



# **NMDA Tipi Glutamat Reseptörlerinin Çalışma Mekanizması ve Açık İyon Kanalı İnhibitörleri ile Etkileşimleri**

**Program Kodu: 3501**

**Proje No: 114Z867**

Proje Yürütücüsü:

**Dr. Öğr. Üyesi ŞEBNEM EŞSİZ GÖKHAN**

Y. Dışı Danışmanı:

Timothy S. Carpenter

Bursiyerler:

Ayhan Demir

Melis Gencil

ARALIK 2018

İSTANBUL



## ÖNSÖZ

2018 Dünya Alzheimer Raporuna göre 50 milyon insan, demans rahatsızlığından muzdariptir ve bu sayının 2050'de üç kat artarak yaklaşık 152 milyona ulaşılacağı tahmin edilmektedir. 2018'de dünya çapında demansın tahmini toplam maliyeti 1 trilyon doları olduğu tespit edilirken, bu rakam 2030'a kadar 2 trilyon dolara yükseleceği düşünülmektedir. Bu veriler göz önüne alındığında bu hastalıkların tedavisinde daha etkin ve ucuz maliyetli ilaç molekülleri bulmanın önemi de ortaya çıkmaktadır. TÜBİTAK desteği ile tamamlanan bu projede nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynayan NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörünün hesaplamalı metotlar vasıtasıyla iyon iletimine kapalı ve açık hallerinin konformasyonel değişimleri hakkında bilgi elde edilmiştir. NMDA reseptörleri sinaptik aralığa salınan glutamat konsantrasyonu artması sonucu, reseptörlerinin aşırı uyarılması ile nöronları öldürücü bir eksitasyonla karşı karşıya bırakır. Bu tip nörodejenerasyon ve buna bağlı sinir hücre ölümleri demans tipi hastalıklar olan Alzheimer, Parkinson ve Huntington oluşumundaki temel mekanizmalardandır. Bu projeden elde edilen sonuçlar ise nörodejenerasyon için geliştirilmiş açık kanal inhibitörlerinin tasarım ve gelişimini kolaylaştıracaktır. Projeye desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	5
3.1 Homoloji ve Döngü Modellemesi .....	5
3.2 Elastik Network Analizi ve Moleküler Dinamik Simülasyonu .....	7
3.3 Temel Bileşen Analizi.....	9
4. BULGULAR.....	11
4.1 X-Ray Yapılarının Analizi ve Modelleme .....	11
4.2 Elastik Network Analizi.....	13
4.3 Moleküler Dinamik Simülasyon ve Sonuçları.....	14
4.4 Temel Bileşen Analiz Sonuçları (PCA).....	21
4.5 ATD Bölgesinde Yapısal Değişiklikler .....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR.....	30

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. NMDA reseptörün topolojisi .....	3
Şekil 2. Modeller programında sadece döngü modellenmesi ile amino asit skorlama grafiği ...	6
Şekil 3. Protein ve membranın su içerisine yerleştirilmiş hali .....	7
Şekil 4. A) 4TLM (sarı) ve B) 4PE5 (kırmızı) yapısının transmembran kısmının por profili ....	11
Şekil 5. Loop/Döngü yapıları içeren ve kesilip tetramer olarak modellenen yapılar .....	12
Şekil 6. Elastik network analizi.....	13
Şekil 7. A) Ligantın bağlanma bölgesinden kaçma yörüngesi. B) C $\alpha$ RMSD grafiği (apo kırmızı ile, halo yeşil ile gösterilmiştir).....	14
Şekil 8. Simülasyon için bakılan yapısal parametreler .....	15
Şekil 9. A) K216C mutasyon bölgesi.....	17
Şekil 10. A) LBD D1 ve D2 lobları arasındaki açı farkı GluN1 ve GluN2A zincirleri için grafiklerde gösterilmiştir. B) Alt tipler arasındaki M3/S2 linker mesafe değişimi .....	19
Şekil 11. Kanal yapısı analizi .....	20
Şekil 12. Tüm alt birimlerinin için apo ve halo simülasyonlarının korelasyon grafikleri .....	22
Şekil 13. PCA ilk modun her iki simülasyon için kirpi “porcupine” gösterimi .....	24
Şekil 14. A) GluN1 <sub>1</sub> -a3 ve GluN2A <sub>1</sub> -a2 ve B) GluN1 <sub>2</sub> -a3 ve GluN2A <sub>2</sub> -a2 helikslerinin kütle merkezleri arasındaki mesafe değişimi.....	25
Tablo 1. MD simülasyon protokolleri.....	8
Tablo 2. İlk 10 eigen değer PCA'daki tüm eigendeğerleri arasındaki yüzdelik katkısı.....	21



## ÖZET

Bu projenin amacı glutamat ve glisin nörotransmitterleri ile aktive olan tetramerik yapıdaki, ligant kapılı iyon kanalı ailesinin bir üyesi olan NMDA (N-metil-D-Aspartat) tipi glutamat reseptör iyon kanalının, iyon iletimine kapalı ve açık hallerinin hesaplamalı metotlar ile karakterize edilmesi üzerinedir. Projede bilgisayar bazlı sayısal metotlar kullanılarak reseptörde ligant bağlanması sonucu gerçekleşen lokal ve global hareketler hakkında bilgi elde edilmiştir. Projenin ilk basamağında NMDA reseptörünün yeni çözümlenmiş olan iki X-Ray yapısı baz alınıp, homoloji modellemesi yöntemi kullanılarak insan tipi NMDA modeli elde edilmiştir. Daha sonrasında proteinin dominant hareketlerini belirlemek için normal mod analizini kullanılmıştır. Proteinler dinamik bir sistem olduğundan sayısal benzetim yöntemi olan moleküler dinamik metoduyla ligant-olmayan ve ligant-bağlı iki sistem simüle edilmiştir. 1300 nanosaniye koşturulan sistemlerde ligant bağlandığı bölgede kapanmaya sebep olurken, bu hareketin bağlayıcılar tarafından iyon kanalına iletildiği gözlemlenmiştir. Bu simülasyonların sonucunda gözlemlediğimiz bir diğer etki ise, ligant bağlandığı bölgeyi daha stabil hale getirerek reseptörün diğer bölgelerinin etkileşimlerini artırmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** GluR reseptörleri, moleküler dinamik simülasyonları, Alzheimer hastalığı, normal mod analizi, nörotransmitter, iyon kanalı, membran proteini, protein yapı modellemesi,



## ABSTRACT

The aim of this project is to characterize structural states of the NMDA (N-methyl-D aspartate) type receptors by using computational methods. NMDA receptors are tetrameric family members of the ligand-gated ion channel family which is activated by glutamate and glycine. In this project, local and global motions of receptor upon ligand binding event is studied using computer based numerical methods. In the first step of the project, human type NMDA receptor structure is modeled by homology modeling based on two recent X-Ray structures of NMDA receptor. Since proteins are not static but dynamic entities in solution, ligand-free and ligand-bound systems are simulated in explicit water and lipid environment via 1300 nanoseconds molecular dynamics simulation. It is observed that ligand keeps two lobes of the ligand binding site together and this motion is reflected to ion channel through linkers which are connecting transmembrane segment of the protein to extracellular side. Also, ligand binding stabilized the ligand binding domain and enhanced interactions with other regions of the receptor.

**Key words:** GluR, molecular dynamics, normal mode analysis, Alzheimer's disease, neurotransmitter, ion channel proteins, membrane proteins, protein structure modeling



## 1. GİRİŞ

Bir proteinin çözelti içindeyken aldığı konformasyonlar ve bu konformasyonlar arasındaki geçişe sebep olan dinamik yollar, herhangi bir proteinin veya peptidin biyolojik işlevine bağlıdır. Proteinlerin hareketleri, ligantların bağlanması ve serbest bırakılması, diğer proteinlerle birleşme ve ayrışma aynı zamanda kimyasal reaksiyonların katalizi gibi kritik süreçlerde rol oynamaktadır. Proteinin yapısal bilginin ve dinamiğinin anlaşılmasıyla, proteinin biyolojik işlevini nasıl yerine getirdiği sorusunun çözümünde yardımcı olabilmektedir. Bu bilgi birikimi bilimsel arayışları daha ileriye taşıırken protein mühendisliği veya ilaç tasarımına yardımcı olabilmektedir. Bu çalışma da NMDA reseptörünün dinamiğini anlamak için hesaplama yöntemlerinin kullanımına odaklanmaktadır.

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, merkezi sinir sistemi boyunca dağılan bir ligant-kapılı iyon kanalıdır. AMPA ve kâinat reseptörlerini içeren iyonotropik glutamat reseptörleri familyasının bir üyesi olan NMDA, ismini selektif agonist olan N-metil-D-aspartattan almaktadır. Reseptör, iki NR1 alt birimi ve iki NR2 alt biriminden oluşan bir tetramer proteindir. Reseptöre glutamat ve glisin bağlanması ile beraber iyon kanalı açılır ve katyonlar (sinapta ağırlıklı olarak kalsiyum) hücre içine doğru kanal yardımıyla geçebilirler. NMDA reseptörü, sinaptik plastisite, öğrenme, motor koordinasyonu ve bellek açısından kritik bir rol oynamaktadır. Reseptörün fonksiyon bozukluğu epilepsi, inme, şizofreni, Parkinson, Huntington ve Alzheimer hastalığı gibi nörolojik rahatsızlıklara sebep olmaktadır (Gillissen vd., 2002). NMDA reseptör fonksiyonunun CNS deki geniş çaplı etkisi, yeni geliştirilecek olan tedaviler için reseptörü hedef haline getirmektedir.

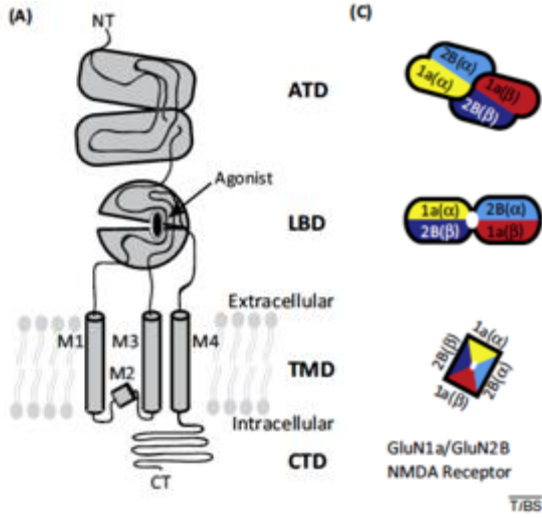
Bu projede reseptörü aktif hale getiren glutamat ve glisin molekülünün proteine nasıl bağlandığını ve reseptörün iyon iletimine açık ve kapalı halleri protein katlama metotları kullanarak saptamaya çalışılmıştır. Aynı zamanda, ligant bağlanmasının sonucu reseptörün hücrenin dışındaki kısmında meydana gelen değişimlerin, hücre membran kısmında bulunan kanala nasıl iletiltiğini incelenmiştir. İlk basamakta insan GluNR1/GluNR2A NMDAR reseptörünün membran içinde kapalı iyon kanalı hali, 2014 yılında tetramer halde çözümlenen 2 X-ray yapısı kullanarak "MODELLER" (Sali vd., 1995) programı kullanılarak modellenmiştir. Homoloji modellemesi deneysel olarak çözümlenen 3 boyutlu (3D) protein yapılarını baz alarak, hedeflenen proteinin 3D yapısını belirlemeye yardımcı bir hesaplamalı metottur. Modeller döngü yapıları olmadan yaratılmış ve en iyi model DOPE (Fiser ve Sali, 2003) skorlama yöntemiyle seçilmiştir. DOPE, homoloji modelini değerlendirmek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Model, "HOLE" (Smart vd., 1996) ve "PROCHECK" (Laskowski vd., 1993) programları kullanılarak valide edilmiştir. HOLE, kanalda ve kanalın membrana doğru yönünde önceden tanımlanmış noktaları baz alır ve kanalın başlangıç ve bitiş taraflarını analiz etmez. PROCHECK, proteinin rezidülerin açılarını ( $\phi$  ve  $\psi$  açıları) hesaplamak için



kullanılan bir yazılımdır ve bunların ramachandran grafiklerinin farklı bölgelerine göre dağılımını analiz etmektedir. Optimize edilen modele gerekli döngüler “ROSETTA” (Rohl vd., 2004) programı ile eklenmiştir. Protein fonksiyonunu düzenleyen yapısal varyasyonların dinamiklerini anlamak için elastik ağ analizi kullanılmıştır. Proteinin yavaş modaları hesaplanmıştır ve membranın varlığında en mümkün görülen iyon kanalı hareketleri incelenmiştir. Daha sonrasında 1300 nanosaniye (ns), ligant-olmayan (apo) ve ligant- bağlı (halo) iki sistem oluşturulmuş ve moleküler dinamik yöntemiyle simüle edilmiştir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ



Şekil 1. NMDA reseptörün topolojisi. 2GluN1 ve 2GluN2NB olmak üzere 4 subunit.

NMDA reseptörü membran dışında amino terminal bölgesi (ATD) ve ligant bağlanma bölgesi (LBD), hücre içinde ise transmembran bölgesi (TMD) ve karboksil terminal alanı (CTD) içeren 4 tane alt-üniteye sahiptir (Şekil 1). NMDA reseptörünün LBD (istiridye kabuğuna benzeyen) kısmına ligant bağlandığında aktive olur ve TMD bölgesi membran dışına doğru itirilir. Kanalin açılmasını sağlayan bu hareket katyonların membrandan hücre içine akmasını sağlar. Bu mekanizma “konformasyon dalga hareketi” olarak açıklanmıştır (Traynelis vd., 2010).

NMDA biyolojik mekanizmasının anlaşılması nörolojik hastalıkların tedavisi için önemlidir çünkü NMDA normal seviyede çalışmaları normal beyin fonksiyonları açısından hayati önem taşımaktadır. Fakat NMDA aşırı uyarılması ise nörolojik rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Bu yüzden bu proteinlerin açık kanal hali bloke edilmeli ve bu ilaçlar proteinlerin normal fonksiyon derecelerini koruyarak çalışmak zorundadır. Bu yüzden açık kanal yapısının kapalı kanal yapısından farklılıklarının anlamak çok önemlidir.

NMDA aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasındaki en temel engel glutamat molekülü bağlanmış iyon iletimine açık, aktif, bütün reseptör yapısının deneysel olarak bulunmamasıdır (Schmidt ve Hollmann, 2008). NMDA bir membran proteindir ve membran proteinlerinin X-Ray gibi deneysel yapı çalışmaları küresel proteinlere göre daha zordur. 2014 yılına kadar tüm protein X-ray yapısı bilinen tek glutamat reseptörü AMPA idi (Sobolevsky vd., 2009). 2014 yılında yapılan çalışmalar sayesinde 2 tane heterotetramer NMDA reseptörü çözümlenmiştir (Karakas ve Furukawa, 2014; Lee vd., 2014). Bu yapılardan biri 4 Angström ve diğeri ise 3.7 Angström civarında çözümlenmiştir. İki yapıda LBD bölgesinde glutamat ve glisin, ATD bölgesinde ise modülatör içermesine rağmen inaktif haldedirler. Aynı zamanda iki proteinde sekansında bulunan döngüler esneklikleri yüzünden X-ray yapısında çözümlenmemiştir. Bir diğer problem ise X-ray çalışmaları sırasında protein üzerinde gerçekleştirilen mutasyonlar proteinin yapısını da etkilemektedir. Kurbağa üzerinden modellenen yapıda TMD daha düzgün çözümlenirken, fare modelinde ise TMD bazı heliks kısımları eksiktir. Bu açıdan modelleme

yaparken dikkatli çalışılmış mutasyonlar ve loop kısımlarında etkin modelleme metotlarından faydalanılmıştır.

Bütün reseptör yapısının aksine, reseptörün izole edilmiş kapalı ve açık LBD X-Ray yapıları mevcuttur (Furukawa ve Gouaux, 2003; Furukawa vd., 2005). ATD kısmi için de izole edilmiş farklı agonist/antagonist bağlanmış hallerde bulunan birçok X-Ray yapısı mevcuttur (Karakas vd., 2009; Karakas vd., 2011). LBD için ligant seçiciliği (Lau ve Roux, 2011), yarı-etken agonist aktivitesi (Postila vd., 2011) ve agonist tarafından tetiklenen LBD iki lobunun kapanması üzerine (Dravid vd., 2010; Frydenvang vd., 2009) çalışılmış moleküler dinamik simülasyon çalışmaları bulunmaktadır. Bunlara ek olarak glutamatın GluR2 LBD kısmına bağlanmasında, hangi amino asitlerin etkin olduğu gösteren araştırmalarda bulunmaktadır (Okada vd., 2012). Ayrıca kısmi agonistlerin LBD bi-lob yapısının (clamshell, Şekil 1) kapanma derecesinde, AMPA reseptörlerinin aksine, NMDA reseptör yapılarında tam-agonist kadar etkin olabildikleri gösteren simülasyon çalışmaları da yürütülmüştür.

ATD bölgesi ile ilgili yapısal araştırmalar bu proje önerisinden beri çok hızlanmıştır. NMDA reseptöründe ATD bölgesi, AMPA ve kainate reseptörlerine göre farklı bir rol üstlenmiştir. ATD kısmi NMDA reseptöründe kanalın aktivasyonuna direk olarak etki edebilirken, AMPA ve kainate reseptörlerde iyon kanalı aktivasyonunda belirgin bir rolü yoktur (Dutta vd., 2012). Son yapılan yapısal çalışmalarda GluN1/GluN2B NMDA reseptörlerinin, farklı ATD bölgesi için ligant kombinasyonları ile stabilize edilmiş, çeşitli fonksiyonel durumlardaki konformasyonel hareketine odaklanılmıştır (Karakas ve Furukawa, 2014; Lee vd., 2014; Tajima vd., 2016; Zhu vd., 2016).

Çalışmamızda kullandığımız reseptör, GluN1 ve GluN2A alt tiplerinden oluşan heterotetramer yapıdadır. 2014 yılında çözümlenen, ATD bölgelerinde allosteric inhibitör içeren, GluN1/GluN2B yapıları kullanılarak modellenmiştir (Karakas ve Furukawa, 2014; Lee vd., 2014). Lee ve arkadaşlarının çözümlendiği yapıda (Lee vd., 2014) Ro25-6981 inhibitörü bağlı iken, Furukawa ve arkadaşlarının çözümledikleri X-Ray yapısında (Karakas ve Furukawa, 2014) yine bir allosterik inhibitör olan ifenprodil bağlıdır. İfenprodil ve Ro25-6981 bileşikleri, GluN1/GluN2B ATD ara yüzüne bağlanmaktadır (Karakas ve Furukawa, 2014; Karakas vd., 2011; Lee vd., 2014).

LRET kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise çinko ve ifenprodil benzer konformasyon değişikliklerine sebep olarak, NMDA reseptörlerini inhibe ettikleri öne sürülmüştür (Sirrieh vd., 2015). Yapılan çalışmalarda, ifenprodilin NMDA reseptörüne bağlandığında GluN1 ATD'nin genel konformasyonunu etkilemezken, GluN2 ATD'nin üst ve alt loblarının arasındaki mesafede azalma saptanmıştır (Sirrieh vd., 2015). ATD bölgesi ile ilgili bu çalışmalar bu



projenin İP 8 ve İP 9 etkiledi. ATD bölgesine sadece bir bölgeden değil iki farklı bağlanma bölgesinden incelenmesi gerçekleştirildi.

Ek olarak 2018 yapılan bir çalışmada MK-801 ve memantin NMDA iyon kanallarını nasıl bloke edildiği moleküler dinamik yöntemiyle çalışılmıştır. MK-801 ve memantin moleküllerini TMD vestibülüne bağlanıp, iyon kanalını fiziki olarak tıkamaktadırlar. M3-helix tarafından oluşturulan iyon kanal kapısının kapatılmasıyla, kanal bloke olmaktadır. Bu çalışmada ATD kısmı kesilerek protein kristalize edildiğinde, proteinin aktif yapısından başka simetride bir TMD/LBD yapısı elde edilmiştir. Bu çok yüksek kristal veren, ama fizyolojik önemi tartışmalı ATD içermeyen bir yapıdır (Song vd., 2018).

ATD bölgesi için yapılan bu yeni çalışmalar ile bu projede ATD bölgesine dok edilecek moleküller üzerindeki çalışmamızı etkiledi.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

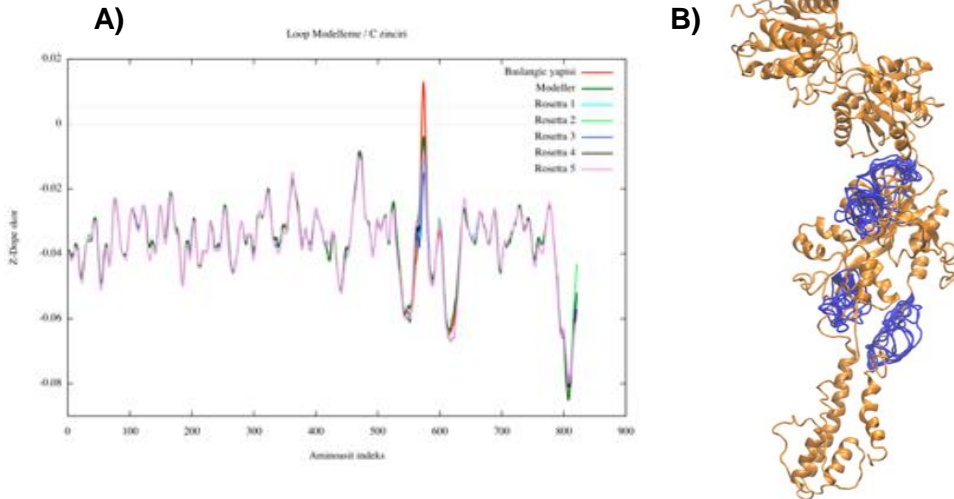
#### 3.1 Homoloji ve Döngü Modellemesi

ClustalW çoklu sekanslama programı (Thompson vd., 1994) kullanılarak, GluN1/GluNR2A insan sekansları ve 4TLM ve 4PE5 X-Ray sekansları hizalanmıştır. (**Ek 1**'de her bir zincir için hizalama sonuçları bulunmaktadır.) Elde edilen hizalama MODELLER (Fiser ve Sali, 2003) programı yardımıyla homoloji modellemesi için kullanıldı. Homoloji modellemesi kıyaslamalı bir protein modelleme tekniğidir. Şablon yapı ve girdi sekansı hizalandıktan sonra Modeller programı şablon yapıdan elde ettiği geometrik ve kimyasal kısıtların sağlanması üzerine kurulmuş bir fonksiyonu optimize ederek girdi yapısı için model oluşturur. Ek olarak şablon yapılarda bulunmayan döngü yapıları için ROSETTA (Rohl vd., 2004) ve MODELLER (Sali vd., 1995) programları birlikte kullanıldı. MODELLER şablondan modelleme yaparken, ROSETTA ise "ab-initio" yani şablonsuz modelleme konusunda bu alanda altın standart olarak kabul edilen protein modelleme programlarıdır. ROSETTA şablonda var olmayan döngü kısımları için daha küçük fragmentlerden oluşan bir kütüphane kullanır. Daha sonra bu fragmentlerin yardımıyla iki kopuk kısım birbirine sistematik konformasyonel arama ile optimize edilerek bağlanır.

Bu projede homoloji modellemesi için iki farklı strateji test edildi; tetramer olarak modelleme, tek tek monomerleri modelleyerek simetri operasyonları ile tetramer yapıyı elde etme. Monomer olarak modelleme yapıldığında, problem daha küçük olduğundan ve optimizasyon tekniği küçük sistemde daha iyi çalıştığı için daha iyi kalitede modeller oluşmasına rağmen, zincirler birbirleriyle tetramer olarak etkileşimi bu tip modellemede dışarda bırakılmış olur. Dolayısıyla, tetramer olarak modelleme de, komşu atomların optimizasyonunu daha titizlikle

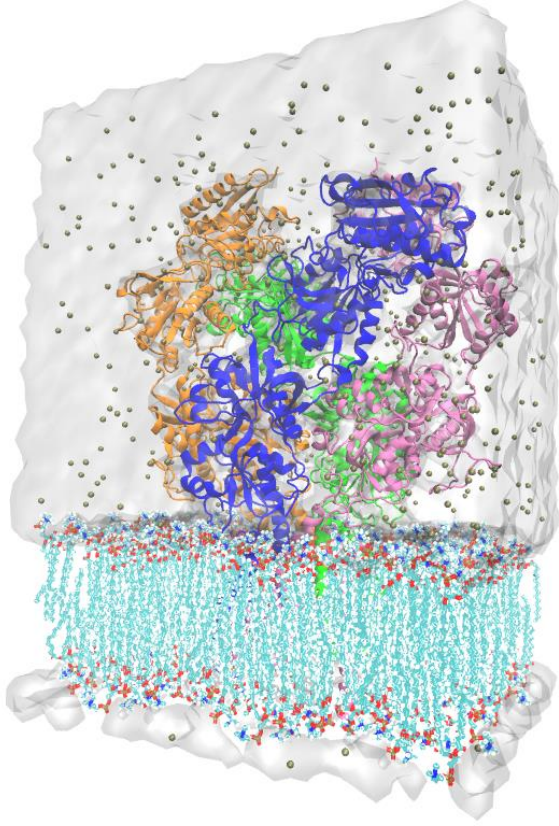
karakterize edildiği için daha doğru görünmektedir. Bu iki stratejiyi kullanarak MODELLER programı ile 100 model üretildi. Tetramer olarak elde edilen yapıdan daha iyi skor elde edildiği için bu modelin kullanılmasına karar verildi.

Daha sonra bu modelde X-Ray yapısında bulunmayan loop/döngü yapıları kesilerek modelleme yapıldı. Bu da transmembran kısımlarını birbirine bağlayan 2 döngü ve amino terminal bölgesi ile ligant bağlanma bölgesi arasındaki bir döngüdür. Bu basamakta proteinin diğer kısımları sabit tutuldu ve Rosetta ve MODELLER' dan elde edilen tüm döngü yapıları yine MODELLER 'ın skorlama fonksiyonu ile değerlendirilerek tüm sistem için en iyi model oluşturuldu. Şekil 2' de bu modelleme stratejisi ile C zincirinden modellenen iki döngü/loop yapısının MODELLER loop refinement ve ROSETTA sonuçları gösterilmiştir. Bu grafikte x eksenini aminoasit indeksi, y eksenini ise DOPE MODELLER' ın skorlama fonksiyonudur. Farklılık sadece loop/döngü bölgesinde görülür. En düşük skor en iyi modeli göstermektedir. Aynı şekilde her bir zincir için modelleme Rosetta ile tamamlanıp MODELLER' ın skorlama fonksiyonu ile tekrar değerlendirilerek tüm loop yapıları elde edilmiştir. Ek olarak, DOPE skorlama yöntemi ile seçilen modeller PROCHECK (Laskowski vd., 1993) programı ile incelenmiştir. Bu metot ile elde edilen yapının analizlerine bulgular kısmında tekrar değinilecektir.



Şekil 2. Modeller programında sadece döngü modellemesi ile amino asit skorlama grafiği. A) Kırmızı (Başlangıç yapısı), Mavi (Rosetta ile elde edilen en iyi döngü yapısı), Koyu yeşil (MODELLER ile elde edilen döngü yapısı) B) C zinciri üzerinde modellenen en iyi 20 döngü yapısı mavi ile gösterilmiştir.

### 3.2 Elastik Network Analizi ve Moleküler Dinamik Simülasyonu



Şekil 3. Protein ve membranın su içerisine yerleştirilmiş hali. Dış kısımdaki beyaz yüzey gösterimi suyu ifade etmektedir. Sistemdeki sodyum iyonları küçük toplarla gösterilmiştir.

MD simülasyonu için ligant-olmayan (apo) ve ligant-bağlı (halo) iki sistem hazırlanmıştır. Sistemler hazırlanırken MD simülasyonu için önem taşıyan birbirine yakın sistemin rezidüleri arasındaki disülfid köprüleri yaratılmıştır. X-ray yapısında önerilen rezidüleri arasındaki disülfid köprülerinin tamamı sisteme uygulanmıştır. Histidin (HIS) ve diğer yüklü rezidüleri (GLU, ASP, LYS ve ARG) protonasyon durumları PROPKA (Olsson vd., 2011) web sunucusu tarafından belirlendi. Her iki model de dengelenmemiş bir membranın (POPC) içine yerleştirildi ve TIP3P su molekülleri ile çözülmüştür. Sistemlerin içine Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonları eklenerek sistemler nötralize edilmiştir. Sonunda, yaklaşık 230.000 atomdan oluşan bir sistem elde edilmiştir (Şekil 3).

Ardından iki sistem için simülasyonlar başlatılmıştır. Protokol 1 de sırasıyla 2 pikosaniye (ps) minimizasyon ve 2 ns MD olacak şekilde 300 K sabit sıcaklıkta ve sabit hacimde ve 2 femtosaniye (fs) adım aralığı kullanılarak lipit kuyukları eritilmiştir. İkinci basamakta sadece

NMDA reseptörü esnek bir protein olup birden fazla geçiş konfirmasyonu vardır. Bu yüzden ilk olarak Proteinin dominant hareketlerini tahmin etmek için elastik network analizi metodunu kullandık. Bu analizde protein sadece alfa karbon atomları tarafından temsil edilmektedir. Potansiyel enerji fonksiyonu 20 Angströmden yakın her bir alfa karbon atomu birbirine harmonik yay ile bağlanır. Daha sonra oluşturulan kuvvet sabiti matrisi diagonalize edilerek eigen değer ve vektörler hesaplanır. Biz de 4TLM yapısının geometrik olarak minimize olmuş haline alarak bu analizi kendi kodumuz ile gerçekleştirdik. Proteinin büyüklüğü açısından bir web programını kullanmayı uygun görmedik. Buradan elde ettiğimiz ilk 20 mod detaylı olarak incelemeye alınmıştır.

Daha sonrasında homoloji modellenen yapıya agonist ve co-agonistler dok edildi.



protein atomlarına harmonik kısıt uygulanarak (sırasıyla 1, 0.5 ve 0.25 kcal / mol / Å<sup>2</sup>), sırasıyla 2 ps minimizasyon ve 2 ns MD simülasyonu 300 K sabit sıcaklıkta ve 1 atm sabit basınç altında koşurulmuştur. Ardından üçüncü basamakta, protein atomlarının üzerindeki kısıt tamamen kaldırılarak bütün sistem atomları serbest haldeyken, sistem basınç (1 atm) ve sıcaklık (310 K) sabit tutularak (NPT) 5 ns koşurulmuştur. Sonrasında ise basınç (1 atm), sıcaklık (310 K) ve ek olarak lipid alanı da sabit tutularak birbirinin devamı olan 5 ns'lik 50 simülasyon (toplamda 350 ns) koşurulmuştur.

Tablo 1'de ilk simülasyonlarımızı hangi basamaklar halinde tamamladığımız Protokol 1 ile gösterilmiştir. Lipid simülasyonları için GridMAT-MD (Allen vd., 2009) programı kullanılarak lipid başına düşen alan ve lipid katmanının kalınlığı simülasyon boyunca gözlemlenmiştir.

Tablo 1. MD simülasyon protokolleri

	<b>Protokol 1</b>	<b>Protokol 2</b>
1.Basamak (Lipit Kuyruklarının Dengelenmesi)	Minimizasyon: 2 ps MD: 2 ns Lipit kuyrukları hariç bütün atomlar sabit	Minimizasyon: 2 ps MD: 2 ns Lipit kuyrukları hariç bütün atomlar sabit
2.Basamak (Protein Kısıtlı)	Minimizasyon: 2ps, MD: 1 ns Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 1 kcal/mol/Å <sup>2</sup> MD: 0.5 ns Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 0.5 kcal/mol/Å <sup>2</sup> MD: 0.5 ns Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 0.25 kcal/mol/Å <sup>2</sup>	Minimizasyon: 2ps, MD: 2 ns Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 1 kcal/mol/Å <sup>2</sup> MD: 2 ns Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 0.75 kcal/mol/Å <sup>2</sup> MD: 2 ns Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 0.5 kcal/mol/Å <sup>2</sup> MD: 2 ns

		Protein atomları üzerindeki yay sabiti: 0.25 kcal/mol/Å <sup>2</sup>
3.Basamak (Protein Serbest)	MD: 5 ns NPT sistem, Lipit Alanı Değişken	MD: 5 ns NPT sistem, Lipit Alanı Değişken
4.Basamak (Protein Serbest)	MD: 5 ns x 70 = 350 ns NPT sistem, Lipit Alanı Sabit	MD: 5 ns x 260 = 1300 ns NPT sistem, Lipit Alanı Sabit

Protokol 1 kullanırken ligantlardan birinin bağlanma bölgesinde çıktığı görülmüştür. Bu sorunu çözmek için ligantın bağlama pozunu en iyi skorlanan poz değil X-ray yapısındaki poz benzeyen olarak alınarak ve simülasyonlar yeniden protokol 2 'de özetlendiği gibi kısıtları daha uzun süre tutarak tekrar başlatılmıştır.

Tüm Moleküler Dinamik simülasyonlar, bağlanmamış bir vdW kesikli 12 Å ve CHARMM (Feller ve MacKerell, 2000) (lipid ve protein için v27) kuvvet alanı ile NAMD (Phillips vd., 2005) programı kullanılarak yapılmıştır. Partikül ağı Ewald elektrostatik ayarları her iki sisteme uygulanırken, kısıtlı hidrojen atomları için SHAKE algoritması kullanılmıştır. Her iki simülasyon da 300ns sonra dengeye ulaşmaktadır. Bu yüzden kalan 1000ns analiz için kullanılmıştır. **Bütün moleküler dinamik simülasyonları Lawrence Livermore National Laboratory süper bilgisayar merkezinde 1024 çekirdek kullanarak yürütülmüştür.**

### 3.3 Temel Bileşen Analizi

Moleküler dinamik simülasyonları sonucunda büyük datalar (MD yörüngeleri) elde edilmektedir. Büyük ve fazla miktarda olan verilerin boyutlarını azaltarak daha küçük veriler ile temsil edilmesini sağlayan temel bileşen analizi (PCA), MD "trajektorilerinin" analizi için uygun bir yöntemdir. İlk olarak, yörüngede bulunan her konformasyonunun, referans yapı ile üst üste hizalanması gerekmektedir. Ardından, her konformasyonun ortalama yapıdan sapmaları hesaplanarak, kovaryans matrisini ( $C$ ) oluşturulur (Denklem 1).  $N$  atomu bulunan bir sistemin matris boyutu  $3N \times 3N$  olarak hesaplanır. Son olarak, matrislerin diyagonalize edilmesi ile  $3N'$  ye ait eigen değerler ve eigen vektörler elde edilir.

AMBER yazılımının PTRAJ programı kullanılarak, MD “trajektorileri” için PCA uygulandı (Case vd., 2005). Kovaryans matrisini ( $C$ ) denklem 1 kullanılarak hesaplandı.  $X_i$  ve  $X_j'$ ,  $i$  ve  $j$  rezidülerinin atom koordinatlarını ifade etmektedir.

$$C_{ij} = \langle (X_i - \langle X_i \rangle) \cdot (X_j - \langle X_j \rangle) \rangle \quad \text{Denklem 1}$$

$P$  eigen vektörleri,  $\Delta$  ise eşleşen eigen değerleri bulduran diagonal matrisi ifade etmektedir (Denklem 2).

$$C = P\Delta P^T$$

Denklem 2

Sistemin korelasyon analizi Denklem 3. ile yapıldı.  $U$  değeri, eigen vektörlerin matrisini,  $\Omega$  değeri ise eigen değerlerin diyagonaliz matrisini ifade etmektedir. Korelasyon haritaları, proteinin farklı kısımları arasındaki hareketin korelasyonunu göstermektedir.

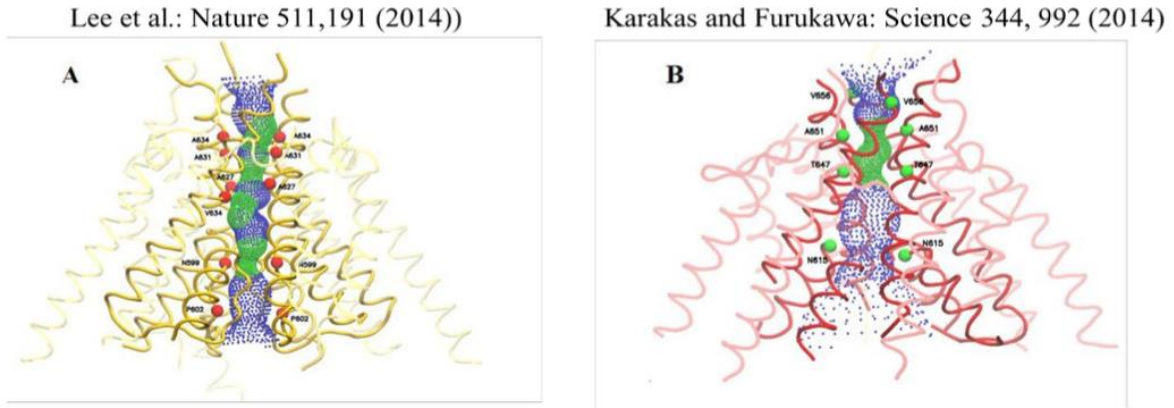
$$C_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^{10} \frac{U_{il}U_{jl}}{\Omega_{ll}}}{\left(\sum_{m=1}^{10} \frac{U_{im}U_{jm}}{\Omega_{mm}}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\sum_{n=1}^{10} \frac{U_{in}U_{jn}}{\Omega_{nn}}\right)^{\frac{1}{2}}} \quad \text{Denklem 3}$$



## 4. BULGULAR

### 4.1 X-Ray Yapılarının Analizi ve Modelleme

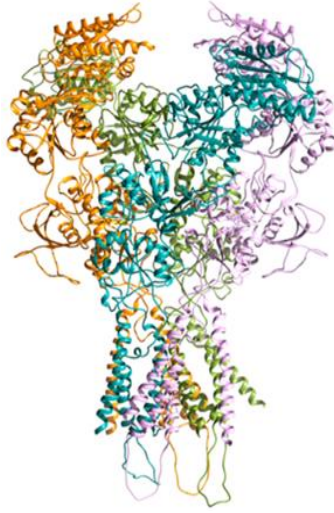
2014 yılında, iki tane bütün NMDAR X-RAY yapısı 4 ve 3,7 Angström olarak çözülmüş, bunlardan biri Science (Karakas ve Furukawa, 2014) ve diğeri Nature (Lee vd., 2014) dergilerinde yayınlanmıştır. İnsan NMDA reseptörü ile kurbağadan elde edilen X-Ray yapısı (4TLM) sekans özdeşliği, insan NR1 ve NR2A ile %92 ve %81 civarında, fareden elde edilen yapıda (4PE5) ise, her iki zincir için de %98 civarındadır. Bu projede öncelikli olarak bu yapılar incelenmiştir. Fare yapısı sekans benzerliği daha fazla olmasına rağmen iyon kanalı için gerekli olan M2-M1 bağlayıcı, fare yapısında çözümlenmemiştir. Aynı zamanda 4PE5 yapısında TMD de ikinci dar bölge gözlemlenememiştir (Şekil 4). Analizlerimizin sonucu olarak TMD yapısının daha detaylı ve eksiksiz gösterilmesi nedeniyle 4TLM yapısı şablon olarak seçilmiştir.



Şekil 4. A) 4TLM (sarı) ve B) 4PE5 (kırmızı) yapısının transmembran kısmının por profili. Bu grafikler HOLE programı ile yaratılmıştır (Smart vd., 1996).

Reseptörle şablon (4TLM) sekans benzerliğini yüksek olmasına rağmen proteinin büyüklüğü ve bazı döngü/loop yapılarının X-Ray yapısında çözümlenmemiş olması modellemede bazı sorunlar yaratmıştır. Bu yüzden homoloji modellemesi için tetramer halinde ve monomer halinde olmak üzere iki farklı yol izlenmiştir. Fakat tetramer halde modellendiğinde dihedral açı kombinasyonları %77 iken monomer halinde her bir zincir için ortalama olarak %86 olmaktadır. Bu yüzden ikinci bir plan olarak insan yapısı tetramer halinde, X-ray yapısında bulunmayan loop/döngü kısımları kesilerek modellenmiştir. Loop/Döngü yapıları ile elde edilen modeldeki Z-Dope skoruna göre daha iyi bir skorda model elde edilmiştir. Aynı zamanda Ramachandran grafiklerinde izin verilen dihedral açı kombinasyon bölgelerinde bulunan amino asit yüzdesi model için %90'a çıkmıştır (Şekil 5). Daha sonra bu tetramer halinde modellenmiş yapıya

loop/döngü yapıları eklendikten sonra, modelin izin verilen açılar bölgesindeki açı yüzdesi %89 olup, “ek olarak izin verilen bölgeler” %7,9 olarak hesaplanmıştır (Son modelin Ramachandran grafikleri, 3. Gelişme Raporu Şekil 1’de detaylı olarak gösterilmiştir). Bu model kullanılarak simülasyon kısmına geçildi.



**Döngülü model**

**Z-Dope sonuçları = 1.06**

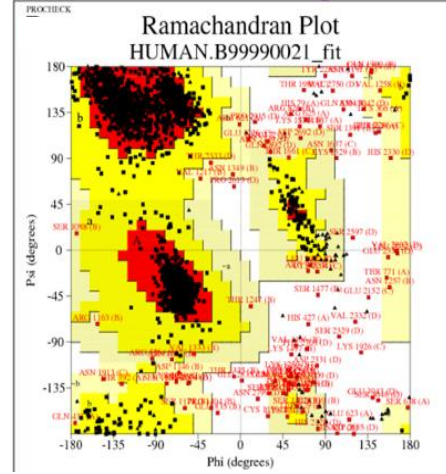
**Procheck sonuçları = 77%**



**Döngüsüz model**

**Z-Dope sonuçları = -0.3**

**Procheck sonuçları = 90%**



**Döngüsüz**

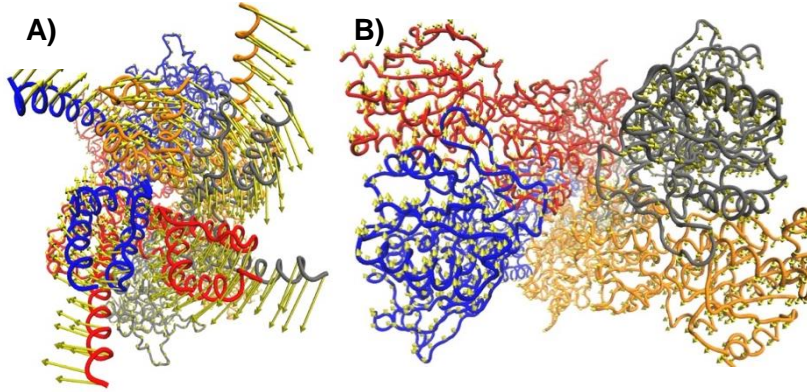
**Modelin**

**Ramachandran Grafiği**

Şekil 5. Loop/Döngü yapıları içeren ve kesilip tetramer olarak modellenen yapılar.

## 4.2 Elastik Network Analizi

Elastik network analizi sonucu alınan 20 moddan bizim için önemli olan hangisinin TMD girdle kısmının açabildiğidir. Bu modların içinde en dikkat çekici olan üçüncü en yavaş **Mod 3** olmuştur (Şekil 6 ve Ek 2 mpg video). Bu modda hem TMD üst bölgesi hem de alt bölgesi açıldığı gözlemlenmektedir. Bu açılmanın diğer bölgeler ile korelasyonuna baktığımızda ise LBD kısmında açılışta bir kapanma ve M3-TMD linker bölgesinde bir uzama gözlemlenmektedir. Bu mod iyon kanalının açılması için uygundur. Sonuç olarak her iki girdle 'in açılmasını sağlayan, LBD de kapanma ve M3-TMD linker uzaması hareketleri ilintilidir. Ayrıca bu moda TMD kısmından bakıldığında kanal eksenini boyunca bir dönme hareketi gözlemlenirken, ATD ve LBD kısımları beraber hareket ederek aynı ekseninde ama ters yönde bir hareket yapmaktadırlar. Şekildeki sarı oklar bu mod hareketinin yönünü göstermektedirler.

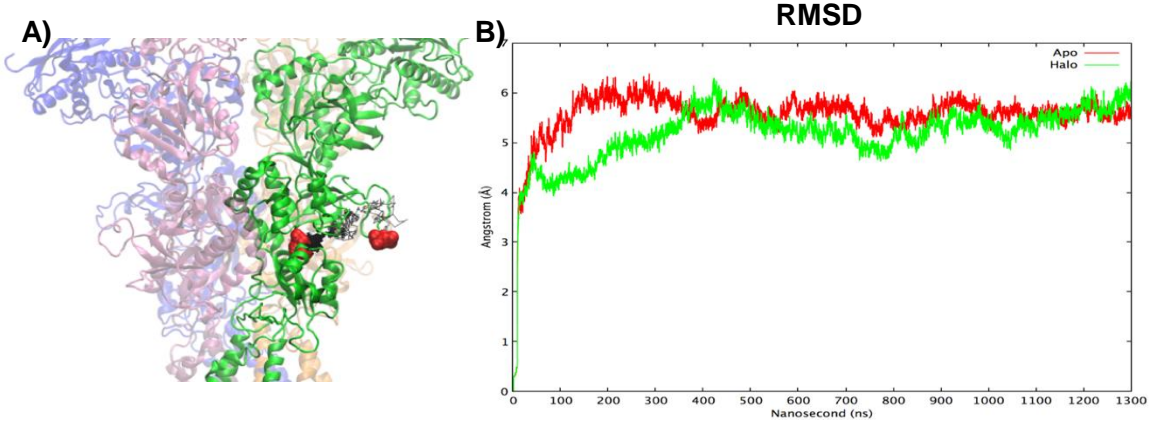


Şekil 6. Elastik network analizi 3. Mod A) alttan iyon kanalı bölgesinden görüntü. B) ATD yani üst taraftan görüntü.

Kanalın açılması için mümkün görünen ikinci mod ise **Mod 9** olarak tespit edilmiştir. Mod 9 ise aynı Mod 3 gibi, TMD iki dar bölgesi, LDB ve M3-TMD döngüleri arasında korelasyon vardır. Söyle ki, bu mod kanal eksenini boyunca bir nefes alma hareketi ya da genişleme hareketi olarak düşünülebilir. Biz bu modları incelerken iyon kanalının membran boyunca uzanması dolayısıyla, hareketlerin membranı penetre edemeyeceklerini düşünerek seçmeye çalıştık. Mod 9 da genişleme kanal eksenini boyunca olduğu için olası bir harekettir. 2015 yılında Ivet Bahar ve arkadaşları (Dutta vd., 2015) tarafından benzer bir analiz AMPA ve NMDA reseptörlerin elastik modları üzerine yapıldı. Fakat bu modlarda, kanal açılması üzerine çalışılmamıştır. **Ek 2'de** sağlanan mpg videolarında olarak yukarıda bahsedilen mod 3 ve mod 9 hareketleri gösterilmiştir.

### 4.3 Moleküler Dinamik Simülasyon ve Sonuçları

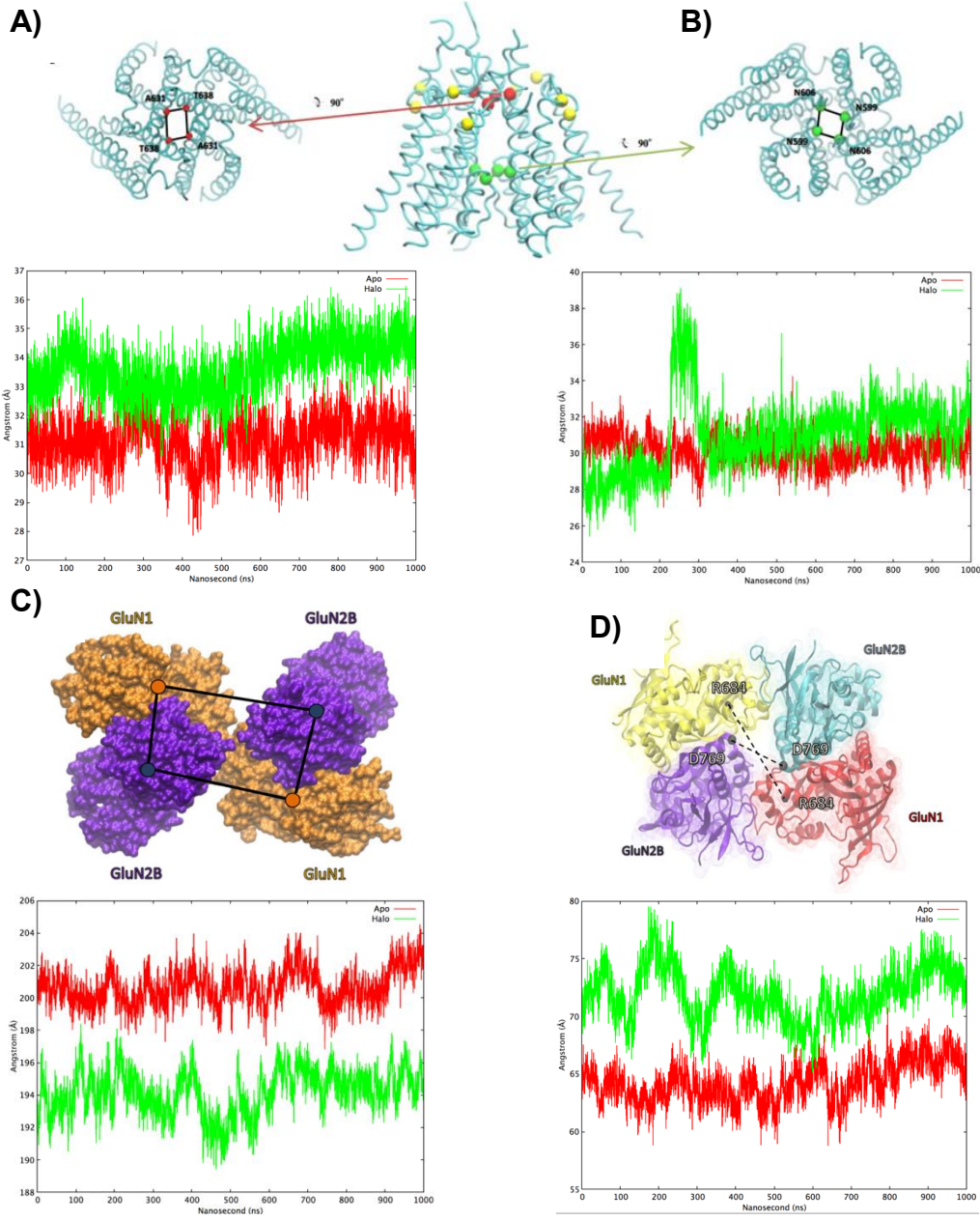
Yöntem kısmında Protokol 1 uygulanan halo simülasyonunda 80 ns civarında, RMSD değerinde bir zıplama olduğu gözlemlenmiştir. Yörünge incelendiğinde liganın bağlandığı yerden çıktığı görülmektedir (Şekil 7 A). Bu sorunu çözmek için molekülünün oryantasyonu değiştirilmiş (X-ray yapısındaki oryantasyon alınmıştır) ve Protokol 2 kullanılarak yeni simülasyonlara başlanmıştır.



Şekil 7. A) Ligantın bağlanma bölgesinden kaçma yörüngesi. B) C $\alpha$  RMSD grafiği (apo kırmızı ile, halo yeşil ile gösterilmiştir).

Bu projede halo ve apo simülasyonlar için 1300 ns tamamlanmıştır. RMSD grafikleri Şekil 7 B gösterilmiştir. Sonrasında 300 ns olarak alınan dengeleme süresi atıldıktan sonra, 1000 ns olan simülasyon yörüngeleri incelemeye başlandı. Bu bölümdeki bulgular bu “trajektori” analizinden elde edilmiştir.

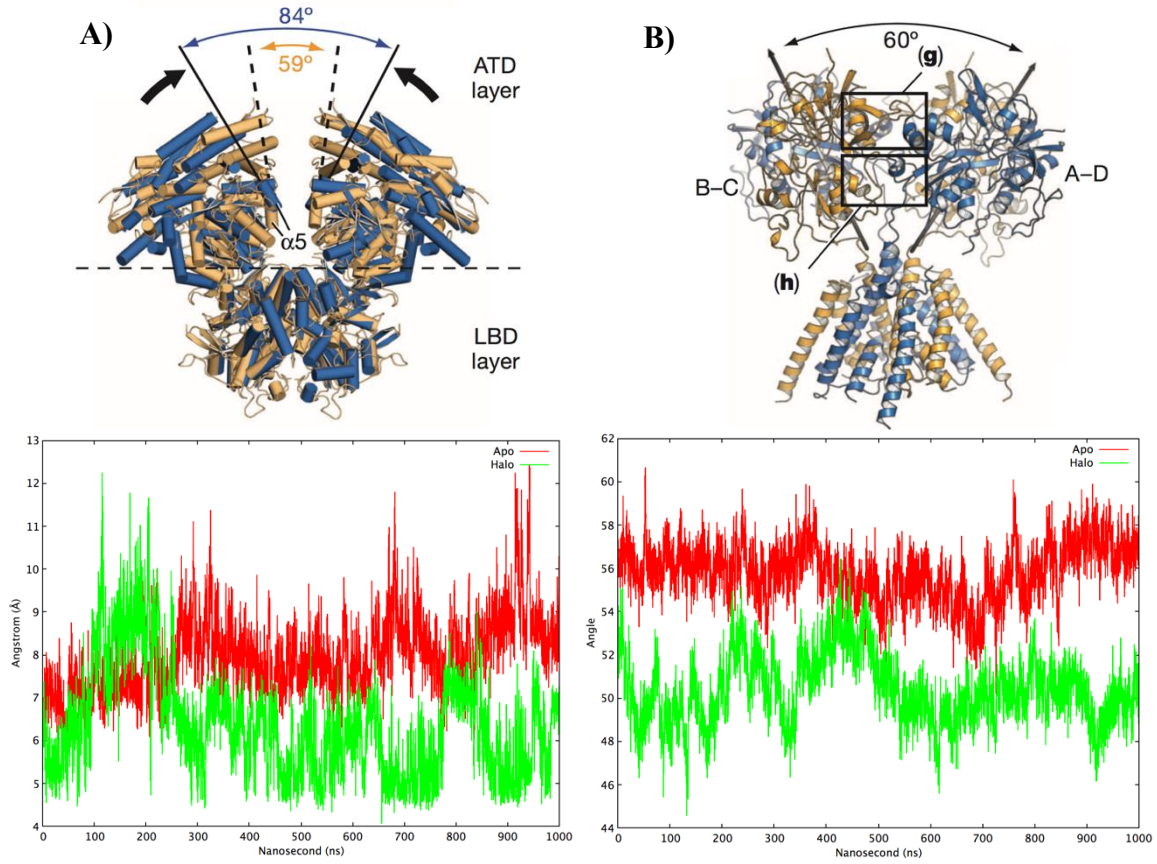




Şekil 8. Simülasyon için bakılan yapısal parametreler A) Transmembran bölgesinin “tube” representasyonu ile Z ekseninden 90° döndürülerek üstten ve (B) alttan görünümü. Üst kısımda bulunan dar bölgeyi oluşturan rezidüler kırmızı toplarla, alt kısımdaki dar bölgeyi oluşturan rezidüler yeşil toplarla gösterilmiştir. Bu uzaklıkların apo (kırmızı) ve halo (yeşil) simülasyonları değişiminin grafikleri gösterilmiştir. (C) Amino terminal bölgesindeki GluN1 ve GluN2A zincirlerden seçilen ağırlık merkezleri turuncu ve mavi dairelerle gösterilmiştir. Altında bu noktalar arasındaki uzaklıkların değişimini gösteren grafik apo (kırmızı) ve halo (yeşil) simülasyonları için çizilmiştir. (D) Ligant bağlanma bölgesi üzerinden seçilen rezidüler arası ölçülen uzaklıkların değişimini gösteren grafik apo (kırmızı) ve halo (yeşil) simülasyon için çizilmiştir.

İlk olarak iyon kanalı boyunca değişiklikler incelendi. İyon kanalında üst ve alt olmak üzere iyon geçişini kontrol eden iki kapı bulunmaktadır. Şekil 8'deki grafiklerde yeşil çizgi ile halo, kırmızı ile ise apo simülasyon boyunca bu dar bölgelerdeki değişimler gösterilmiştir. İyon kanalı M1, M2, M3 ve M4 olarak adlandırılan 4 tane hidrofobik heliksten oluşmaktadır. Grafiklerde görüldüğü gibi üstteki dar bölge halo yapıda 33-34 Ångstrom'da seyrederken, apo simülasyonda 31 Ångstrom değerlerinde seyretmektedir (Şekil 8A). Altteki dar bölge ise apo ve halo simülasyonlarda benzer değerler gösterirken, halo simülasyonda bu bölge yaklaşık bir 200-300 ns zaman aralığında açılmaktadır (Şekil 8B).

Şekil 8C'de amino terminal kısmındaki (ATD) hareketleri izlemek için her zincirdeki ATD'lerin ayrı ayrı ağırlık merkezleri hesaplanmış ve bu ağırlık merkezleri arasındaki uzaklıkların toplamlarının grafiği çizilmiştir. Amino terminal kısmında apo simülasyonda daha geniş bir çap gözlemlenirken, halo simülasyonundan bu çap daha küçük kalmıştır. Şekil 8D'de ise ligant bağlanma bölgesindeki (LBD) değişimler için her zincir üzerinden literatürde belirlenmiş rezidüler (Lee vd., 2014) seçilmiş ve karşılıklı zincirlerdeki rezidülerin aralarındaki uzaklıklar ölçülmüştür. Şekilde LBD üzerinden seçilen rezidüler siyah toplarla, karşılıklı zincirlerdeki rezidüler arası ölçülen uzaklıklar kesikli çizgilerle gösterilmiştir. Apo simülasyonunda LBD çapraz mesafesi (Şekil 8D'de kırmızı çizgi ile gösterilmiştir) 65 Ångstrom civarlarında seyretmektedir. Halo simülasyonunda ise (Şekil 8 D'de yeşil çizgi ile gösterilmiştir) yaklaşık 70 Ångstrom civarlarında başlamış 200 ns sonra 80 Ångstrom çıkmıştır. Daha sonra ise 75 Ångstrom civarlarında dalgalanmaya devam etmiştir. Apo simülasyonundaki bu parametre halo simülasyonuna kıyasla daha az dalgalı görünmektedir ve apo'da mesafe çoğunlukla düşük kalmıştır; bu, LBD kısımlarının daha kompakt bir yapıya sahip olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 9. A) K216C mutasyon bölgesi. ATD ve lizin rezidülerinin arasındaki mesafe “cartoon” çizim yöntemiyle gösterilmiştir. B) LBD aralık açısı. LBD ve TMD’nin “cartoon” gösterimi. Oklar, LBD heterodimerlerinin “two-fold” eksenini temsil etmektedir. Eksenler arasındaki açı değişimi “cartoon” çizimiyle gösterilmiştir.

Gözlemlenen bir başka parametre ATD alt birimlerindeki lizin rezidüleri (997/GluN2A<sub>1</sub> ve 2586/GluN2A<sub>2</sub>) arasındaki mesafelerdir. 4TLM yapısı kristalize edilirken bu lizin rezidüleri sistein rezidüleriyle değiştirilerek disülfid bağı yapması sağlanmıştır (Lee vd., 2014). Bu rezidüerin atomları arasındaki mesafe şekil 9A da grafiğe dökülmüştür. Halo simülasyonunda mesafe, 200 ns' ye kadar 12Å kadar dalgalanmıştır ve ardından yörüngenin geri kalanı için 5Å düşmüştür. 250 ns' den sonra apo simülasyonunda (Şekil 9A da kırmızı çizgi ile gösterilen) ortalama daha büyük bir mesafe (~ 9 Å) gözlenmiştir. Yani, lizin rezidüleri, (ATD'ler arasındaki mesafe) halo simülasyonunda birbirine daha yakın bulunmaktadır.

GluN1<sub>2</sub>/GluN2A<sub>1</sub> ve GluN1<sub>1</sub>/GluN2A<sub>2</sub> LBD heterodimerleri arasındaki açı, dengelenmiş yörünge boyunca Şekil 8B de izlenmiştir GluN1<sub>2</sub>/GluN2A<sub>1</sub> ve GluN1<sub>1</sub>/GluN2A<sub>2</sub> heterodimerlerinin arasında iki vektör oluşturulmuştur. Daha sonra üretilen iki vektör arasındaki açı hesaplanmıştır. Halo simülasyonda açı (Şekil 9B'de yeşil çizgi ile gösterilen), 52 dereceden başlamıştır ve 200. ve 450. ns arasında 55 dereceye yükselmiştir. Apo simülasyonunda ise

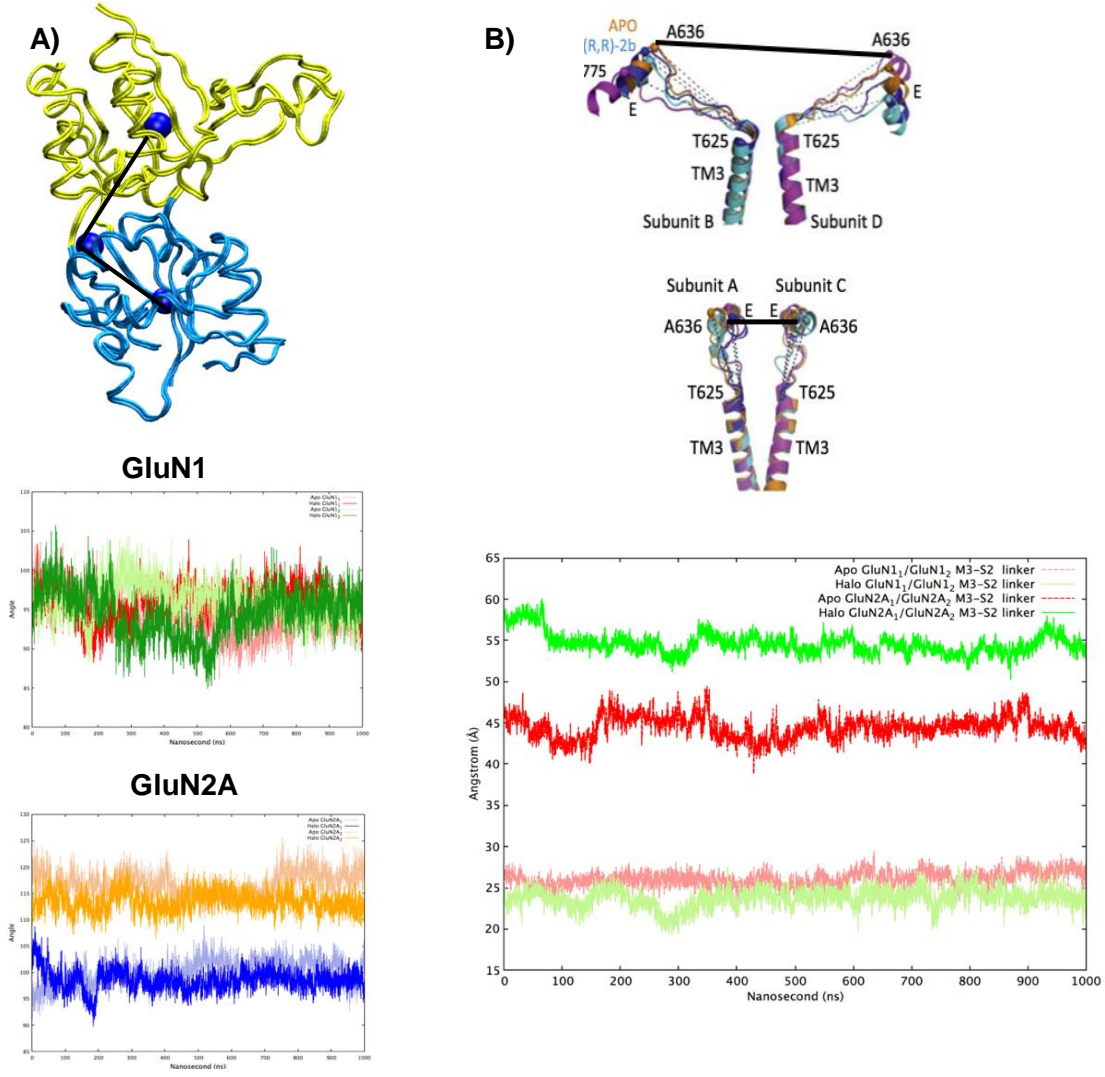


açı (Şekil 9B'de kırmızı ile gösterilen), 55-56 derecede dalgalanırken, 60 derecede sonlanmıştır. Apo ya göre halo da yaklaşık 5 derece kapanma gözlenmektedir.

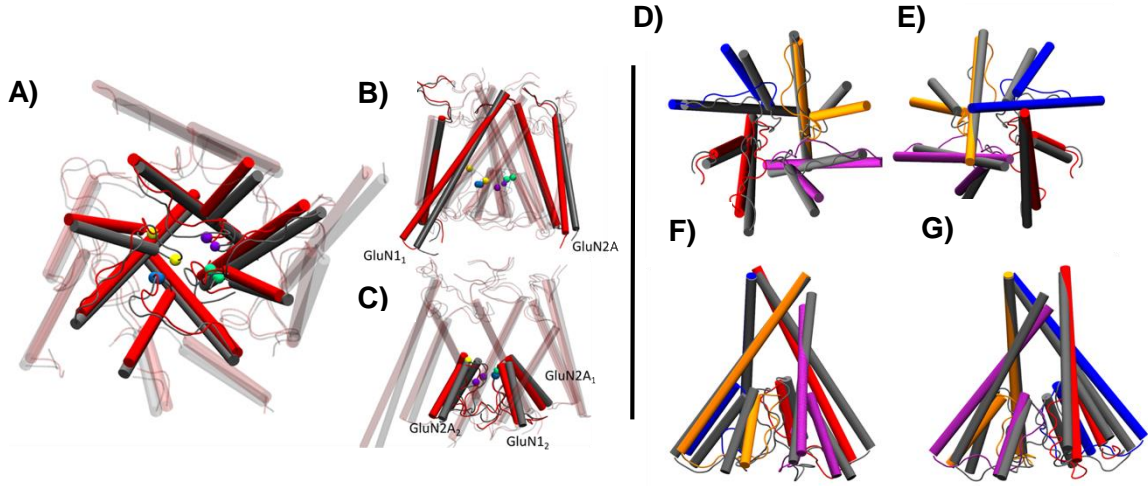
Şekil 10A'da ise ligant bağlanma bölgesinde iki lobun kapanma açıları kıyaslanmıştır. GluN1 zincirlerinde bu açılar arasında apo ve halo simülasyon arasında bir fark görülmezken, GluN2A glutamatın bağlandığı bölgede farklılıklar gözlemlendi. Her bir GluN2A zinciri için bu açının halo simülasyonda 4 derece daha kapalı oluşu gözlemlendi (şekil 10A en altta gösterilen grafik). Bu ligant bağlanmasının iki lobu daha fazla bir arada tuttuğunu gösteriyor ve iki tip zincir için farklılık gözlemlenmiştir.

Şekil 10B'de ise ligant bağlanma bölgesini transmembran helikslere bağlayan linker bölgelerinin uzunluğu incelenmiştir. Apo simülasyonlardaki uzaklıklar kırmızı, halo yapıdakiler ise yeşille gösterilmiştir. Burada yine GluN2A zincirinde bu uzaklığın apo simülasyonda halo simülasyona göre kısa kaldığı gözlenmemiştir. İlk simülasyon arasında yaklaşık 10 Å bir fark vardır.





Şekil 10. A) LBD D1 ve D2 lobları arasındaki açı farkı GluN1 ve GluN2A zincirleri için grafiklerde gösterilmiştir. B) Alt tipler arasındaki M3/S2 linker mesafe değişimi. Alt iplerin M3/S2 bağlayıcıları arasındaki mesafenin (siyah çubuklar) apo (kırmızı) ve halo (yeşil) simülasyonları boyunca nasıl değiştiğinin grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 11. Kanal yapısı analizi (A/B/C) Alt kapının en dar(Halo-gri) ve en geniş(Halo-renkli) hallerinin hizalanması. Sarı GluN11, mavi GluN2A1, yeşil GluN12 ve mor GluN2A2 zincirlerini belirtmektedir A) Kanal alt tarafından, M3 ve M2 heliksleri opak halde, M4 ve M1 heliksleri transparan olarak, B) Kanal yandan ve M4 heliksleri opak olarak, C) M2 heliksleri opak M1 ve M4 heliksleri transparan gösterilmiştir.M3 heliksleri ise C) resminde gösterilmemektedir. (D/E/F/G) Üst kanalın en dar(Apo-gri) ve en geniş (Halo-renkli) hallerinin hizalanması ve M3/ M2 helikslerinin gösterimi. Mavi GluN11, kırmızı GluN2A1, mor GluN12 ve sarı renk GluN2A2 zincirlerini tayin etmektedir. D) kanalın alt E) kanalın üst F) ve G) ise kanalın yan görüntüleridir.

Şekil 11A'da, halo TMD alt kapının en geniş ve öncesinde en dar olduğu zaman aralığından 2 kare seçilip hizalanmıştır. Şekil 11A incelendiğinde, GluN<sub>11</sub> (sarı toplar) M2 heliksi sola doğru tilt hareketi yapmaktadır. Bu hareket M2 ye bağlı olan ve kanalın alt kısmında dar bölgeyi oluşturan loop (ilmek) yapısını geriye çekerek kanal genişliğini artmaktadır. GluN2A<sub>2</sub> (mor) M2 heliksi saat yönünün tersine doğru kaymaktadır (Şekil 11C). GluN<sub>12</sub> (yeşil) M2 ve M3 ve GluN2A<sub>1</sub> M2 heliksleri ise kanalın merkezine doğru yaklaşmaktadır. Şekil 11B de GluN<sub>11</sub> ve GluN2A<sub>2</sub> M4 helikslerinin sola doğru tilt hareketi yaptığı gözlemlenmektedir. Tüm bu bulgular dahilinde hareketin saat yönünün tersinde, yana doğru kayma hareketi yaptığı görülmektedir. İyon kanalı hareketini daha iyi gözlemleyebilmek için üst kapının halo yapısında en geniş olduğu ve apo yapısında da en dar olduğu aralıktan 2 görüntü alınıp birbirlerine hizalanmıştır. (Şekil 11D/E/F/G). Apo yapısından halo yapısına geçerken göze çarpan en net hareket, GluN<sub>11</sub> ve GluN<sub>12</sub> zincirlerinin M3 heliksleri, dışarıya doğru açılıp kanalın merkezinden uzaklaşmasıdır (Şekil 11G). Bu çekilmede M2 helikslerini dışarı doğru itmektir. Kanala üst kısımdan bakıldığında ise kanalın daha simetrik bir pozisyon aldığı fark edilmiştir.

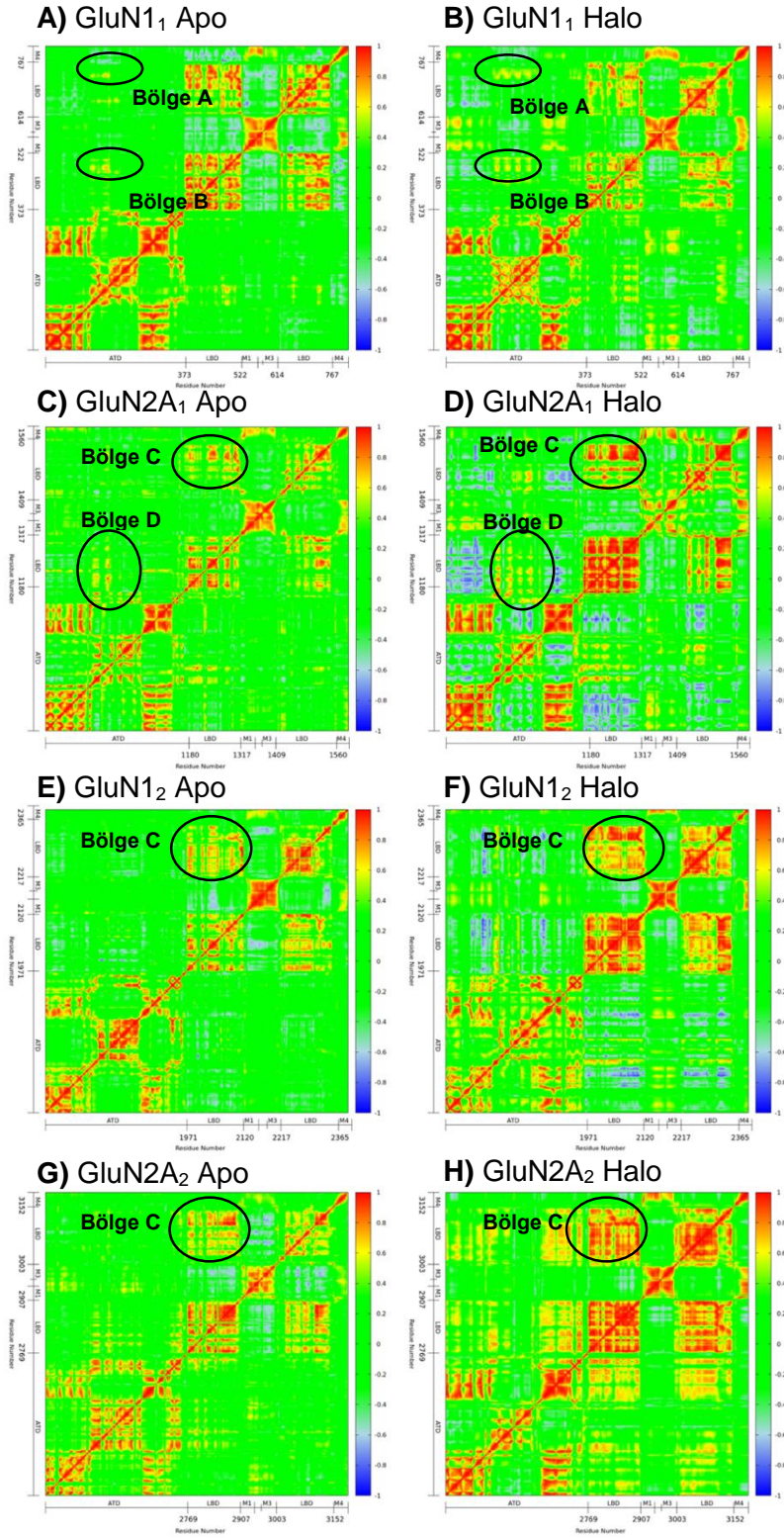
#### 4.4 Temel Bileşen Analiz Sonuçları (PCA)

Apo ve halo simülasyonlarına ait dengeye gelmiş yörüngelerin, başlangıcından 300 ns aralığı çıkarılarak, geriye kalan 1000 ns için PCA analizi yapılmıştır. Sistemin tamamı 3189 rezidüden meydana gelmiştir. 9567 adet eingendeğeri ve eingenvektörü, AMBER moleküler dinamik programının PTRAJ uygulaması kullanılarak hesaplanmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda ilk 10 eigendeğerlerinin proteinin en yavaş hareketini veya “fluctuationları” (dalgalanmaları) ifade etmek için yeterli olduğu görülmüştür (Hayward ve de Groot, 2008; Issack vd., 2012). Bu çalışmada apo ve halo simülasyonlarının toplam dalgalanma değerleri %64,5 ve %77,43’dür. Analiz sonucu elde edilen ilk 10 eigendeğeri Tablo 2’ de yer almaktadır. Kovaryans matrisi, ilk 10 eigenvektör ve eigendeğerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. İlk 10 eigen değer PCA'daki tüm eigendeğerleri arasındaki yüzdelik katkısı.

Apo (1000ns)	Halo (1000ns)
2988.41	8338.03
1131.90	1685.92
568.17	929.20
455.64	597.01
371.79	489.97
343.41	412.79
286.32	317.33
231.82	245.30
169.42	218.63
157.33	180.32
64.60%	77.43%

Şekil 12 deki sonuçlar, Ca atomlarını baz alınarak normalize edilmiş kovaryans matris değerlerini ifade etmektedir (Denklem 3). Ayrıca, LBD'ye ligant bağlanmasından sonra ilişkili hareketlerin nasıl etkilendiğini göstermektedir. Korelasyon grafiklerinde diyagonal segmentler, proteinin uzamsal olarak yakın segmentleri, diyagonal olmayan segmentler ise uzak bölümler arasındaki korelasyonlarını göstermektedir. Grafiklerin sağındaki renkli çubuklarda +1 yönüne doğru bölümlerin tamamen korelasyonlu bir şekilde hareket ettiğini, -1 yönüne doğru ise anti korelasyonlu hareketler gösterdiği anlamına gelmektedir. Şekiller korelasyon derecesine göre renklendirilmektedir. +1 kırmızı ile temsil edilirken, -1 mavi ile temsil edilir.



Şekil 12. Tüm alt birimlerinin için apo ve halo simülasyonlarının korelasyon grafikleri. A) GluN1<sub>1</sub> apo B) GluN1<sub>1</sub> halo C) GluN2A<sub>1</sub> apo ve D) GluN2A<sub>1</sub> halo E) GluN1<sub>2</sub> apo F) GluN1<sub>2</sub> halo G) GluN2A<sub>2</sub> apo ve H) GluN2A<sub>2</sub> halo simülasyonlarını göstermektedir.

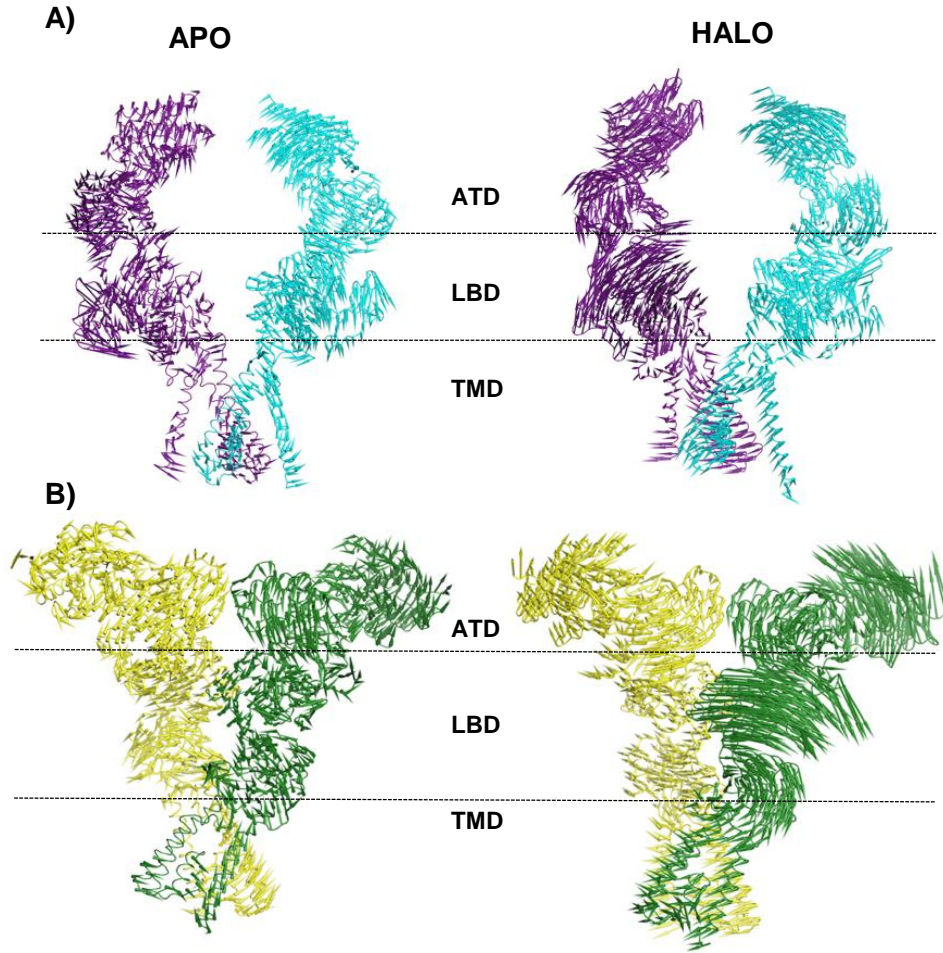


GluN1<sub>1</sub>'in çapraz korelasyon grafiğine göre, halo simülasyondaki korelasyon hareketlerinde iki belirgin artış vardır. Bölge A LBD de S1 kısmını, bölge B ise LBD'nin S2 kısmına denk gelmektedir. S1 LBD'yi M1'e, S2 ise M3'ü M4 heliksine bağlayan döngülerdir. Bölge A ve B ye göre LBD ile ATD arasında korelasyon halo simülasyonunda artmaktadır (Şekil 12A/B).

Şekil 12 C/D sırasıyla apo ve halo simülasyonların GluN2A<sub>1</sub>'deki korelasyonlarını göstermektedir. İki bölgede korelasyon artışı gözlenmektedir. C bölgesi, LBD'nin bütün S1 ve S2 bölgeleri arasındaki korelasyonu göstermektedir. Bu korelasyonun halo 'da arttığı görülmektedir. D bölgesi ise LBD'nin S1 bölgesi ile ATD bölgesi arasındaki hareketin apo 'ya kıyasla halo simülasyonunda daha fazla ilişkili olduğu anlatmaktadır.

GluN1<sub>2</sub> ve GluN2A<sub>2</sub> alt ünitelerinde de GluN2A<sub>1</sub>'de gözlenen aynı bölge (C Bölgesi), halo simülasyonunda daha yüksek korelasyon göstermektedir (Şekil 12). Ek olarak, GluN2A<sub>2</sub>'de halo simülasyonunda, M1-M3 ve M4 helisleri arasındaki korelasyonda bir artış da gözlenmektedir.

Şekil 13 'de ise PCA analizindeki en büyük varyansa sahip mod farklı subunitler için gösterilmiştir. Bu iki resim için ek olarak video da ek olarak sisteme yüklendi (Ek3 gif). Burada gözlemlenen ise halo simülasyonlarının apo simülasyonlara göre "collective and concerted" bir hareket yaptığı olmuştur. Ek olarak halo simülasyonlar tek başına incelendiğinde, GluN1 ve GluN2A zincirlerinin bir tanesinde daha büyük hareketler gözlemlendi. Bunlar Şekil 13 A'da mor ile gösterilen zincir ve 13 B'de yeşil ile gösterilen zincirlerdir. Bu iki zincir moleküldeki simetrisinin birbirine komşu olan zincirlerde gözlemlendiğidir. Şekil 13'de oklarla gösterilen hareket aynı zamanda **Ek 3**'de mpeg olarak da sağlanmıştır.



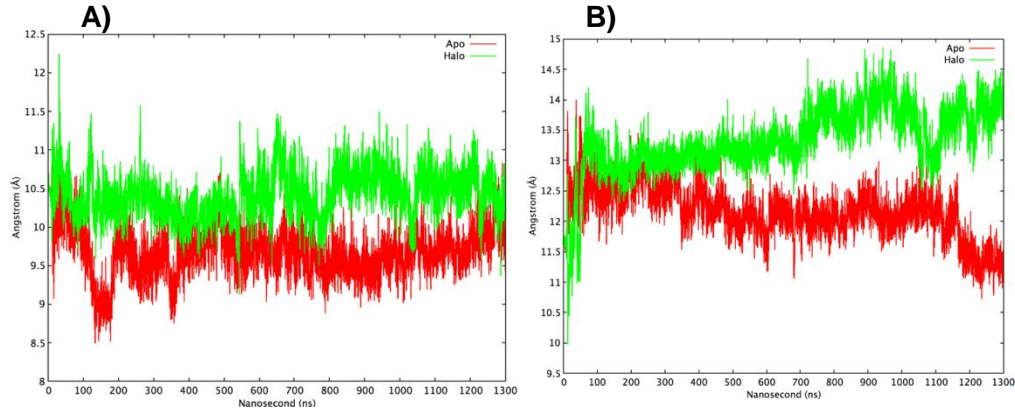
Şekil 13. PCA ilk modun her iki simülasyon için kirpi “porcupine” gösterimi. A) GluN1 alt tiplerini gösterilmektedir. GluN1<sub>1</sub> mavi GluN1<sub>2</sub> mor renk ile gösterilmiştir. B) GluN2A alt tiplerinin porcupine grafiği gösterilmektedir. GluN2A<sub>1</sub> yeşil, GluN2A<sub>2</sub> sarı renk ile gösterilmektedir.

#### 4.5 ATD Bölgesinde Yapısal Değişiklikler

ATD bölgesindeki ligantlar, İfenprodil GluN1/GluN2B ara yüzüne bağlanırken, çinko GluN2A'nın üst ve alt lobları arasında yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Choi ve Lipton, 1999; Rachline vd., 2005) (Her bir ATD zinciri yine ligant bağlanma bölgesinde görüldüğü gibi istiridye kabuğu gibi iki lobdan oluşmaktadır). İfenprodilin bağlanması için GluN2 bi-lobların “yeterince kapalı” olması gerekmektedir (Romero-Hernandez vd., 2016). Çinko bağlı GluN2A ATD bi-loblarının GluN2B ATD bi-loblarına göre 13 derecede daha açık olduğu ve GluN2B ATD lobları kadar kapanamadığı belirtilmiştir (Romero-Hernandez vd., 2016). (GluN2 ATD'nin lobları açık olduğunda GluN1-GluN2 ara yüz alanı daralmaktadır.). Aynı zamanda GluN1/GluN2A ATD' sinin tüm yapısı, ifenprodil bağlı GluN1/GluN2A ATD' sine göre, 12 derece rijit gövde rotasyonu yapmaktadır. Bu konformasyon değişikliği GluN1/GluN2A ara yüzünde bulunan GluN1-a3 ve GluN2A-a2 heliksleri arasındaki mesafeyi kısaltarak, ifenprodil

bağlanma bölgesini daraltmaktadır. Bu bulgular göz önüne alınarak, GluN1/GluN2A ATD ve GluN1/GluN2B ATD arasındaki ara yüz mimarisindeki fark, ifenprodilin, GluN2B içeren reseptörlere spesifik olarak bağlanmasının sebebi olduğu söylenmiştir (Romero-Hernandez vd., 2016).

İfenprodilin ATD bölgesine bağlanması, GluN1-a3 ve GluN2-a2 helikslerinin arasındaki uzaklığa bağlıdır (Romero-Hernandez vd., 2016). İfenprodil bağlı GLUN1/GLUN2B yapıda (Karakas vd., 2011), bu iki heliksin kütle merkezleri aralarındaki mesafe 12.36 Ångstrom iken, GLUN1/GLUN2A yapısında (Romero-Hernandez vd., 2016) 9.7 Ångstromdur. Aşağıdaki şekiller tüm simülasyon yörüngesi boyunca iki heliksin kütle merkezleri arasındaki uzaklık değişimini göstermektedir.



Şekil 14. A) GluN1<sub>1</sub>-a3 ve GluN2A<sub>1</sub>-a2 ve B) GluN1<sub>2</sub>-a3 ve GluN2A<sub>2</sub>-a2 helikslerinin kütle merkezleri arasındaki mesafe değişimi

Şekil 14A ve şekil 14B'ye göre, NMDA yapımızda ifenprodilin sığacağı kadar yer bulunmaktadır. Bu bulgular baz alarak çinko ve ifenprodil, halo yapımıza dok edilip aralarındaki yapısal farklılıkların gözlemlenmesi planlanmaktaydı. Bu basamağı kanal yapısının tam açık hali elde edildikten sonra uygulamamanın daha uygun olacağı düşünülmüştür.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu projede elde edilen sonuçlar genel olarak iki bölüme ayrılabilir: Proteinin modellenmesi ve yapının dinamik özelliklerinin araştırılması. Aşağıda her bir iş paketi ile ilişkilendirerek sonuçlar sunulmuştur.

İş paketi bazında bakıldığında, İP 1, yani **kapalı iyon kanalı yapı modellenmesi**, yapının modellenmesi beklenen 3 aylık süreden daha uzun bir sürede tamamlanabildi. Yürütücü daha önce gamma-amino bütrik asit reseptörünün, ki o reseptör de yine aynı burada modellenen ve simüle edilen yapı gibi ligant-bağlı bir iyon kanalıdır, modellenmesi üzerine deneyim sahibidir (Ayan ve Essiz, 2018). Fakat burada elde edilen X-ray yapılarının mutasyon, disülfid köprüsü ve bazı büyük döngü yapıları kesilmesi gibi metotlara başvurularak kristalize edildiği gözlemlendi. Ek olarak transmembran kısmında, kanalın alt kısmını sıralayan amino asit çözünürlüklerinde de problemler ile karşılaşmıştır. Bu da homoloji ve loop/döngü modellemesi kısmının yani İP 1 'in öngörülen süreden daha uzun sürede tamamlanmasına sebep olmuştur. Bu kısımda diğer yapılara göre çok daha detaylı bir analiz yapılması gerekti. Sonuçta iki şablon yapı kullanılarak ve ROSETTA programı kullanılarak loop/döngü “ab-initio” modellenmesi basamakları projeye eklendi. Bu kısımlarda iki farklı programın MODELLER ve ROSETTA 'nın skorlama fonksiyonu kros-validasyon için kullanılarak, sonuç modeli tetramer olarak elde edildi.

**İP 5, normal mod tekniği ile iyon kanalı açık yapısının elde edilmesi**, bu yapı elde edildikten hemen sonra yapılmıştır. Bu mod analizinde iyon kanalı yapısında açılmaya sebep olan iki mod gözlemlendi. İlki en yavaş 3. frekansa sahip Mod 3, ikincisi ise en yavaş 9. Mod olan Mod 9'dur. İlk modda TMD kısmı bütün halinde rotasyon yaparken, LBD ve TMD birlikte onun ters yönünde hareket etmektedirler. Mod 9 ise daha çok bir tilt ile genişleme hareketidir. Her iki modda ortak gözlemlenen ise TMD zincirlerini LBD zincirlerine bağlayan bölgedeki döngülerin bu hareketler sonucunda uzayıp kılınmasıdır.

**İP 2 yani protein yapısının stabilite için harmonik kısıtlı moleküler dinamik ile sınanması, İP 4 yani iyon kanalı yapısının iyon iletimine kapalılık testi yani iyon kanalının kapalı iyon yapısının 1 mikro saniye RBD simülasyonu ve İP 6 yani iyon kanalına glutamat/glisin doklanması ve yapının 1 mikro-saniye RBD simülasyonu için öngörülen 1 mikro saniye simülasyonlar tamamlanmıştır.** Bu simülasyonlarda ligant molekülü bağlanma bölgesinden ayrıldığı için protein ve ligant moleküllerinin üzerindeki kısıtların daha uzun süre tutulduğu dengeleme simülasyonları (Yöntem, Tablo 1, Protokol 2) yapılması gerekti. Ligant molekülünün bağlanma bölgesini terk etmesi, projeye başvurduğumuzda öngörebildiğimiz bir risk değildi. Fakat harmonik kısıtları dengeleyerek bu sıkıntı aşıldı ve toplam 1300 ns simülasyonlar apo ve halo yapılar için başarı ile tamamlandı. Moleküler dinamik simülasyonlar,



Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) süper bilgisayar merkezinde 1024 çekirdek kullanarak Cab ve Syrah isimli makinelerinde koşturulmuştur. Cab makinesi her biri 2.6 Ghz işlemci saat hızına sahip 20,736 çekirdek ile her makine 32 GB olmak üzere toplamda 41,472 GB ram bellek içermektedir. Syrah makinesi ise her biri 2.6 Ghz işlemci saat hızına sahip 5,184 çekirdek ile her makine 64 GB olmak üzere toplamda 20,736 GB ram bellek içermektedir. Her 5 ns simülasyon yaklaşık 3 saatte tamamlandı.

**Bu aşamada İP 3'den bahsetmek uygun olacaktır.** Proje önerisinde daha hızlı bir metot olacak rigid blok uygulamasının (RBD) uygulanıp simülasyonların hızlandırılmasını planlamıştık. Ama LLNL'deki süper bilgisayar sisteminin yenilenmesi ve bize verilen bilgisayar zamanının yaklaşık 2 kat artırılması sebebi ile böyle bir metodu uygulamaya gerek kalmadı. Bu açıdan simülasyonlar “all-atom” MD ile tamamlandı, “coarse-grained” RBD metodu kullanılmadı. RBD metodunun yaklaşık bir metot olması sebebiyle bilgisayar kapasitesinin yettiği bir durumda bu metodun kullanılması tercih edilmemiştir.

**İP 7'de bahsedilen simülasyon sonuçlarının analizleri** bu projenin esas önemli bulgularıdır. Proteinin halo ve apo yapılarını hem farklı yapısal parametrelerdeki değişikliklere hem de elde ettiğimiz yörüngelerin farklarını inceleyerek çözümlenmeye çalıştık. NMDA reseptörünün iyon kanalı kısmı potasyum KcsA kanalının kapalı yapısının “upside-down” haline benzetilebilir (Zhou vd., 2001). M3 heliklisinin kros ettiği yer NMDA kanalında üstte iken, potasyum kanalında alttadır. Potasyum kanalının aktive olması kanalın dışındaki voltaj sensörlü heliks yapılarına bağlıdır. Fakat NMDA sisteminde voltaja bağlı bir kapanıp açılma değil, ligant bağlanmasına bağlı bir kapanıp açılma söz konusudur. Normalde bu tip kanalların simülasyon süresince açılıp kapanması genelde zor gözlemlenir (Böyle bir voltaj değişikliğini gerçekçi bir şekilde simüle etmekteki sıkıntılardan dolayı). Bizim simülasyonlarımız da kanalın tam açık yapısını elde edilemedi. Fakat ilk açılma yani ‘semi-open’ kanal yapıları gözlemlendi.

Şekil 11 A, B ve C'de, halo alt kapının en geniş ve en dar olduğu zaman aralığından 2 kare seçilip hizalanmıştır. Şekil 11A incelendiğinde, GLUN1<sub>1</sub> (sarı toplar) M2 heliksin sola doğru tilt hareketi yaptığı gözlenmektedir. Bu hareket aracılığıyla, M2 ye bağlı olan ve kanalın alt kısmında dar bölgeyi oluşturan loop (ilmek) geriye çekilerek kanal genişliği artmaktadır. GLUN2A<sub>2</sub> (mor) M2 heliksi saat yönünün tersine doğru, kayma hareketi yapmaktadır. (Şekil 11C). GLUN1<sub>2</sub> (yeşil) M2 ve M3 ve GLUN2A<sub>1</sub> M2 heliksleri ise kanalın merkezine doğru yaklaşmaktadır. Şekil 11B de GLUN1<sub>1</sub> ve GLUN2A<sub>2</sub> M4 helikslerinin sola doğru tilt hareketi yaptığı gözlemlenmektedir. Tüm bu bulgular dahilinde hareketin saat yönünün tersinde, yana doğru kayma hareketi yaptığı görülmektedir ve temel olarak açılmanın N1 zincirinden kaynaklandığı gözlemlenmiştir.

İyon kanalı hareketini daha iyi gözlemleyebilmek için üst kapının halo yapısında en geniş olduğu ve apo yapısında da en dar olduğu aralıktan 2 görüntü alınıp birbirlerine hizalanmıştır. (Şekil 11 D, E, F, G aynı görüntü farklı açılardan gösterilmiştir). Apo yapısından halo yapısına geçerken göze çarpan hareket, GluN1<sub>1</sub> ve GluN1<sub>2</sub> zincirlerinin M3 heliksleri, dışarıya doğru açılıp kanalın merkezinden uzaklaşmasıdır. Bu çekilmede M2 helikslerini dışarı doğru itmektedir. Özellikle bu hareket GluN1<sub>1</sub> zincirinde daha net gözlenmektedir. GLUN2A<sub>1</sub> ve GluN2A<sub>2</sub> M3 heliksleri kanalın merkezine doğru yaklaşmasına rağmen M2 helikslerinin yana tilt hareketi kanalın dar kısmını oluşturan looplarını (ilmeklerini) aşağıya doğru çekmektedir. Kanala üst kısımdan bakıldığında ise kanalın daha simetrik bir pozisyon aldığı fark edilmiştir.

Twomey ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada, AMPA reseptörünün Cryo-EM yapıları çıkartılmış ve gating mekanizmasını incelenmiştir (Twomey vd., 2017). Çözömlenen yapılarda iyon kanalı açık ve kapalı halde bulunmaktadır. Bu çalışmada alt tiplerin iyon kanalı açılımındaki etkisini saptayabilmek için, membrana paralel (B ve D zincirleri arası) ve dikey (A ve C zincirleri arası) olan M3-S2 linkerlerin (bağlayıcı ilmekler) arasındaki mesafe farkı ölçülmüştür. Kapalı yapıdan açık yapıya geçerken dikey M3-S2 linkerlerin arasındaki mesafenin 23 Å 'dan 24 Å'ya, paralel olanda ise 56 Å dan 68 Å'ya değiştiği görülmüştür. (Şekil 10B). Bu gözleme dayanarak, paralel M3-S2 linkerlerin, iyon kanalı açılmasında merkezi rol oynadığı belirtilmiştir. Aynı analiz bu projedeki apo ve halo simülasyonların yörüngeleri için uygulanmıştır (Figure 10 B grafik). GLUN2A<sub>1</sub>/GLUN2A<sub>2</sub> M3-S2 bağlayıcı ilmeklerin arasındaki mesafe, simülasyon boyunca halo yapısında, apo' ya göre 12 Ångstrom daha geniştir. GLUN1<sub>1</sub>/GLUN1<sub>2</sub> M3-S2 bağlayıcı ilmekleri için belirgin bir fark görülmemiştir. ***Bu da kanalın linkerlerden çekilerek M3 helixleri boyunca açıldığıнын gözlemlenmesidir. Bu sonuç açık yapısı elde edilen AMPA reseptörü ile bire bir örtüşmektedir.***

Bir diğer önemli sonuç da ligant bağlanma bölgesinin hareketlerindedir. Şekil 10 A 'da farklı 4 zincir için LBD bölgesinde bulunan iki lob'un kapanma açıları arasındaki fark hesaplanmıştır. Sadece GluN2A zincirleri için bu açının halo simülasyonda apo yapıya göre 4 derece daha kapalı oluşu gözlemlendi (Şekil 10 A sol panel en altta gösterilen grafik). Bu ligant bağlanmasının iki lobu daha fazla bir arada tuttuğunu gösteriyor ve iki tip zincir için GluN1 ve GLUN2A için farklılık gösteriyor. Şöyle ki LBD bölgesindeki iki lobun kapanması, TMD-LBD zincirlerinin çekilmesine, bu da şekil 10 B'de gösterilen uzaklığın halo simülasyonda daha geniş olmasına sebep olmuştur. Bu potasyum kanalındaki gibi TMD bölgesindeki helikslerinin yukarıya doğru çekilerek açılması hareketidir. ***Fakat sadece iki lobun kapandığı N2A zincirlerinde bu çekme hareketi gözlemlenmektedir.***

Diğer önemli bir bulgu ise temel bileşen analizinde ortaya çıkmıştır. Bu analizde Tablo 2'de gösterilen öz-değerler incelendiğinde, ilk eigen-vektörün halo simülasyonda diğer modlara

göre daha baskın olduğu gözlemlendi. Apo ve halo simülasyon kıyaslandığında, ligant bağlanması hareket açısından benzer olan iki modu (en yavaş mod), halo simülasyonda daha baskın hale getirmiştir. Hareketin kendisi ise, karşılıklı zincirler için Şekil 13'de gösterilmiştir. Şekil 13 A'da karşılıklı N1 zincirleri, şekil 13 B'de ise karşılıklı N2A zincirleri gösterilmiştir. Yeşil ile gösterilen N2A zinciri ile mor ile gösterilen N1 zincirinde, LBD bölgesinin tek bir vücut olarak rotasyonu ve TMD bölgesindeki heliksleri çekme hareketi gözlemlenmektedir. Bu AMPA yapısında Twomey ve arkadaşlarının 2017 yılında (Twomey vd., 2017) yaptıkları çalışmada, AMPA'nın her bir zinciri için önerilen mekanizmaya benzerdir. Aynı şekilde LBD'deki alt lobun kapanmasının TMD'deki zincirleri çekmesi üzerine kapalı iyon yapısından açık iyon yapısına geçilmiştir. Son olarak korelasyon grafiklerinde de, şekil 12, halo simülasyondaki farklı bölgeler arasındaki korelasyonların artırttığını gözlemlendi. Halo simülasyonda ATD ve LBD arasındaki hareketlerin korelasyonlarının apo simülasyona göre çok fazla olduğu gözlemlendi. Halo simülasyonda ligant moleküllerinin LBD'nin iki lobunu bir arada tutarak hareket etmesi sonucunda, ATD ve TMD kısımları ile etkileşimlerini artırmıştır. Yani ligant bağlanması LBD kısmını bir arada tutan bir yapıştırıcı gibi yorumlanabilir.

Sonuç olarak, iyon kanalının tam olarak açılmasının bu sürede gerçekleşen simülasyonlarda gözlenmemesine rağmen, iki zincirde ilk açılma hareketleri gözlemlenmiştir. Bu projenin devamı için planlanan ise bu simülasyon sürelerini uzatmak değil, kanalı daha önce deneysel olarak çalışılan mutasyonlarla açmak olacaktır. M3 helikslerin kros ettiği yerde lurcher motifi denilen korunmuş SYTANLAAF sekansı bulunur. Bu sekansta daha önceki mutasyon çalışmasında yapılan bir mutasyon in-silico olarak yapılarak önce kanalın açılması sağlanacaktır (Murthy vd., 2012). Çünkü bu kanalı standart bir simülasyon ile açmak voltaj sensörünü taklit edememekten dolayı zor görünmektedir.

Son olarak İP 8 ve 9'da planladığımız doklama kısmını, yukarıda bahsedilen, halo simülasyonda mutasyon sonrası tam açık iyon kanalını elde ettikten sonraya bırakıldı (Bu çalışma TÜBİTAK'a yeni bir 1001 projesi için yollanacaktır). ATD bölgesinde ifenprodil bağlanma bölgesi olan iki zincir arası ara yüz ve çinkonun bağlanma bölgesi olan zincir içinde iki loblu yapı ara yüz, küçük molekülleri dok edebilmek için gerekli ara yüz alanına, sadece halo simülasyonlarda sahiptir. Apo simülasyon bu moleküllerin bağlanması için gereken alanı sağlamamaktadır. PCA analizinde gözlemlenen ilk mod (Bknz. Ek 3 videolar), halo simülasyondaki hareketteki ATD bölgesine bağlanan bir molekülün 'foot-in-door' gibi bir mekanizma ile ATD VE LBD aktivasyonunu direk etkileyebileceğini göstermiştir. **Bu projeden elde ettiğimiz bulgular, ATD bölgesine doklama çalışmalarına mutasyonlu yapıdan sonra devam edilmesinin uygunluğunu öngörmektedir.**

## KAYNAKLAR

1. Allen, W. J., Lemkul, J. A. & Bevan, D. R. 2009. "GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics", *J Comput Chem*, **30**, 1952-8.
2. Ayan, M. & Essiz, S. 2018. "The neural gamma2alpha1beta2alpha1beta2 gamma amino butyric acid ion channel receptor: structural analysis of the effects of the ivermectin molecule and disulfide bridges", *J Mol Model*, **24**, 206.
3. Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. & Woods, R. J. 2005. "The Amber biomolecular simulation programs", *J Comput Chem*, **26**, 1668-88.
4. Choi, Y. B. & Lipton, S. A. 1999. "Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn<sup>2+</sup> inhibition of the NMDA receptor", *Neuron*, **23**, 171-80.
5. Dravid, S. M., Burger, P. B., Prakash, A., Geballe, M. T., Yadav, R., Le, P., Vellano, K., Snyder, J. P. & Traynelis, S. F. 2010. "Structural determinants of D-cycloserine efficacy at the NR1/NR2C NMDA receptors", *J Neurosci*, **30**, 2741-54.
6. Dutta, A., Shrivastava, I. H., Sukumaran, M., Greger, I. H. & Bahar, I. 2012. "Comparative dynamics of NMDA- and AMPA-glutamate receptor N-terminal domains", *Structure*, **20**, 1838-49.
7. Dutta, A., Krieger, J., Lee, J. Y., Garcia-Nafria, J., Greger, I. H. & Bahar, I. 2015. "Cooperative Dynamics of Intact AMPA and NMDA Glutamate Receptors: Similarities and Subfamily-Specific Differences", *Structure*, **23**, 1692-1704.
8. Feller, S. E. & MacKerell, A. D. 2000. "An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids", *The Journal of Physical Chemistry B*, **104**, 7510-7515.
9. Fiser, A. & Sali, A. 2003. "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models", *Methods Enzymol*, **374**, 461-91.
10. Frydenvang, K., Lash, L. L., Naur, P., Postila, P. A., Pickering, D. S., Smith, C. M., Gajhede, M., Sasaki, M., Sakai, R., Pentikainen, O. T., Swanson, G. T. & Kastrup, J. S. 2009. "Full domain closure of the ligand-binding core of the ionotropic glutamate receptor iGluR5 induced by the high affinity agonist dysiherbaine and the functional antagonist 8,9-dideoxyneodysiherbaine", *J Biol Chem*, **284**, 14219-29.
11. Furukawa, H. & Gouaux, E. 2003. "Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core", *EMBO J*, **22**, 2873-85.
12. Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. & Gouaux, E. 2005. "Subunit arrangement and function in NMDA receptors", *Nature*, **438**, 185-92.
13. Gillessen, T., Grasshoff, C. & Szinicz, L. 2002. "Mitochondrial permeability transition can be directly monitored in living neurons", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **56**, 186-193.

14. Hayward, S. & de Groot, B. (2008) *Normal Modes and Essential Dynamics*.
15. Issack, B. B., Berjanskii, M., Wishart, D. S. & Stepanova, M. 2012. "Exploring the essential collective dynamics of interacting proteins: application to prion protein dimers", *Proteins*, **80**, 1847-65.
16. Karakas, E., Simorowski, N. & Furukawa, H. 2009. "Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit", *EMBO J*, **28**, 3910-20.
17. Karakas, E., Simorowski, N. & Furukawa, H. 2011. "Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors", *Nature*, **475**, 249-53.
18. Karakas, E. & Furukawa, H. 2014. "Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel", *Science*, **344**, 992-997.
19. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. 1993. "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures", *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 283-291.
20. Lau, A. Y. & Roux, B. 2011. "The hidden energetics of ligand binding and activation in a glutamate receptor", *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 283-7.
21. Lee, C. H., Lu, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X. & Gouaux, E. 2014. "NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture", *Nature*, **511**, 191-7.
22. Murthy, S. E., Shogan, T., Page, J. C., Kasperek, E. M. & Popescu, G. K. 2012. "Probing the activation sequence of NMDA receptors with lurcher mutations", *J Gen Physiol*, **140**, 267-77.
23. Okada, O., Odai, K., Sugimoto, T. & Ito, E. 2012. "Molecular dynamics simulations for glutamate-binding and cleft-closing processes of the ligand-binding domain of GluR2", *Biophys Chem*, **162**, 35-44.
24. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. 2011. "PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions", *Journal of Chemical Theory and Computation*, **7**, 525-537.
25. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L. & Schulten, K. 2005. "Scalable molecular dynamics with NAMD", *J Comput Chem*, **26**, 1781-802.
26. Postila, P. A., Ylilauri, M. & Pentikainen, O. T. 2011. "Full and partial agonism of ionotropic glutamate receptors indicated by molecular dynamics simulations", *J Chem Inf Model*, **51**, 1037-47.
27. Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J. & Paoletti, P. 2005. "The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B", *J Neurosci*, **25**, 308-17.
28. Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M. & Baker, D. 2004. "Protein structure prediction using Rosetta", *Methods Enzymol*, **383**, 66-93.

29. Romero-Hernandez, A., Simorowski, N., Karakas, E. & Furukawa, H. 2016. "Molecular Basis for Subtype Specificity and High-Affinity Zinc Inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA Receptor Amino-Terminal Domain", *Neuron*, **92**, 1324-1336.
30. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. 1995. "Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER", *Proteins*, **23**, 318-26.
31. Schmidt, C. & Hollmann, M. 2008. "Apparent Homomeric NR1 Currents Observed in *Xenopus* Oocytes are Caused by an Endogenous NR2 Subunit", *Journal of Molecular Biology*, **376**, 658-670.
32. Sirrieh, R. E., MacLean, D. M. & Jayaraman, V. 2015. "A conserved structural mechanism of NMDA receptor inhibition: A comparison of ifenprodil and zinc", *J Gen Physiol*, **146**, 173-81.
33. Smart, O. S., Neduvellil, J. G., Wang, X., Wallace, B. A. & Sansom, M. S. P. 1996. "HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models", *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 354-360.
34. Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P. & Gouaux, E. 2009. "X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor", *Nature*, **462**, 745-56.
35. Song, X., Jensen, M. O., Jogini, V., Stein, R. A., Lee, C. H., McHaourab, H. S., Shaw, D. E. & Gouaux, E. 2018. "Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine", *Nature*, **556**, 515-519.
36. Tajima, N., Karakas, E., Grant, T., Simorowski, N., Diaz-Avalos, R., Grigorieff, N. & Furukawa, H. 2016. "Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil", *Nature*, **534**, 63-8.
37. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-80.
38. Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. & Dingledine, R. 2010. "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function", *Pharmacol Rev*, **62**, 405-96.
39. Twomey, E. C., Yelshanskaya, M. V., Grassucci, R. A., Frank, J. & Sobolevsky, A. I. 2017. "Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors", *Nature*, **549**, 60-65.
40. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. & MacKinnon, R. 2001. "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution", *Nature*, **414**, 43-8.
41. Zhu, S., Stein, R. A., Yoshioka, C., Lee, C. H., Goehring, A., McHaourab, H. S. & Gouaux, E. 2016. "Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation", *Cell*, **165**, 704-14.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Dr. Öğr. Üyesi ŞEBNEM EŞSİZ GÖKHAN
Proje No:	114Z867
Proje Başlığı:	NMDA Tipi Glutamat Reseptörlerinin Çalışma Mekanizması ve Açık İyon Kanalı İnhibitörleri İle Etkileşimleri
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	TIM CARPENTER (Yurt Dışı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	KADİR HAS Ü. MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ F. BİYOENFORMATİK VE GENETİK MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2015 - 01/11/2018
Onaylanan Bütçe:	265665.0
Harcanan Bütçe:	178839.54
Öz:	<p>Bu projenin amacı glutamat ve glisin nörotransmitterleri ile aktive olan tetramerik yapıdaki, ligant kapılı iyon kanalı ailesinin bir üyesi olan NMDA (N-metil-D-Aspartat) tipi glutamat reseptör iyon kanalının, iyon iletimine kapalı ve açık hallerinin hesaplamalı metotlar ile karakterize edilmesi üzerinedir. Projede bilgisayar bazlı sayısal metotlar kullanılarak reseptörde ligant bağlanması sonucu gerçekleşen lokal ve global hareketler hakkında bilgi elde edilmiştir. Projenin ilk basamağında NMDA reseptörünün yeni çözümlenmiş olan iki X-Ray yapısı baz alınıp, homoloji modellemesi yöntemi kullanılarak insan tipi NMDA modeli elde edilmiştir. Daha sonrasında proteinin dominant hareketlerini belirlemek için normal mod analizini kullanılmıştır. Proteinler dinamik bir sistem olduğundan sayısal benzetim yöntemi olan moleküler dinamik metoduyla ligand-olmayan ve ligand-bağlı iki sistem simüle edilmiştir. 1300 nanosaniye koşuturulan sistemlerde ligand bağlandığı bölgede kapanmaya sebep olurken, bu hareketin bağlayıcılar tarafından iyon kanalına iletiildiği gözlemlenmiştir. Bu simülasyonların sonucunda gözlemlendiğimiz bir diğer etki ise, ligand bağlandığı bölgeyi daha stabil hala getirerek reseptörün diğer bölgeleri ile etkileşimleri artırmaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler:	GluR reseptörleri, moleküler dinamik simülasyonu, normal mod analizi, protein yapı modellemesi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- The neural gamma(2)alpha(1)beta(2)alpha(1)beta(2) gamma amino butyric acid ion channel receptor: structural analysis of the effects of the ivermectin molecule and disulfide bridges (Makale - İndeksli Makale), 2- Structural Study of an Ionotropic Channel Protein, GABA Type A Receptor (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 3- Functional Modes of GluNR12 GluNR2A2 NMDA type Receptors (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 4- Functional Modes of Ligand Gated Synapse Receptors (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 5- Functional Modes of GluNR12 GluNR2A2 NMDA type Receptors. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 6- GluNR1-GluNR2B NMDA Reseptör Yapısının Modellenmesi (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 7- Functional Modes of GluNR12 GluNR2A2 NMDA type Receptors. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 8- HOMOLOGU MODELING AND NORMAL MODE ANALYSIS OF HUMAN NR1-NR2A NMDA TYPE RECEPTORS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi), 9- LOOP MODELING AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF APO AND LIGAND-BOUND HUMAN GLUN1-GLUN2A NMDA TYPE RECEPTORS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p>