gömülü yüzey alanı	2327,1 +/- 136,7	1649,5 +/- 28,3
Z-Skoru	-2,0	-2,1

Tablo 21. Hj1a ve NaV1.1 birinci ve ikinci kenetlenme çalışmalarının karşılaştırılması

NaV1.1 - Hj1a		
	1. Kenetlenme Çalışması	2. Kenetlenme Çalışması
HADDOCK skoru	-133.3 +/- 2.5	-150.2 +/- 2.9
Küme Boyutu	44	29
Genel en düşük enerji yapısından RMSD	0.5 +/- 0.3	1.2 +/- 0.2
Van der Waals enerjisi	-86.5 +/- 6.5	-51.0 +/- 7.2
Elektrostatik enerji	-342.0 +/- 37.6	-357.8 +/- 47.7
Çözünme Enerjisi	-25.6 +/- 2.8	-29.2 +/- 8.0
Kısıtlama ihlali enerjisi	472.3 +/- 120.1	15.8 +/- 11.7
Gömülü yüzey alanı	2279.6 +/- 70.5	2023.5 +/- 107.6
Z-Skoru	-2.4	-2.0

3.6. İkinci Kenetlenme Çalışmasından Elde Edilen Etkileşim Noktaları

Her ikili için üç tekrarlı yapılan kenetlenme çalışmasının en iyi ilk 2 kümelenme sonucunun 4'er en iyi yapısı alınarak 'PDBsum generate' sisteminde analiz edilmiştir. Yani her bir ikili için toplamda 24 farklı yapı analiz edilmiştir. Bu 24 sonuçtan elde edilen veriler analiz edilmiş, en sık tekrar eden etkileşim noktaları belirlenmiştir.

Birinci ve ikinci kenetleme çalışmalarında oluşan hidrojen bağı ve tuz köprüleri Tablo 22, 23 ve 24'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Yapılan analizler sonucu her bağ türü, her kenetlenme çalışması ve her protein toksin etkileşimi için en çok etkileşime girdiği belirlenen ilk 5 rezidü tablolarda gösterilmektedir. Tablolarda gösterilen rezidülerden ilki kanal proteinine ait, ikincisi toksin peptidine aittir. Tekrar sayısı, her bir etkileşim için 24 farklı çalışma sonucu içindeki tekrar miktarını göstermektedir. Tekrar yüzdesi, 24 çalışma üzerinden tekrar sayısı oranlanarak hesaplanmıştır.

Tablo 22. Hm1a ve NaV1.1 arasındaki etkileşim noktaları

NaV1.1- Hm1a						
H Bağı	1. HADDOCK Çalışması			2. HADDOCK Çalışması		
	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi
	R274-D31	17	70.8	E1626-R22	15	62.50
	K353-D31	16	66.7	R1636-D31	12	50.00
	E1567-T12	11	45.8	R1639-D31	11	45.83
	S1566-H18	8	33.3	E1567-Y17	10	41.67
	Y1568-E1	8	33.3	K353-D31	7	29.17
Tuz Köprüsü	1. HADDOCK Çalışması			2. HADDOCK Çalışması		
	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi
	R274-D31	12	50.0	E1626-R22	9	37.50
	K353-D31	3	12.5	E1567-Y17	9	37.50
	K315-D31	3	12.5	R1636-D31	8	33.33
	K315-D24	2	8.3	K353-D31	8	33.33
	K315-D14	2	8.3	R1639-D31	7	29.17

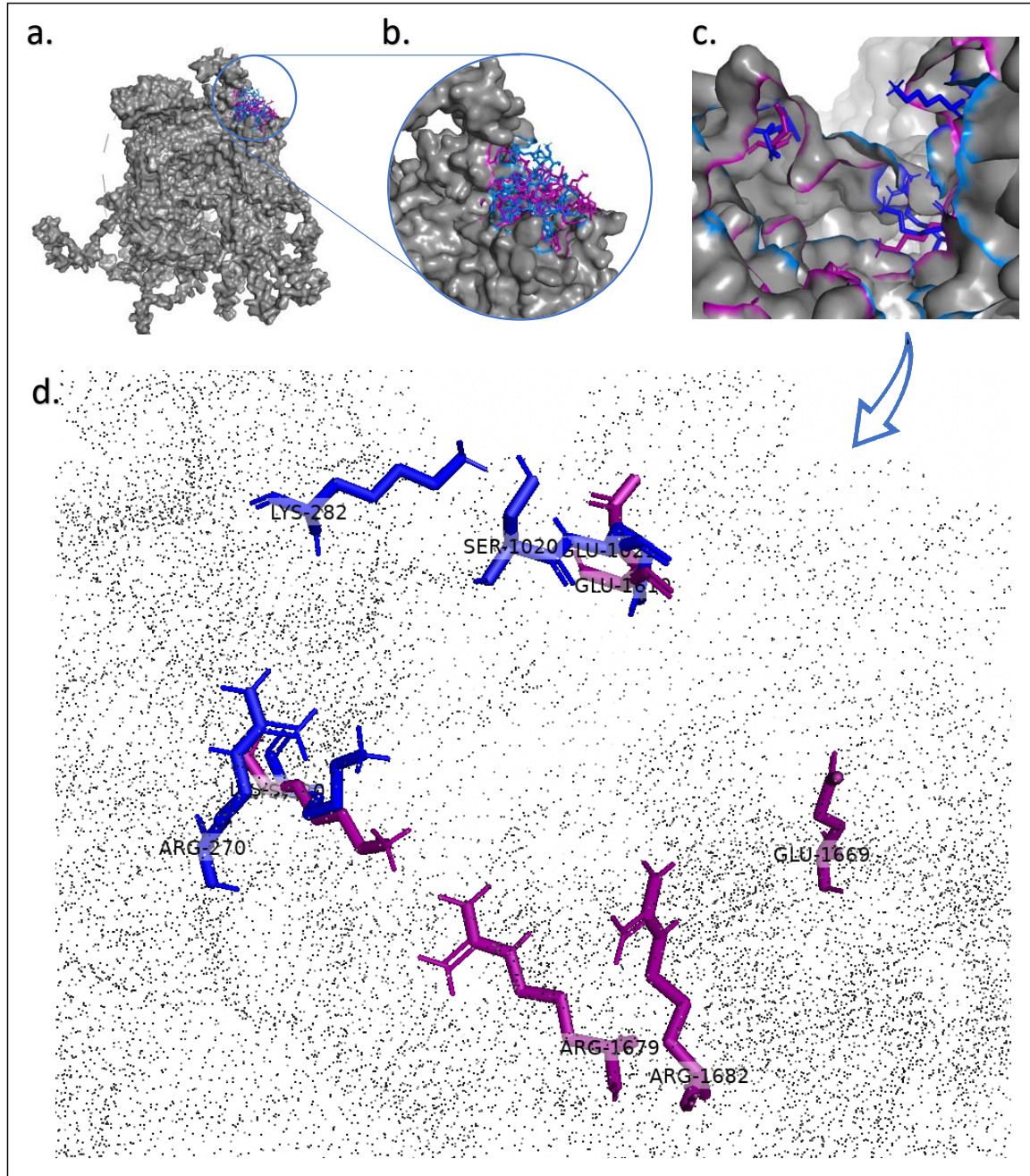
Tablo 23. Hj1a ve NaV1.1 arasındaki etkileşim noktaları

NaV1.1- Hj1a						
H Bağı	1. HADDOCK Çalışması			2. HADDOCK Çalışması		
	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi
	S1566-Y8	16	66.7	D1564-K65	21	87.5
	D1563-G64	14	58.3	K353-S44	17	70.8
	D1564-K61	13	54.2	D1563-S45	15	62.5
	S1566-K61	11	45.8	E1567-K61	11	45.8
	E1567-K40	10	41.7	S1566-G64	11	45.8
Tuz Köprüsü	1. HADDOCK Çalışması			2. HADDOCK Çalışması		
	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi
	E1567-K40	9	37.5	D1564-K65	15	62.5
	D366-K65	5	20.8	E1567-K61	13	54.2
	E1567-K61	5	20.8	E288-K31	10	41.7
	D313-H18	4	16.7	D313-H13	6	25.0
	D1564-K61	4	16.7	E1626-K40	4	16.7

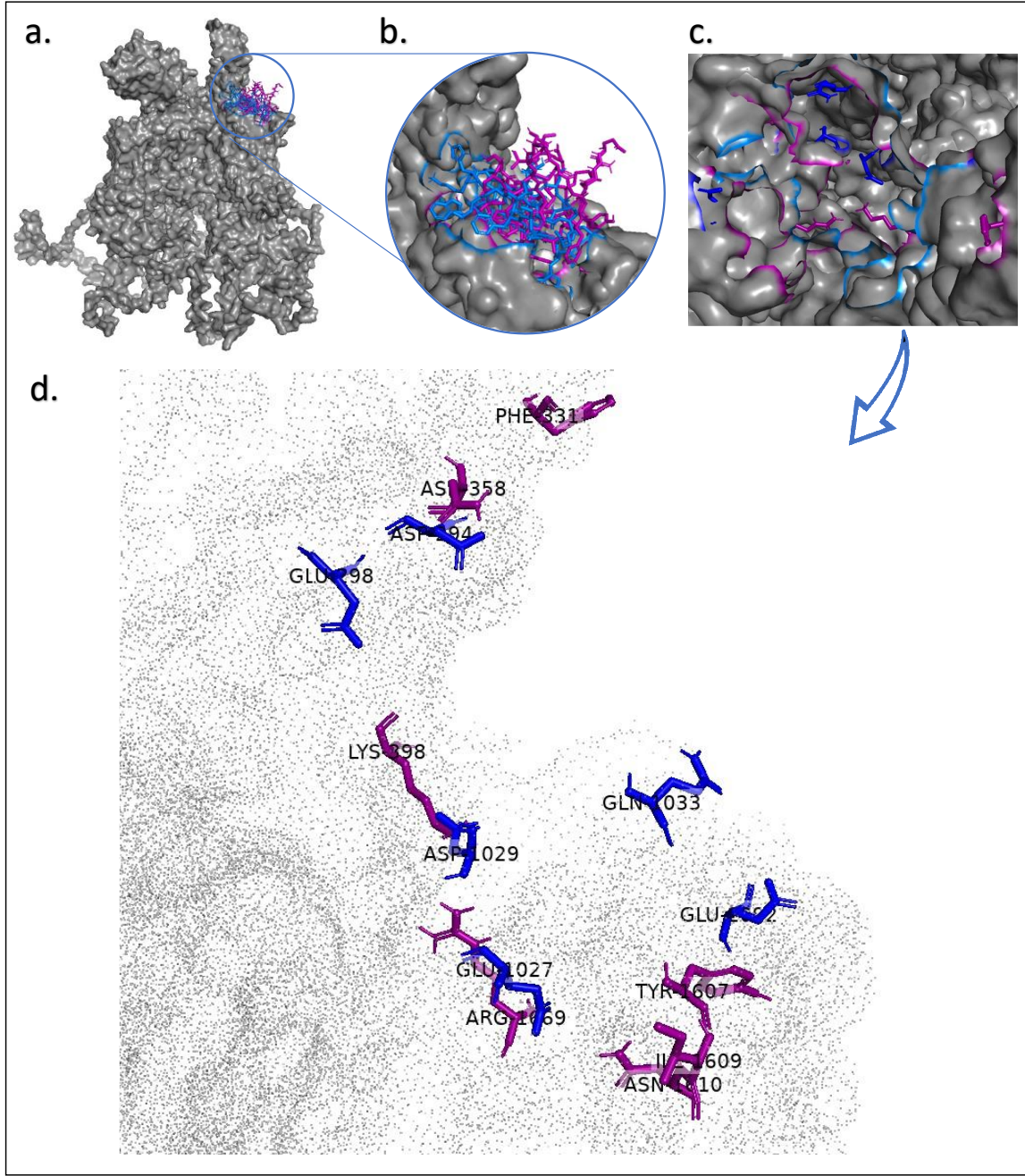
Tablo 24. Hm1a ve NaV1.2 arasındaki etkileşim noktaları

NaV1.2- Hm1a						
H Bağı	1. HADDOCK Çalışması			2. HADDOCK Çalışması		
	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi
	E1616-K26	9	37.5	K355-Y31	14	58.3
	D317-H18	6	25.0	D317-R22	11	45.8
	D1553-L5	6	25.0	Q1557-Y27	11	45.8
	Q1557-W30	6	25.0	E1616-K17	11	45.8
	Q1557-K27	5	20.8	R1626-Y31	9	37.5
Tuz Köprüsü	1. HADDOCK Çalışması			2. HADDOCK Çalışması		
	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi	Etkileşim	Tekrar Sayısı	Tekrar Yüzdesi
	D317-H18	8	33.3	K355-Y31	9	37.5
	E1616-K26	6	25.0	E1616-K17	9	37.5
	E321-K17	4	16.7	D317-R22	8	33.3
	D317-K17	4	16.7	R1626-Y31	7	29.2
	E1551-H18	4	16.7	E1616-R22	4	16.7

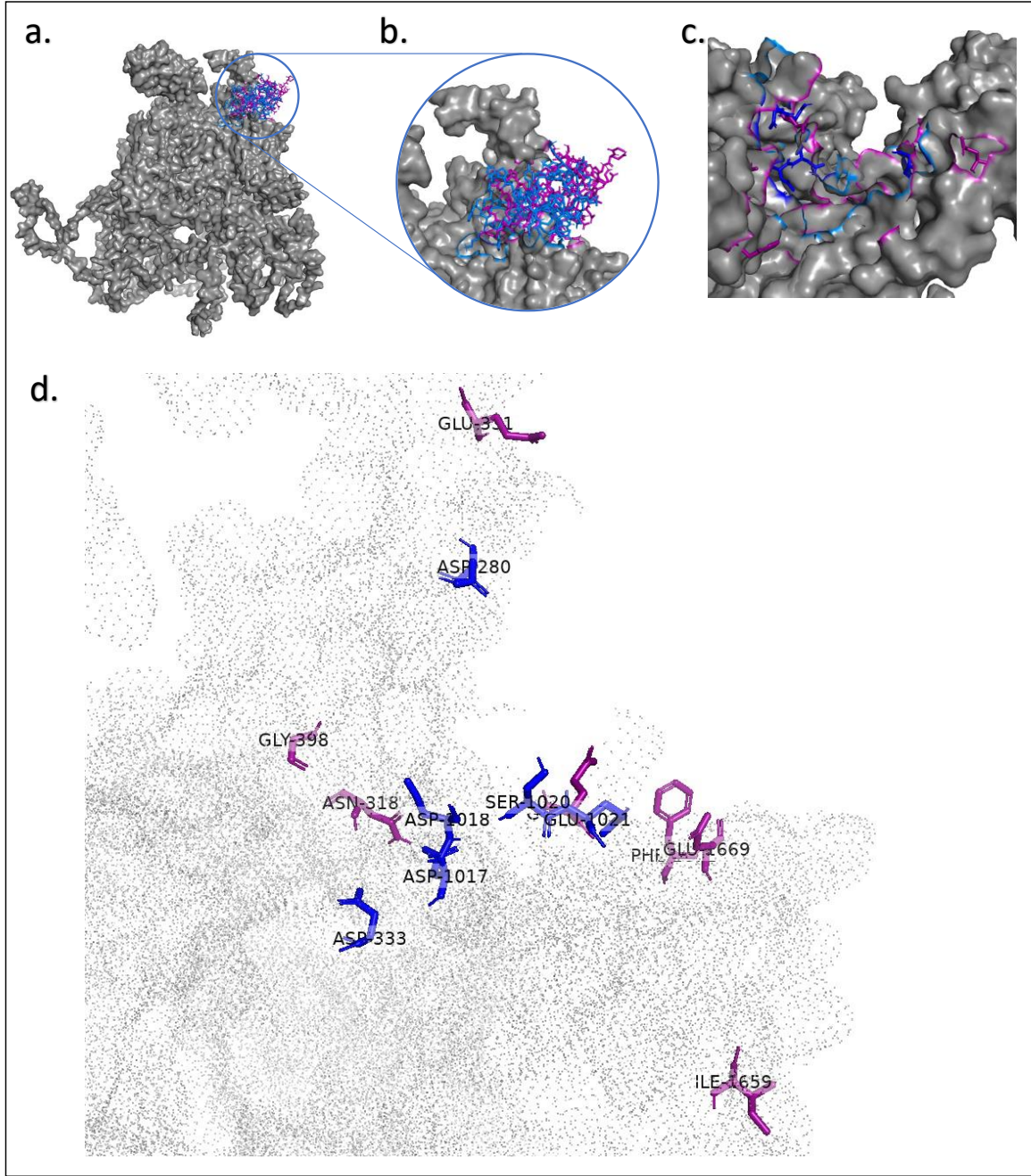
Elde edilen sonuçlar PYMOL görselleştirme aracı ile görselleştirilerek incelenmiştir. NaV1.1-Hm1a ilişkisi Şekil 19'da, NaV1.2-Hm1a ilişkisi Şekil 20'de, NaV1.1-Hj1a ilişkisi Şekil 21'de gösterilmiştir. a ve b'deki görseller toksin bağlanma bölgesini göstermektedir. Görsellerdeki c ve d kısmı ise Tablo 22, 23 ve 24'te tespit edilen sıklıkla etkileşime giren reseptör rezidülerini göstermektedir. Mavi renk ilk kenetlenme sonuçlarından, mor renk ikinci kenetlenme sonuçlarından elde edilen verileri temsil eder.



Şekil 19. NaV1.1- Hm1a etkileşim noktalarının PYMOL ile görselleştirilmesi. a ve b'de mavi ile gösterilen toksin ilk kenetlenme çalışmasının, mor ile gösterilen toksin ikinci kenetlenme çalışmasının en iyi sonuçlarından elde edilmiştir. c'de mavi (ilk kenetlenme çalışması) ve mor (ikinci kenetlenme çalışması) olarak gösterilen rezidüler reseptöre aittir ve toksinler ile sıklıkla etkileşime girdiği tespit edilen rezidülerdir (Tablo 22). d, c'nin daha detaylı gösterimidir.



Şekil 20. NaV1.2- Hm1a etkileşim noktalarının PYMOL ile görselleştirilmesi. a ve b’de mavi ile gösterilen toksin ilk kenetlenme çalışmasının, mor ile gösterilen toksin ikinci kenetlenme çalışmasının en iyi sonuçlarından elde edilmiştir. c’de mavi (ilk kenetlenme çalışması) ve mor (ikinci kenetlenme çalışması) olarak gösterilen rezidüler reseptöre aittir ve toksinler ile sıklıkla etkileşime girdiği tespit edilen rezidülerdir (Tablo 23). d, c’nin daha detaylı gösterimidir.



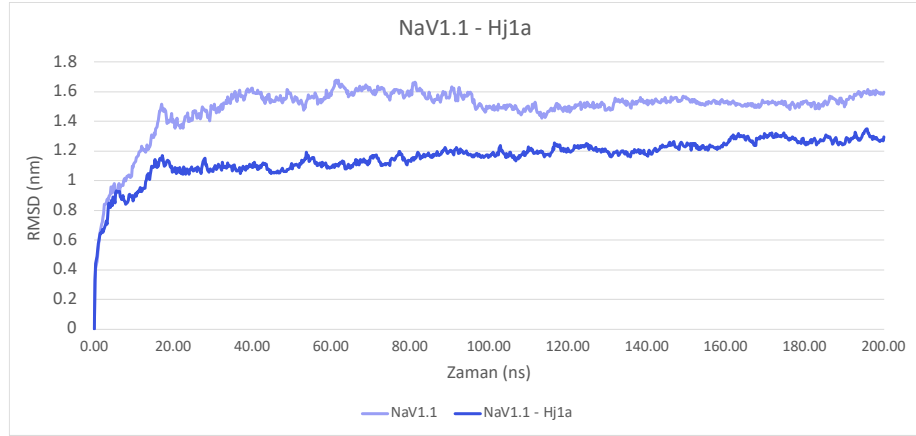
Şekil 21. NaV1.1- Hj1a etkileşim noktalarının PYMOL ile görselleştirilmesi. a ve b’de mavi ile gösterilen toksin ilk kenetlenme çalışmasının, mor ile gösterilen toksin ikinci kenetlenme çalışmasının en iyi sonuçlarından elde edilmiştir. c’de mavi (ilk kenetlenme çalışması) ve mor (ikinci kenetlenme çalışması) olarak gösterilen rezidüler reseptöre aittir ve toksinler ile sıklıkla etkileşime girdiği tespit edilen rezidülerdir (Tablo 24). d, c’nin daha detaylı gösterimidir.

3.7. Moleküler Dinamik Simülasyonu Sonuçları

Genel olarak yapılan literatür taramasına göre yapılan deneysel araştırmalarda seçilen toksinler NaV1.1 kanalı ile etkileşime girerek aktivitede değişiklik yaratmaktadır. Yapılan kenetlenme sonuçlarında Hm1a toksin peptidinin NaV1.2 kanalı ile yaptığı etkileşimin enerji skoru ilgi çekiciydi. MDS çalışmaları ile toksin etkileşimi olmayan NaV kanalı ve toksin ile etkileşimde olan NaV kanal yapısı karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

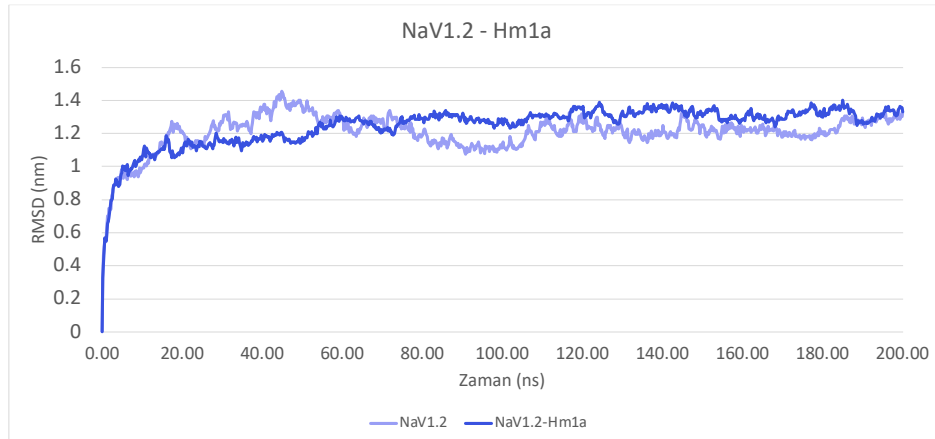
Aynı kanal proteininin toksinli ve toksinsiz hali, omurga karbon alfa atomları karşılaştırılarak, yani RMSD hesaplamaları ile incelenmiş, yapılar arasındaki farklar ortaya konmuştur (Şekil 22, 23). Ayrıca yapıların toksinli ve toksinsiz halinin esnekliği ve hareketliliği RMSF analizleri ile ortaya konmuştur (Şekil 24, 25).

3.7.1. RMSD Analizi

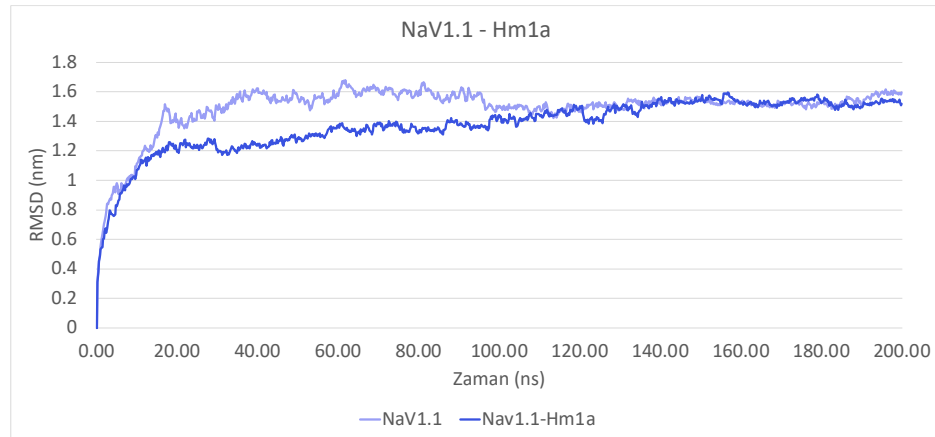


Şekil 22. NaV1.1 ve H1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSD analiz grafiği

Toksin bağlanması ile birlikte genel hareket önemli ölçüde azalmıştır.



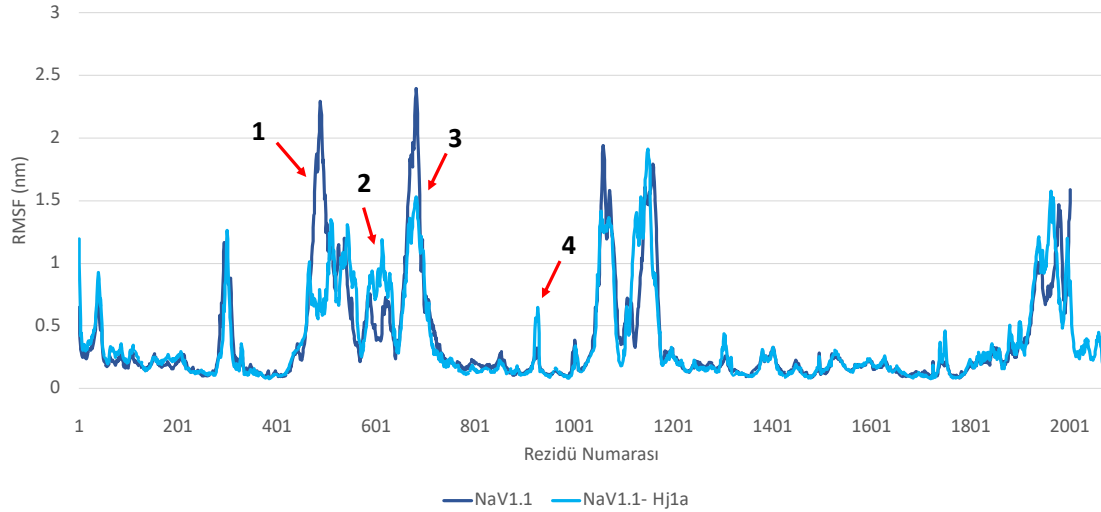
Şekil 23. NaV1.2 ve Hm1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSD analiz grafiği



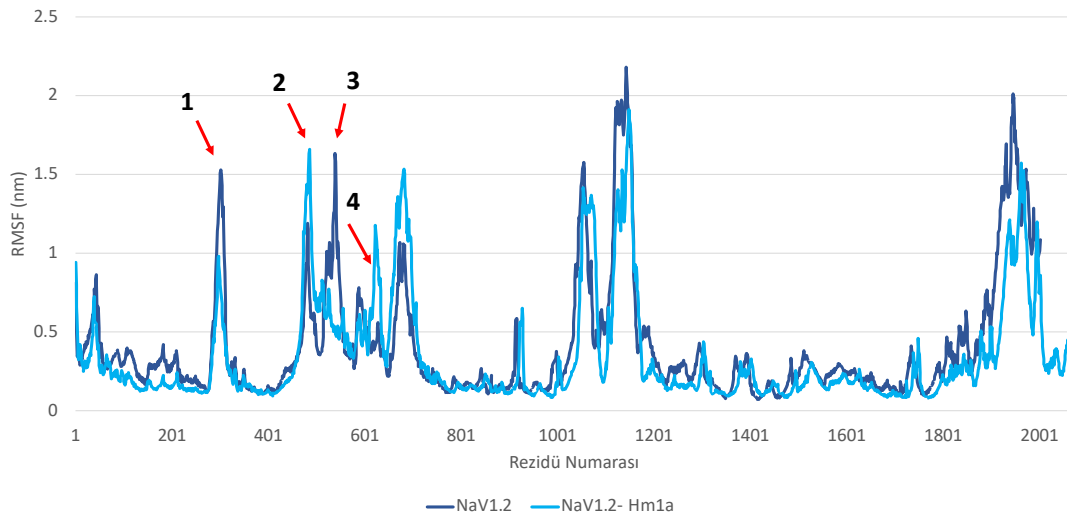
Şekil 24. NaV1.1 ve Hm1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSD analiz grafiği

Toksin bağlanması ile birlikte yaban tipin gösterdiği dinamik değişiklikler, NaV1.1-Hm1a'ya göre, çok küçük boyutta da olsa sınırlandırmıştır. Kanal protein yapısının etkilendiği açık bir şekilde görülmektedir. Sistem dengeye geldiğinde her ne kadar hareketler aynı düzeyde görülse de o raddeye gelene kadar kanal yapısında değişime neden olan bir toksin etkisinin varlığını söylemek mümkündür.

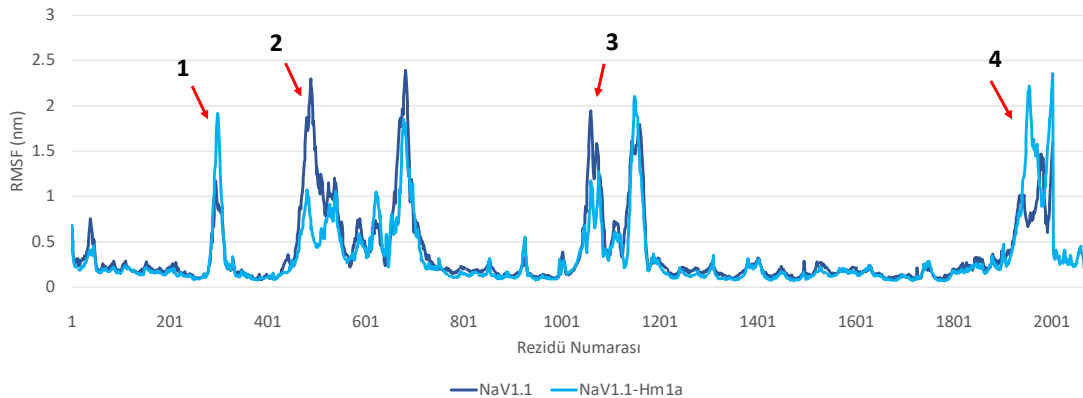
3.7.2. RMSF Analizi



Şekil 25. NaV1.1 ve Hj1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSF analiz grafiği



Şekil 26. NaV1.2 ve Hm1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSF analiz grafiği



Şekil 27. NaV1.1 ve Hm1a etkileşimi için simülasyon sonrası RMSF analiz grafiği

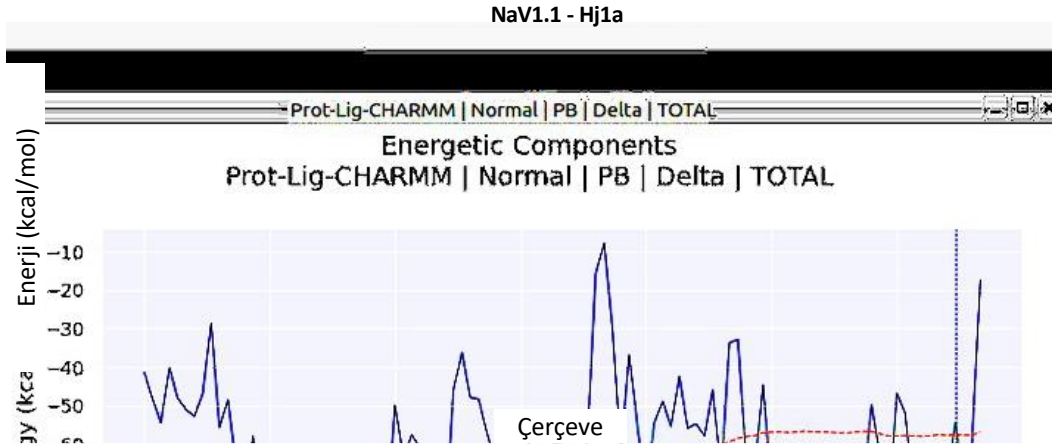
Şekil 25, 26 ve 27’de gösterilen RMSF grafikleri üzerinde hareketliliğinde artış veya azalış olduğu belirlenen rezidüer ok işaretleri ile gösterilmiştir. Grafiklerde koyu lacivert ile çizilen grafik toksin etkisi altında olmayan kanal proteinini temsil ederken, açık mavi ile çizilen farklı grafikler farklı toksinlerin etkisi altında olan kanal proteinlerini temsil eder.

NaV1.1-Hj1a etkileşimi için 1 ve 3 numaralı oklar ile gösterilen bölgelerde bulunan rezidüer hareketliliğinde azalma olurken, 2 ve 4 numaralı ok ile gösterilen bölgelerdeki rezidüer hareketliliğinde artış gözlenmektedir (Şekil 25).

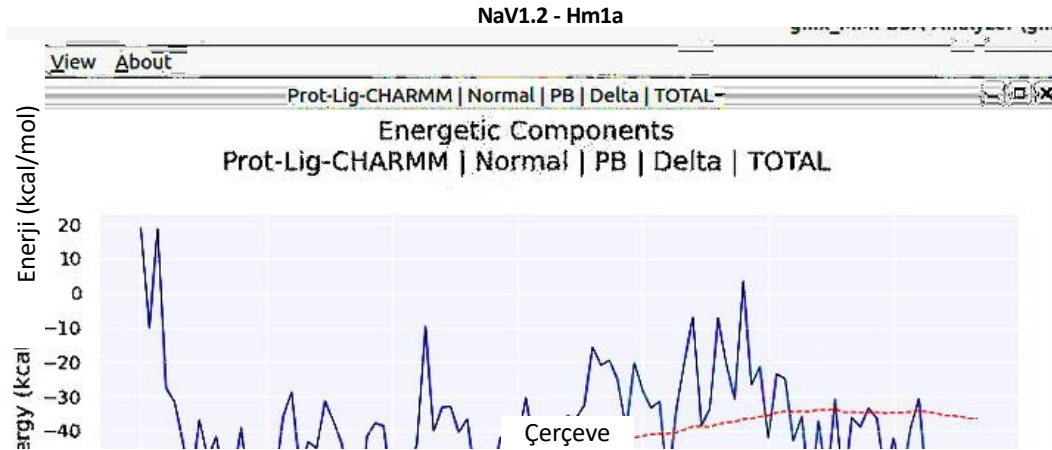
NaV1.2-Hm1a etkileşimi için 1 ve 3 numaralı oklar ile gösterilen bölgelerde bulunan rezidüer hareketliliğinde azalma olurken, 2 ve 4 numaralı ok ile gösterilen bölgelerdeki rezidüer hareketliliğinde artış gözlenmektedir (Şekil 26).

NaV1.1-Hm1a etkileşimi için 2 ve 3 numaralı oklar ile gösterilen bölgelerde bulunan rezidüer hareketliliğinde azalma olurken, 1 ve 4 numaralı ok ile gösterilen bölgelerdeki rezidüer hareketliliğinde artış gözlenmektedir (Şekil 27).

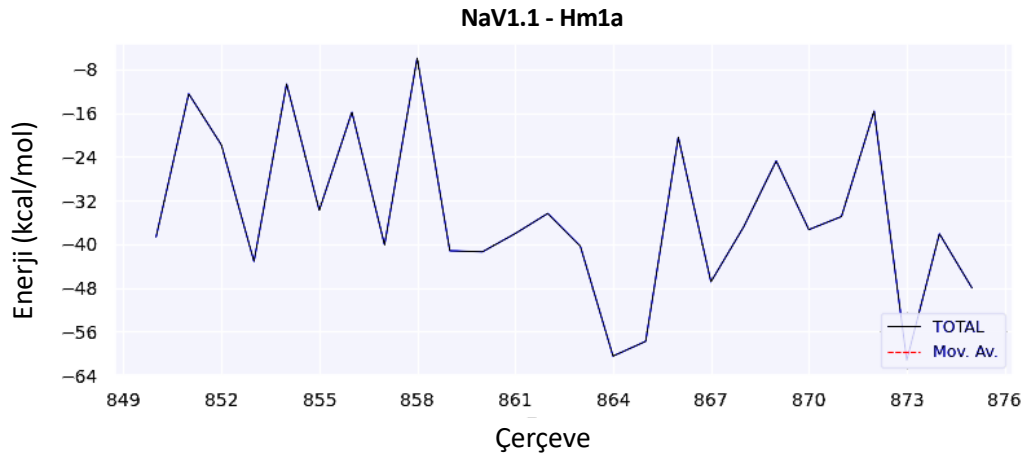
3.7.3. Bağlanma Enerjisi Değişimi



Şekil 28. NaV1.1- Hj1a etkileşiminin MDS boyunca toplam bağlanma enerjisi değişim grafiği. Kırmızı kesikli çizgi ortalama bağlanma enerjisini göstermektedir.



Şekil 29. NaV1.2- Hm1a etkileşiminin MDS boyunca toplam bağlanma enerjisi değişim grafiği. Kırmızı kesikli çizgi ortalama bağlanma enerjisini göstermektedir.



Şekil 30. NaV1.1- Hm1a etkileşiminin MDS boyunca toplam bağlanma enerjisi değişim grafiği.

Total enerji, moleküler-mekanik enerjiler ve çözünme enerjisinin toplamından elde edilir. Moleküler-mekanik enerjiler, iç enerji (bağlar, açılar ve dihedraller), van der Waals ve elektrostatik etkileşimlerdir. Çözünme enerjisi ise elektrostatik ve polar olmayan etkileşim enerjilerini içermektedir.

NaV1.1-Hj1a etkileşiminden elde edilen ortalama enerji -60.32, NaV1.2-Hm1a etkileşiminden elde edilen ortalama enerji -38.89 olarak belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Hm1a toksin peptidinin NaV1.2 ile olan etkileşiminin kanal üzerinde bir değişiklik yaratmaması beklenir. Elde edilen sonuçlar bunu destekler niteliktedir. RMSD değerlerine bakıldığında Hm1a toksin peptidi NaV1.2 kanalı üzerinde fark yaratıcı bir etki oluşturmamıştır. RMSF değerlerinde hareketliliğinde değişim tespit edilen bölgeler 280-310, 470-500, 510-560 ve 610-640 arası rezidülerdir.

Hj1a toksin peptidinin NaV1.1 kanalı ile etkileşime girmesi kanal yapısının hızlı bir şekilde stabil hale gelmesini sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar toksinler ile etkileşime giren ve girmeyen yapıdaki farkı ortaya koymaktadır. RMSF değerlerinde hareketliliğinde değişim tespit edilen bölgeler 460-510, 590-630, 650-700 ve 1050-1080 arası rezidülerdir.

Hm1a toksin peptidinin NaV1.1 kanalı ile etkileşime girmesi kanal yapısının dinamiğini etkilemektedir. Elde edilen sonuçlar toksinler ile etkileşime giren ve girmeyen yapıdaki farkı ortaya koymaktadır. RMSF değerlerinde hareketliliğinde değişim tespit edilen bölgeler 238-268, 418-478, 997-1037 ve 1887-1937 arası rezidülerdir.

Şekil 31, Şekil 32 ve Şekil 33'de NaV1.1 ve NaV1.2 kanal proteinlerinin Hj1a ve Hm1a toksin peptidlerinin ilişkileri çalışmalardan elde edilen bilgilere göre tanımlanmıştır. Bu tanımlamalar toksin bağlı olmayan ve toksin bağlı yapıların simülasyonları sonuçları karşılaştırılarak yapılmıştır. Etkileşime girdiği belirlenen kanal proteini rezidüleri sarı

renk ile vurgulanmıştır. Her bir şekil için açık mavi ile vurgulanan rezidüler RMSF sonuçlarına göre hareketliliğinde değişim olduğu belirlenen bölgeleri temsil etmektedir.

NaV1.1 Hj1a															
.....	287	288	289		312	313	314			352	353	354			
.....	L	E	E		F	D	W			V	K	A			
460	461	462	463	464						506	507	508	509	510	
Q	A	A	T	A						Q	K	E	Q	S	
590	591	592	593	594						626	627	628	629	630	
F	A	D	D	E						S	R	S	S	R	
650	651	652	653	654						696	697	698	699	700	
V	V	S	L	V						S	F	H	V	S	
1050	1051	1052	1053	1054						1076	1077	1078	1079	1080	
P	L	D	D	L						L	K	D	V	N	
.....		1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568				
.....		M	V	E	T	D	D	Q	S	E	Y				
1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634		
L	A	E	L	I	E	K	Y	F	V	S	P	T	L		

Şekil 31. NaV1.1 ve Hj1a bağlanmasında en sık tekrarlayan etkileşim noktaları (sarı vurgu ile gösterilmiştir) ve etkilenen bölge (açık mavi ile vurgulanmıştır.) analizi

NaV1.2 Hm1a															
.....			316	317	318			354	355	356					
.....			W	D	E			V	K	A					
280	281	282	283	284						306	307	308	309	310	
Q	W	P	P	D						T	F	N	R	T	
470	471	472	473	474						496	497	498	499	500	
E	S	R	D	F						K	S	E	K	E	
510	511	512	513	514						556	557	558	559	560	
Q	K	E	Q	S						H	Q	S	L	L	
610	611	612	613	614						636	637	638	639	640	
S	L	F	V	P						P	I	L	P	M	
.....		1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558				
.....		M	M	E	T	D	D	Q	S	Q	E				
1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627		
L	I	E	K	Y	F	V	S	P	T	L	F	R	V		

Şekil 32. NaV1.2 ve Hm1a bağlanmasında en sık tekrarlayan etkileşim noktaları (sarı vurgu ile gösterilmiştir) ve etkilenen bölge (açık mavi ile vurgulanmıştır.) analizi

NaV1.1 Hm1a															
.....					352	353	354								
.....					V	K	A								
238	239	240	241	242					264	265	266	267	268		
G	A	L	I	Q					I	G	L	Q	L		
418	419	420	421	422					474	475	476	477	478		
I	L	A	V	V					S	A	A	G	R		
997	998	999	1000	1001					1033	1034	1035	1036	1037		
A	D	N	L	A					F	I	Q	Q	S		
1887	1888	1889	1890	1891					1933	1934	1935	1936	1937		
I	Q	M	E	E					R	T	V	K	Q		
.....		1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568				
.....		M	V	E	T	D	D	Q	S	E	Y				
1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634		
L	A	E	L	I	E	K	Y	F	V	S	P	T	L		
.....				1635	1636	1637	1638	1639	1640						
.....				F	R	V	I	R	L						

Şekil 33. NaV1.1 ve Hm1a bağlanmasında en sık tekrarlayan etkileşim noktaları (sarı vurgu ile gösterilmiştir) ve etkilenen bölge (açık mavi ile vurgulanmıştır.) analizi

Her bir şekil için kırmızı ile yazılan rezidüler S1-S2 hücre dışı döngüyü, lacivert ile yazılan rezidüler S3-S4 hücre dışı döngüyü göstermektedir. Yapılan bu üç farklı çalışmada, toksinler S1-S2, S3-S4 hücre dışı alan ve çevrede bulunan rezidüler ile etkileşime girmiştir. Bu etkileşimler sonucunda MDS çalışmaları ile belirlenen yapısal değişimlerin hücre içi döngü bölümlerinde olduğu tespit edilmiştir (açık mavi ile vurgulanan rezidü kısımları). Bu MDS çalışması ile hücre dışı toksin bağlanmalarının hücre içi yapıların hareketlerini etkilediğini sanal ortamda gözlemlemiş olduk.

Pre1a, Hj1a ve Hm1a toksinlerinin bağlı olduğu farklı sodyum kanal yapıları sanal ortam kullanılarak ilk defa oluşturuldu. Böylelikle toksinlerin seçici bağlanma mekanizması ilk defa moleküler seviyede gösterilmiştir. Moleküller arası etkileşimler kenetlenme çalışmaları ile belirlenmiş, bağlanma bölgeleri açığa çıkartılmıştır. Birinci ve ikinci kenetlenme çalışması sonuçlarında yapılan incelemeler sonucunda belirlenen etkileşim noktalarının tamamının aynı bölgede olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ikinci kenetlenme çalışması ile analiz değerlerinde iyileşmeler tespit edilmiştir (Haddock skor ve özellikle ilk kenetlenmede beklenenin çok üstünde olan kısıtlama ihlali enerjisi), böylelikle elde edilen verilerin güvenilirliğini arttırdığımızı düşünüyoruz. Literatürden elde edilen deneysel verilere göre Hm1a'nın diğer toksinlere göre daha spesifik hedef seçtiği düşünülmektedir. Kenetlenme sonuçlarına göre Hj1a NaV1.1'i spesifik olarak hedeflerken diğer NaV kanallarına olan afinitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Kenetlenme çalışmaları ile S1-S2 ve S3-S4 hücre dışı döngülerinin toksin bağlanmasındaki önemi ortaya konmuştur. Her ne kadar hedef bölgelerde kısıtlamalar yapmış olsak da kenetlenme çalışmalarından elde edilen sonuçlar, her iki bölgenin de toksin bağlanmalarında rol aldığını göstermektedir.

Hareketli ve uzun aminoasit dizisine sahip hücre içi ve hücre dışı döngüleri içinde barındırması sebebi ile sodyum kanal proteinleri tamamen modellenmiş yapılara sahip

değildirler. Bu çalışma ile NaV1.1 ve NaV1.2 sodyum kanal protein yapıları ilk kez modellenmiştir.

MDS çalışmalarında NaV1.1-Hj1a etkileşiminde bu bağlanmadan etkilendiği belirlenen rezidülerin hücre içi döngülerde bulunduğu yapılan incelemeler ile tespit edilmiştir. Bu bölgeler hareketli bölgeler olduğundan henüz deneysel olarak modellenmiş bir yapıya sahip değildirler. Fakat elde edilen sonuçlara göre belirtilen bölgelerin kanal hareketliliği üzerinde etkisi olduğunu düşünmekteyiz. Her ne kadar NaV1.2- Hm1a kenetlenmesi yüksek enerji değerine sahip olsa da, genel olarak kanal hareketliliğinde önemli ölçüde bir değişim yaratmadığı MDS çalışmalarında belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürü destekler niteliktedir. NaV1.1-Hm1a bağlanması diğer bağlanmalardan farklı olarak DI S5-S6 üzerinde bulunan 238-268 ve 418-478 nolu rezidülerin hareketlerini etkilemiştir. Gözenek bölgesinde bulunan bu alanlar kanal aktivitesi üzerinde etki sahibi olabilir. Yapılan kenetlenme çalışmaları sonucunda Hm1a toksininin başta NaV1.1 olmak üzere diğer voltaja duyarlı kanal yapıları ile etkileşime geçtiği belirlenmiştir. Bağlanma enerjisi yüksek olsa dahi etkileşimde bulunduğu rezidülerin kanal hareketliliğindeki önemi açıkça ortaya konmuştur. Yapılan analizler ile toksinlerin hücre dışı alanlara bağlanarak hücre içi döngülerin hareketlerini etkilediği tespit edilmiştir.

Kanal proteinleri ve toksinler büyük protein yapılarına sahiptirler ve bundan dolayı etkileşimdeki bağ enerjilerinin yüksek olması gerekir. Çalışma yaptığımız yapılardan NaV1.1-Hj1a ve NaV1.1-Hm1a ikililerinden elde ettiğimiz ortalama enerji değerlerinin istenilen düzeyde olduğunu, güçlü bir bağlanma gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Buna kıyasla NaV1.2-Hm1a ortalama enerji değeri düşük kalmaktadır ve diğerlerine göre daha zayıf bir bağlanma gerçekleştirdiğini söylemek mümkündür.

Bu tez çalışması ile elde edilen bulgular ve çeşitli spesifik bağlanma sonuçları, yapısal detayların tahmininde bize yol gösterecek olup, bu mekanizmaların fonksiyonel özelliklerini anlamada temel bir adımdır. Yapılan çalışmalar, bu toksin peptidlerinin teröpotik ilaç potensiyellerini anlamamızda bize ve literatüre katkı sağlamaktadır.

5. SINIRLAMALAR

Sodyum kanallarının toksin bağlanma bölgeleri ile ilgili literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır, bu da çok fazla deneme çalışması yapmayı gerektirir. İlgili toksinler ile ilgili her ne kadar deneysel çalışma olsa da moleküler düzeydeki işleyiş mekanizmaları, hedefledikleri bağlanma bölgeleri ve toksin aktif bölgeler gibi önemli bilgiler henüz aydınlatılmamıştır.

Büyük protein ve peptid yapılarından dolayı kenetlenme ve moleküler dinamik simülasyonu çalışmaları zaman alıcıdır. Ancak yüksek CPU gücüne sahip bilgisayarlar ya da bize bunu sağlayan bir yazılım kullanılarak kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilebilir. MDS çalışmaları yapıların çok büyük olmasından dolayı Truba sistemi kullanılarak yapılmıştır. Buna rağmen hem bu ortak kullanım alanında sıra bekleme, hem de çalışmanın tamamlanması için gereken uzun zaman çalışmayı zorlaştırmaktadır. MDS çalışmaları için gerekli olan tamamı modellenmiş deneysel yapılar bulunmamaktadır. Bu gibi yapılar uzun ve hareketli aminoasit dizilerine sahip kısımlar içerdiğinden modellenmesi zordur.

6. GELECEK ÇALIŞMALAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kullanılan toksinler olası yeni ilaçlar olarak yüksek potansiyele sahiptir ve bu çalışmalar ile yeni ilaç keşfine hız kazandırmayı umuyoruz.

Farklı homolog domainler ve bu çalışmada denemesi yapılmayan S5-S6 hücre dışı döngülerinde toksin bağlanması ve etkisi benzer çalışmalarla incelenecektir. Yüksek kenetlenme enerjisine sahip henüz MDS çalışması yapılmayan yapıların simülasyona tabi tutularak incelenecektir. Yapılan MDS çalışmalarında potansiyel vadeden yapıların daha uzun süren simülasyonlara alınarak ve farklı iyon konsantrasyonlarında denenecektir.

KAYNAKÇA

- [1] J. R. Deuis, A. Mueller, M. R. Israel, and I. Vetter, "The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators," *Neuropharmacology*, vol. 127, pp. 87–108, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.014.
- [2] C. Y. Chow, Y. K. Y. Chin, L. Ma, E. A. B. Undheim, V. Herzig, and G. F. King, "A selective NaV1.1 activator with potential for treatment of Dravet syndrome epilepsy," *Biochem Pharmacol*, vol. 181, p. 113991, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.bcp.2020.113991.
- [3] C. Y. Chow *et al.*, "Venom Peptides with Dual Modulatory Activity on the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.1 Provide Novel Leads for Development of Antiepileptic Drugs," *ACS Pharmacol Transl Sci*, vol. 3, no. 1, pp. 119–134, Feb. 2020, doi: 10.1021/acsptsci.9b00079.
- [4] M. de Lera Ruiz and R. L. Kraus, "Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 18, pp. 7093–7118, Sep. 2015, doi: 10.1021/jm501981g.
- [5] M. H. Meisler, S. F. Hill, and W. Yu, "Sodium channelopathies in neurodevelopmental disorders," *Nat Rev Neurosci*, vol. 22, no. 3, pp. 152–166, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41583-020-00418-4.
- [6] F. C. Cardoso, "Multi-targeting sodium and calcium channels using venom peptides for the treatment of complex ion channels-related diseases," *Biochemical Pharmacology*, vol. 181, p. 114107, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114107.
- [7] H. Wulff, P. Christophersen, P. Colussi, K. G. Chandy, and V. Yarov-Yarovoy, "Antibodies and venom peptides: new modalities for ion channels," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 18, no. 5, pp. 339–357, May 2019, doi: 10.1038/s41573-019-0013-8.
- [8] A. Dhakal, C. McKay, J. J. Tanner, and J. Cheng, "Artificial intelligence in the prediction of protein–ligand interactions: recent advances and future directions," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 23, no. 1, p. bbab476, Jan. 2022, doi: 10.1093/bib/bbab476.
- [9] W. R. J. Whitaker, R. L. M. Faull, H. J. Waldvogel, C. J. Plumpton, P. C. Emson, and J. J. Clare, "Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain," *Molecular Brain Research*, vol. 88, no. 1–2, pp. 37–53, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0169-328X(00)00289-8.
- [10] J. D. Osteen, K. Sampson, V. Iyer, D. Julius, and F. Bosmans, "Pharmacology of the Na_v 1.1 domain IV voltage sensor reveals coupling between inactivation gating processes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 114, no. 26, pp. 6836–6841, Jun. 2017, doi: 10.1073/pnas.1621263114.
- [11] "WEB: https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_channel."
- [12] H. Meng *et al.*, "The SCN1A Mutation Database: Updating Information and Analysis of the Relationships among Genotype, Functional Alteration, and Phenotype," *Human Mutation*, vol. 36, no. 6, pp. 573–580, Jun. 2015, doi: 10.1002/humu.22782.
- [13] R. S. Smith *et al.*, "Sodium Channel SCN3A (NaV1.3) Regulation of Human Cerebral Cortical Folding and Oral Motor Development," *Neuron*, vol. 99, no. 5, pp. 905–913.e7, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.07.052.
- [14] D. L. Bennett, A. J. Clark, J. Huang, S. G. Waxman, and S. D. Dib-Hajj, "The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling," *Physiological Reviews*, vol. 99, no. 2, pp. 1079–1151, Apr. 2019, doi: 10.1152/physrev.00052.2017.
- [15] P. Chockalingam and A. Wilde, "The multifaceted cardiac sodium channel and its clinical implications," *Heart*, vol. 98, no. 17, pp. 1318–1324, Sep. 2012, doi: 10.1136/heartjnl-2012-301784.
- [16] A. Beyder *et al.*, "Loss-of-Function of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 (Channelopathies) in Patients With Irritable Bowel Syndrome," *Gastroenterology*, vol. 146, no. 7, pp. 1659–1668, Jun. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.054.

- [17] K. M. Butler *et al.*, "De novo and inherited SCN8A epilepsy mutations detected by gene panel analysis," *Epilepsy Research*, vol. 129, pp. 17–25, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.11.002.
- [18] M. H. Meisler, "Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 8, pp. 2010–2017, Aug. 2005, doi: 10.1172/JCI25466.
- [19] G. Vargas-Alarcon *et al.*, "A SCN9A gene-encoded dorsal root ganglia sodium channel polymorphism associated with severe fibromyalgia," *BMC Musculoskelet Disord*, vol. 13, no. 1, p. 23, Dec. 2012, doi: 10.1186/1471-2474-13-23.
- [20] A. S. Lindy *et al.*, "Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders," *Epilepsia*, vol. 59, no. 5, pp. 1062–1071, May 2018, doi: 10.1111/epi.14074.
- [21] L. Claes, J. Del-Favero, B. Ceulemans, L. Lagae, C. Van Broeckhoven, and P. De Jonghe, "De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 68, no. 6, pp. 1327–1332, Jun. 2001, doi: 10.1086/320609.
- [22] C. Dravet, "The core Dravet syndrome phenotype: Core Dravet Syndrome," *Epilepsia*, vol. 52, pp. 3–9, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.02994.x.
- [23] J. D. Osteen *et al.*, "Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain," *Nature*, vol. 534, no. 7608, pp. 494–499, Jun. 2016, doi: 10.1038/nature17976.
- [24] T. Zaman *et al.*, "Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy: Mutations in SCN3A Cause EIEE," *Ann Neurol.*, vol. 83, no. 4, pp. 703–717, Apr. 2018, doi: 10.1002/ana.25188.
- [25] A. Bhattacharya, A. D. Wickenden, and S. R. Chaplan, "Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain," *Neurotherapeutics*, vol. 6, no. 4, pp. 663–678, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.nurt.2009.08.001.
- [26] H. Terlau and B. M. Olivera, "Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides," *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 1, pp. 41–68, Jan. 2004, doi: 10.1152/physrev.00020.2003.
- [27] J. Gilchrist, B. M. Olivera, and F. Bosmans, "Animal Toxins Influence Voltage-Gated Sodium Channel Function," in *Voltage Gated Sodium Channels*, P. C. Ruben, Ed., in Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 221. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, pp. 203–229. doi: 10.1007/978-3-642-41588-3_10.
- [28] B. Hille, "The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis," *Biophysical Journal*, vol. 15, no. 6, pp. 615–619, Jun. 1975, doi: 10.1016/S0006-3495(75)85842-5.
- [29] S. Gill *et al.*, "Flux Assays in High Throughput Screening of Ion Channels in Drug Discovery," *ASSAY and Drug Development Technologies*, vol. 1, no. 5, pp. 709–717, Oct. 2003, doi: 10.1089/154065803770381066.
- [30] E. Koppenhöfer and H. Schmidt, "Die Wirkung von Skorpiongift auf die Ionenströme des Ranvierschen Schnerrings," *Pflugers Arch.*, vol. 303, no. 2, pp. 133–149, 1968, doi: 10.1007/BF00592631.
- [31] M. D. Cahalan, "Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom.," *The Journal of Physiology*, vol. 244, no. 2, pp. 511–534, Jan. 1975, doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp010810.
- [32] F. Couraud, E. Jover, J. M. Dubois, and H. Rochat, "Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel," *Toxicon*, vol. 20, no. 1, pp. 9–16, Jan. 1982, doi: 10.1016/0041-0101(82)90138-6.
- [33] S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, Y. Qu, F. Sampieri, T. Scheuer, and W. A. Catterall, "Structure and Function of the Voltage Sensor of Sodium Channels Probed by a β -Scorpion Toxin,"

- Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 30, pp. 21332–21344, Jul. 2006, doi: 10.1074/jbc.M603814200.
- [34] G. B. Edgerton, K. M. Blumenthal, and D. A. Hanck, “Evidence for multiple effects of ProTxII on activation gating in NaV1.5,” *Toxicon*, vol. 52, no. 3, pp. 489–500, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.06.023.
- [35] F. Bosmans, M.-F. Martin-Eauclaire, and K. J. Swartz, “Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels,” *Nature*, vol. 456, no. 7219, pp. 202–208, Nov. 2008, doi: 10.1038/nature07473.
- [36] M. Wang *et al.*, “JZTX-IV, a unique acidic sodium channel toxin isolated from the spider *Chilobrachys jingzhao*,” *Toxicon*, vol. 52, no. 8, pp. 871–880, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.08.018.
- [37] G. Corzo *et al.*, “Solution Structure and Alanine Scan of a Spider Toxin That Affects the Activation of Mammalian Voltage-gated Sodium Channels,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 7, pp. 4643–4652, Feb. 2007, doi: 10.1074/jbc.M605403200.
- [38] W. A. Schmalhofer *et al.*, “ProTx-II, a Selective Inhibitor of Na_v1.7 Sodium Channels, Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors,” *Mol Pharmacol*, vol. 74, no. 5, pp. 1476–1484, Nov. 2008, doi: 10.1124/mol.108.047670.
- [39] J. S. Wingerd *et al.*, “The tarantula toxin β/δ -TRTX-Pre1a highlights the importance of the S1-S2 voltage-sensor region for sodium channel subtype selectivity,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 974, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01129-0.
- [40] J. Dunlop, M. Bowlby, R. Peri, D. Vasilyev, and R. Arias, “High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, no. 4, pp. 358–368, Apr. 2008, doi: 10.1038/nrd2552.
- [41] H. Yu, M. Li, W. Wang, and X. Wang, “High throughput screening technologies for ion channels,” *Acta Pharmacol Sin*, vol. 37, no. 1, pp. 34–43, Jan. 2016, doi: 10.1038/aps.2015.108.
- [42] C. A. Ahern, J. Payandeh, F. Bosmans, and B. Chanda, “The hitchhiker’s guide to the voltage-gated sodium channel galaxy,” *Journal of General Physiology*, vol. 147, no. 1, pp. 1–24, Jan. 2016, doi: 10.1085/jgp.201511492.
- [43] P. E. Wright and H. J. Dyson, “Linking folding and binding,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 19, no. 1, pp. 31–38, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.sbi.2008.12.003.
- [44] S. J. de Vries, M. van Dijk, and A. M. J. J. Bonvin, “The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking,” *Nat Protoc*, vol. 5, no. 5, pp. 883–897, May 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.32.
- [45] S. J. de Vries, J. Rey, C. E. M. Schindler, M. Zacharias, and P. Tuffery, “The pepATTRACT web server for blind, large-scale peptide–protein docking,” *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. W1, pp. W361–W364, Jul. 2017, doi: 10.1093/nar/gkx335.
- [46] N. London, B. Raveh, E. Cohen, G. Fathi, and O. Schueler-Furman, “Rosetta FlexPepDock web server—high resolution modeling of peptide–protein interactions,” *Nucleic Acids Research*, vol. 39, no. suppl_2, pp. W249–W253, Jul. 2011, doi: 10.1093/nar/gkr431.
- [47] A. Saladin, J. Rey, P. Thévenet, M. Zacharias, G. Moroy, and P. Tufféry, “PEP-SiteFinder: a tool for the blind identification of peptide binding sites on protein surfaces,” *Nucleic Acids Research*, vol. 42, no. W1, pp. W221–W226, Jul. 2014, doi: 10.1093/nar/gku404.
- [48] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *J. Comput. Chem.*, p. NA-NA, 2009, doi: 10.1002/jcc.21334.
- [49] P. Agrawal, H. Singh, H. K. Srivastava, S. Singh, G. Kishore, and G. P. S. Raghava, “Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking,” *BMC Bioinformatics*, vol. 19, no. S13, p. 426, Feb. 2019, doi: 10.1186/s12859-018-2449-y.

- [50] B. Raveh, N. London, L. Zimmerman, and O. Schueler-Furman, "Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, p. e18934, Apr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018934.
- [51] N. London, B. Raveh, and O. Schueler-Furman, "Peptide docking and structure-based characterization of peptide binding: from knowledge to know-how," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 23, no. 6, pp. 894–902, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.sbi.2013.07.006.
- [52] B. Raveh, N. London, and O. Schueler-Furman, "Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins: Sub-Angstrom Modeling of Flexible Peptides," *Proteins*, vol. 78, no. 9, pp. 2029–2040, Jul. 2010, doi: 10.1002/prot.22716.
- [53] D. Spiliotopoulos *et al.*, "dMM-PBSA: A New HADDOCK Scoring Function for Protein-Peptide Docking," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 3, Aug. 2016, doi: 10.3389/fmolb.2016.00046.
- [54] C. E. M. Schindler, I. Chauvot De Beauchêne, S. J. De Vries, and M. Zacharias, "Protein-protein and peptide-protein docking and refinement using ATTRACT in CAPRI: Protein-Protein Docking and Refinement," *Proteins*, vol. 85, no. 3, pp. 391–398, Mar. 2017, doi: 10.1002/prot.25196.
- [55] M. Kurcinski, M. Jamroz, M. Blaszczyk, A. Kolinski, and S. Kmiecik, "CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site," *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. W1, pp. W419–W424, Jul. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv456.
- [56] M. P. Ciemny, A. Debinski, M. Paczkowska, A. Kolinski, M. Kurcinski, and S. Kmiecik, "Protein-peptide molecular docking with large-scale conformational changes: the p53-MDM2 interaction," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 37532, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep37532.
- [57] J. Yu, J. Andreani, F. Ochsenbein, and R. Guerois, "Lessons from (co-)evolution in the docking of proteins and peptides for CAPRI Rounds 28-35: Coevolution in CAPRI Rounds 28-35," *Proteins*, vol. 85, no. 3, pp. 378–390, Mar. 2017, doi: 10.1002/prot.25180.
- [58] M. F. Lensink, S. Velankar, and S. J. Wodak, "Modeling protein-protein and protein-peptide complexes: CAPRI 6th edition: Modeling Protein-Protein and Protein-Peptide Complexes," *Proteins*, vol. 85, no. 3, pp. 359–377, Mar. 2017, doi: 10.1002/prot.25215.
- [59] M. Ciemny *et al.*, "Protein–peptide docking: opportunities and challenges," *Drug Discovery Today*, vol. 23, no. 8, pp. 1530–1537, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.drudis.2018.05.006.
- [60] M. B. Kubitzki, B. L. De Groot, and D. Seeliger, "Protein Dynamics: From Structure to Function," in *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*, D. J. Rigden, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, 2017, pp. 393–425. doi: 10.1007/978-94-024-1069-3_12.
- [61] J. A. McCammon, B. R. Gelin, and M. Karplus, "Dynamics of folded proteins," *Nature*, vol. 267, no. 5612, pp. 585–590, Jun. 1977, doi: 10.1038/267585a0.
- [62] M. C. Childers and V. Daggett, "Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design," *Mol. Syst. Des. Eng.*, vol. 2, no. 1, pp. 9–33, 2017, doi: 10.1039/C6ME00083E.
- [63] J. Gelpi, A. Hospital, R. Goñi, and M. Orozco, "Molecular dynamics simulations: advances and applications," *AABC*, p. 37, Nov. 2015, doi: 10.2147/AABC.S70333.
- [64] S. A. Hollingsworth and R. O. Dror, "Molecular Dynamics Simulation for All," *Neuron*, vol. 99, no. 6, pp. 1129–1143, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.
- [65] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174, Jul. 2004, doi: 10.1002/jcc.20035.
- [66] A. Vidal-Limon, J. E. Aguilar-Toalá, and A. M. Liceaga, "Integration of Molecular Docking Analysis and Molecular Dynamics Simulations for Studying Food Proteins and Bioactive Peptides," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 70, no. 4, pp. 934–943, Feb. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.1c06110.
- [67] J. D. Durrant and J. A. McCammon, "Molecular dynamics simulations and drug discovery," *BMC Biol*, vol. 9, no. 1, p. 71, Dec. 2011, doi: 10.1186/1741-7007-9-71.

- [68] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*, 2nd ed. Harlow, England ; New York: Prentice Hall, 2001.
- [69] C. Chang, Y. Huang, L. Mueller, and W. You, "Investigation of Structural Dynamics of Enzymes and Protonation States of Substrates Using Computational Tools," *Catalysts*, vol. 6, no. 6, p. 82, May 2016, doi: 10.3390/catal6060082.
- [70] I. Aier, P. K. Varadwaj, and U. Raj, "Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor," *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 34984, Oct. 2016, doi: 10.1038/srep34984.
- [71] A. Badaczewska-Dawid, A. Kolinski, and S. Kmiecik, "Protocols for fast simulations of protein structure flexibility using CABS-flex and SURPASS," *Bioinformatics*, preprint, Jul. 2019. doi: 10.1101/694026.
- [72] F. Madeira *et al.*, "Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022," *Nucleic Acids Research*, vol. 50, no. W1, pp. W276–W279, Jul. 2022, doi: 10.1093/nar/gkac240.
- [73] M. Varadi *et al.*, "AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models," *Nucleic Acids Research*, vol. 50, no. D1, pp. D439–D444, Jan. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1061.
- [74] B. Jiménez-García, J. M. C. Teixeira, M. Trellet, J. P. G. L. M. Rodrigues, and A. M. J. J. Bonvin, "PDB-TOOLS web: A user-friendly interface for the manipulation of PDB files," *Proteins*, vol. 89, no. 3, pp. 330–335, Mar. 2021, doi: 10.1002/prot.26018.
- [75] E. Deplazes, J. Davies, A. M. J. J. Bonvin, G. F. King, and A. E. Mark, "Combination of Ambiguous and Unambiguous Data in the Restraint-driven Docking of Flexible Peptides with HADDOCK: The Binding of the Spider Toxin PcTx1 to the Acid Sensing Ion Channel (ASIC) 1a," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 56, no. 1, pp. 127–138, Jan. 2016, doi: 10.1021/acs.jcim.5b00529.
- [76] R. A. Laskowski, "PDBSUM 1 : A standalone program for generating PDBSUM analyses," *Protein Science*, vol. 31, no. 12, Dec. 2022, doi: 10.1002/pro.4473.
- [77] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures," *J Appl Crystallogr*, vol. 26, no. 2, pp. 283–291, Apr. 1993, doi: 10.1107/S0021889892009944.
- [78] E. G. Hutchinson and J. M. Thornton, "PROMOTIF-A program to identify and analyze structural motifs in proteins: Program to analyze protein structural motifs," *Protein Science*, vol. 5, no. 2, pp. 212–220, Feb. 1996, doi: 10.1002/pro.5560050204.
- [79] A. Waterhouse *et al.*, "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes," *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.
- [80] N. Guex, M. C. Peitsch, and T. Schwede, "Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective," *ELECTROPHORESIS*, vol. 30, no. S1, pp. S162–S173, Jun. 2009, doi: 10.1002/elps.200900140.
- [81] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, Oct. 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [82] W. R. Pearson and D. J. Lipman, "Improved tools for biological sequence comparison.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 85, no. 8, pp. 2444–2448, Apr. 1988, doi: 10.1073/pnas.85.8.2444.
- [83] M. C. Peitsch, "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling," *Biochemical Society Transactions*, vol. 24, no. 1, pp. 274–279, Feb. 1996, doi: 10.1042/bst0240274.
- [84] X. Huang and W. Miller, "A time-efficient, linear-space local similarity algorithm," *Advances in Applied Mathematics*, vol. 12, no. 3, pp. 337–357, Sep. 1991, doi: 10.1016/0196-8858(91)90017-D.

- [85] N. Guex and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling," *Electrophoresis*, vol. 18, no. 15, pp. 2714–2723, 1997, doi: 10.1002/elps.1150181505.
- [86] T. Schwede, "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 13, pp. 3381–3385, Jul. 2003, doi: 10.1093/nar/gkg520.
- [87] J. Lee *et al.*, "CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 15, no. 1, pp. 775–786, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.jctc.8b01066.
- [88] S. Jo, T. Kim, and W. Im, "Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 9, p. e880, Sep. 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000880.
- [89] L. Lim and M. R. Wenk, "Neuronal Membrane Lipids – Their Role in the Synaptic Vesicle Cycle," in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, A. Lajtha, G. Tettamanti, and G. Goracci, Eds., Boston, MA: Springer US, 2009, pp. 223–238. doi: 10.1007/978-0-387-30378-9_9.
- [90] W. C. Breckenridge, I. G. Morgan, J. P. Zanetta, and G. Vincendon, "Adult rat brain synaptic vesicles II. Lipid composition," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 320, no. 3, pp. 681–686, Oct. 1973, doi: 10.1016/0304-4165(73)90148-7.
- [91] B. R. Brooks *et al.*, "CHARMM: The biomolecular simulation program," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 10, pp. 1545–1614, Jul. 2009, doi: 10.1002/jcc.21287.
- [92] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, "GROMACS: Fast, flexible, and free," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, Dec. 2005, doi: 10.1002/jcc.20291.
- [93] M. T. Nelson *et al.*, "NAMD: a Parallel, Object-Oriented Molecular Dynamics Program," *The International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing*, vol. 10, no. 4, pp. 251–268, Dec. 1996, doi: 10.1177/109434209601000401.
- [94] D. A. Case *et al.*, "The Amber biomolecular simulation programs," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, Dec. 2005, doi: 10.1002/jcc.20290.
- [95] P. Eastman and V. Pande, "OpenMM: A Hardware-Independent Framework for Molecular Simulations," *Comput. Sci. Eng.*, vol. 12, no. 4, pp. 34–39, Jul. 2010, doi: 10.1109/MCSE.2010.27.
- [96] J. Jung *et al.*, "GENESIS: a hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations: GENESIS," *WIREs Comput Mol Sci*, vol. 5, no. 4, pp. 310–323, Jul. 2015, doi: 10.1002/wcms.1220.
- [97] A. P. Thompson *et al.*, "LAMMPS - a flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales," *Computer Physics Communications*, vol. 271, p. 108171, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.cpc.2021.108171.
- [98] "WEB: GROMACS Tutorial Protein-Ligand Complex Justin A. Lemkul, Ph.D. Virginia Tech Department of Biochemistry."