

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Y. LİSANS TEZİ

**PROTEİN KATLANMASINDA FARKLI PROTEİN SPESİFİK  
MODEL YAKLAŞIMLAR: KOOPERATİF VE KOOPERATİF  
OLMAYAN KATLANMA / AÇILMA GEÇİŞLERİ VE  
TERMODİNAMİK ANALİZİ**

Mevşen PİRİMOĞLU

FİZİK ANABİLİMDALI


ERZURUM

2009

Her hakkı Saklıdır

Doç Dr. Hüseyin KAYA danışmanlığında, Mevşen PİRİMOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 13.08.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Fizik Anabilim Dalı'nda Y. Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Hüseyin KAYA

imza : 

Üye : Doç.Dr. Ali GÜROL

imza : 

Üye : Doç.Dr. Ertan ŞAHİN

imza : 

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof.Dr. Ömer AKBULUT**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Y.Lisans Tezi

### PROTEİN KATLANMASINDA FARKLI PROTEİN SPESİFİK MODEL YAKLAŞIMLAR: KOOPERATİF VE KOOPERATİF OLMAYAN KATLANMA/ AÇILMA GEÇİŞLERİ VE TERMODİNAMİK ANALİZİ

Mevşen PİRİMOĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Fizik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin KAYA

Proteinler sahip oldukları zincir uzunlukları ve amino asit içeriğine göre; bariyersiz iki durum ve çok durumlu termodinamik geçişler göstermektedirler. Kalorimetrik deneyler ile protein katlanma/açılma geçişlerinin türü belirlenebilse de; hangi konformasyonel geçişlerin bu davranışlara sebep olduğu, bu konformasyonel geçişleri sağlayan etkileşim mekanizmalarının neler olduğu, amino asit içeriğinin protein dinamiğine etkileri deneysel tekniklerin yetersizliği dolayısıyla tam olarak açıklanamamaktadır.

Bu tez çalışmasında farklı termodinamik davranışlara sebep olabilecek: protein zincir uzunluğu, protein katlanmış yapı topolojisi, amino asitler arası etkileşim mesafesi, uniform ve heterojen etkileşim yaklaşımları irdelenerek detaylı bir şekilde incelenmiştir. Modelleme çalışmamızda protein spesifik modeller ve Langevin dinamiği içeren moleküler dinamik simülasyon tekniği kullanılmıştır.

Trajektörü, serbest enerji ve ısı kapasitesi gibi termodinamik analizler sonucunda; yerel etkileşim miktarı yüksek olan alfa proteinlerin çoğunluğunda bariyersiz geçişler gözlemlenmiş olup, tamamen beta yapıli proteinlerde ise aynı davranışa zincir uzunluğunun kısa oluşu sebep olmaktadır. Diğer taraftan uzun beta dönüşlerinin bariyersiz davranış yerine iki-durum davranışı gözlenmesine sebep olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca katlanma/açılma geçiş sıcaklıklarını amino asit başına düşen katli konformasyon enerjisinin belirlediği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın diğer önemli noktası ise bu araştırma sırasında geliştirilen ve amino asitlerin fiziko-kimyasal özelliklerini içeren heterojen etkileşimli modellerin, mutasyonların protein dinamiğine etkisini ve protein evrimini inceleyebilmek için prototip bir model olmasıdır.

**2009, 113 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Serbest enerji bariyeri, protein termodinamik, moleküler dinamik, kooperativite

## **ABSTRACT**

MS Thesis

### **DIFFERENT PROTEIN- SPECIFIC MODEL APPROACHES IN PROTEIN FOLDING: COOPERATIVE AND NON- COOPERATIVE FOLDING/UNFOLDING TRANSITION AND THEIR THERMODYNAMIC ANALYSIS**

Mevşen PİRİMOĞLU

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Physics

Supervisor: Assoc.Prof. Hüseyin KAYA

Proteins may show barrierless, two-state, and multi-state thermodynamic transition depending on their chain length and amino acids content. Although the types of protein folding/unfolding transitions can be determined by calorimetric experiments, due to the inadequacy of experimental methods one may not easily explain: what types of the conformational transitions give rise to these behaviors, what types of interaction mechanisms provide these conformational transitions, and what the effects of the amino acid content on protein dynamics is?

In this study, length of protein chain, topology of protein native structure, interaction distance between amino acids, uniform and heterogeneous interaction approaches that may cause different thermodynamics behaviors are investigated in detail. In our modeling study, molecular dynamic simulation technique with Langevin dynamics and protein specific models are used.

As a result of thermodynamics analysis such as trajectory, free energy, and heat capacity analysis, while in many of the alpha proteins which have high amount of local interactions, barrierless transitions are observed, same behavior is caused by shortness of the chain in all beta- structured proteins. On the other hand, the observation that long beta turns lead to two-state transition instead of barrierless transition is emerged. Besides, it is observed that folding/unfolding transition temperatures are determined by conformational energy per amino acid in native structure.

Another important point of this study is that models with heterogeneous interactions developed during the study which includes physico-chemical properties of amino acids are prototype models to examine protein evolution and the effects of mutations on protein dynamics.

**2009, 113 pages**

**Keywords:** Free energy barrier, protein thermodynamic, molecular dynamics, cooperativity

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu alıőmanın planlanıp yürütölmesinde tecrübe ve bilgileri ile her zaman yanımızda olan çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hüseyin KAYA'ya en içten teşekkürlerimi arz ederim.

Mevşen PİRİMOĞLU

Ağustos 2009

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Amino Asitler ve Özellikleri.....	4
2.2. Proteinlerin Yapısı ve Konformasyonu.....	9
2.3. Protein Zincir Uzunlukları ve Farklı Protein Aileleri.....	14
2.4. Protein Katlanması.....	16
2.5. Protein Katlanmasıyla İlgili Deneysel ve Teorik Çalışmalar.....	17
2.6. Proteinlerin Termodinamiği.....	18
2.6.1. Protein katlanmasında termodinamik hal değişimleri.....	18
2.6.2. Proteinlerin Kararlılığı.....	23
2.6.3. Kalorimetrik iki durum davranışı ve kooperatiflik.....	24
2.7 .Moleküler Dinamik Simülasyon Tekniği.....	37
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>43</b>
3.1. Protein Katlanması için Farklı Model Yaklaşımları.....	43
3.1.1. Gō modeli.....	44
3.1.2. Homojen ve heterojen etkileşimli Gō modeli.....	45
3.2. Simülasyon Tekniği.....	54
3.2.1. Kuvvet Alanları.....	55
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>63</b>
4.1. Tüm model yaklaşımlar için iki ve tek durumlu davranış gösteren iki proteinin termodinamik analizi.....	63
4.2. Katlanmış Yapı Topolojisinin Rolü.....	75
4.2.1.Homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modeli.....	78
4.2.2. Homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli.....	81

4.2.3. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeli.....	83
4.2.4. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli.....	86
4.3. Model Proteinlerin Serbest Enerji Analizi.....	88
4.3.1. Tamamen Alfa Yapısına Sahip Olan Proteinler.....	89
4.3.2. Tamamen Beta Yapısına Sahip Olan Proteinler.....	91
4.3.3. Alfa + Beta Yapısına Sahip Olan Proteinler.....	93
4.4. Geçiş Sıcaklığını ve Bariyer Yüksekliğini Etkileyen Faktörler.....	95
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>106</b>
KAYNAKLAR.....	110
ÖZGEÇMİŞ.....	114

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$a$	İvme
$C_{\alpha}$	Alfa Karbonu
$C_p$	Sabit Basınçta Isı Kapasitesi
$E_{min}^D - E_{min}^N$	Açık ve katlı Durum Populasyonları Arasındaki Fark
$\frac{E_{katlı}}{N}$	Amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisi
$E_{katlı}$	Proteinin katlanmış durumdaki enerjisi
$F_{konf}$	Konformasyonel Kuvvet
$H$	Entalpi
$HP$	Hidrofobik-Polar
$k_B$	Boltzman sabiti
$K^{eff}$	Efektif Denge Sabiti
$m$	Kütle
$N$	Amino asit Sayısı
$N_{kontak}^{katlı}$	Kontak Sayısı
$\frac{N_{kontak}^{katlı}}{N}$	Amino asit sayısı Başına Düşen Kontak Sayısı
$\frac{N_{yo}}{N}$	Amino asit sayısı Başına Düşen Yerel Olmayan Kontak Sayısı
$R$	Yan zincir
$r_{ij}^0$	$i$ . ve $j$ . Amino asitler Arasındaki Denge Mesafesi
$r$	Amino asitler arası mesafe
$T$	Sıcaklık
$Q$	Benzerlik Parametresi
$v$	Hız
$\alpha$	Alfa



$\beta$	Beta
$\gamma$	Viskozite
$\delta t$	Zaman Aralığı
$\epsilon_0$	Enerji Ölçeği
$\epsilon_{ij}^{\text{nat}}$	Katlı durumda <i>i.</i> ve <i>j.</i> Amino asitler Arasındaki Etkileşim Potansiyeli
$\kappa$	Kalorimetrik Kriter Oranı
$\xi_i$	Rastgele sayı Üreten Fonksiyon
$\tau$	Zaman Ölçeği
$T_f$	Geçiş Sıcaklığı
$\Delta G$	Serbest Enerji Değişimi
$\Delta S$	Entropi Değişimi
$\Delta H_{\text{vH}}$	Van't Hoff Entalpi Değişimi
$\Delta H_{\text{cal}}$	Kalorimetrik Entalpi Değişimi
$\Delta t$	Zaman Adımı
$\Delta G^\ddagger$	Bariyer Yüksekliği

### Kısaltmalar

D	Açık Durum
N	Katlı Durum
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetri
FRET	Floresans Enerji Transferi
ITC	İzotermal Titrasyon Kalorimetri
MD	Moleküler Dinamik
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
SCOP	Proteinlerin Yapısal Olarak Sınıflandırıldığı Veri Tabanı
PDB	Protein Veri Bankası

PSBD	Çevresel Alt Birim Bağlanma Bölgesi
SAXS	Küçük Açı X Işını Saçılımı
TS	Geçiş Durum
X-Ray	X Işını

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Standart bir amino asitin yapısı.....	5
Şekil 2.2. Amino asitler arası peptid bağı oluşumu.....	5
Şekil 2.3.20 standart amino asitin kenar zincirleri ve kimyasal gösterimleri.....	7
Şekil 2.4. Hidrofobik ve hidrofilik özelliklere sahip amino asitlerin farklı yönelimleri.....	8
Şekil 2.5. Protein zincirinde oluşan bağların gösterimi.....	11
Şekil 2.6. Proteinlerin 4 ayrı yapısının gösterimi.....	13
Şekil 2.7. Proteinlerin tek ve iki bölge gösterimi.....	14
Şekil 2.8. Protein veri bankasından elde edilen PDB kodlarına göre yazılmış farklı proteinler.....	15
Şekil 2.9. Enerji Yüzeyi.....	19
Şekil 2.10. Protein katlanmasında gözlemlenebilen farklı termodinamik geçişler..	22
Şekil 2.11. Farklı reaksiyon koordinatlarına göre termodinamik geçişler.....	23
Şekil 2.12. Herhangi bir protein için serbest enerji grafiği.....	24
Şekil 2.13. Deneysel tekniklerle elde edilen ısı kapasitesi gösterimi ve sınır çizgisi (baseline) çıkarımı.....	28
Şekil 2.14. Proteinlerin termodinamik kooperatif davranışları.....	30
Şekil 2.15. Termodinamik olarak incelenen 6 farklı protein modeli.....	34
Şekil 2.16. Moleküler dinamik simülasyonunu özetleyen akış diyagramı.....	39
Şekil 3.1. Kısa ve uzun erişimli bağımsız etkileşimler.....	47
Şekil 3.2. Farklı özelliklere sahip 4 farklı model yaklaşımı.....	53
Şekil 3.3. Potansiyel enerji ifadesinde yer alan her bir terim.....	56
Şekil 4.1. 1BBL ve 1RLQ proteinlerinin topolojik gösterimleri.....	64
Şekil 4.2. 1RLQ proteini için kısa erişimli homojen etkileşimlerin olduğu Gō modeli yaklaşımı.....	65
Şekil 4.3. Kısa erişimli homojen etkileşimlerin olduğu Gō modeli için 1BBL proteini.....	66
Şekil 4.4. Homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli için 1RLQ proteini .....	67
Şekil 4.5. Homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli için 1BBL proteini.....	68
Şekil 4.6. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeli için 1RLQ proteini.....	69
Şekil 4.7. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeli için 1BBL proteini.....	70
Şekil 4.8. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli için 1RLQ proteini.....	71
Şekil 4.9. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli için 1BBL proteini.....	72
Şekil 4.10. Herhangi bir protein için serbest enerji profili.....	76
Şekil 4.11. 1YZA ve 1W4E proteinlerinin topolojik gösterimleri.....	79
Şekil 4.12. 1SS1 proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri.....	89
Şekil 4.13. 1W4E proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri.....	90

<b>Şekil 4.14</b> 1E0L proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri.....	91
<b>Şekil 4.15.</b> 3AIT proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri.....	92
<b>Şekil 4.16.</b> 1BF4 proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri.....	93
<b>Şekil 4.17.</b> 1URN proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri.....	94
<b>Şekil 4.18.</b> Tamamen alfa proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları.....	95
<b>Şekil 4.19.</b> Tamamen beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları.....	96
<b>Şekil 4.20.</b> Alfa+beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları.....	97
<b>Şekil 4.21.</b> Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları..	98
<b>Şekil 4.22.</b> Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonlar..	99
<b>Şekil 4.23.</b> Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için bariyer yüksekliği ile açık ve katlı durumun enerji minimumları arasındaki farkın korelasyonu.....	101
<b>Şekil 4.24.</b> Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için bariyer yüksekliği ile katlı durum enerjisi arasındaki korelasyon.....	102
<b>Şekil 4.25.</b> Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için bariyer yüksekliği ile amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerji değeri arasındaki korelasyon.....	104

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> 20 standart amino asitin adları ve farklı kısaltılmış gösterimleri.....	4
<b>Çizelge 3.1.</b> Miyazawa-Jernigan etkileşim potansiyeli.....	51
<b>Çizelge 3.2.</b> Miyazawa-Jernigan etkileşim potansiyel değerlerinin ortalaması sıfır olduğu durum.....	52
<b>Çizelge 4.1.</b> 1BBL ve 1RLQ proteini için hesaplanan termodinamiksel parametreler.....	73
<b>Çizelge 4.2.</b> Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi.....	78
<b>Çizelge 4.3.</b> Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması.....	80
<b>Çizelge 4.4</b> Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi.....	81
<b>Çizelge 4.5.</b> Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması.....	82
<b>Çizelge 4.6.</b> Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeline göre elde edilen parametrelerin gösterimi.....	83
<b>Çizelge 4.7.</b> Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması.....	84
<b>Çizelge 4.8.</b> Tüm protein aileleri için, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olduğu Gō modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi.....	86
<b>Çizelge 4.9.</b> Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması.....	87

## 1. GİRİŞ

Proteinler, tüm canlı organizmalarında var olan ve hayati aktivitelerden sorumlu biyolojik moleküllerdir. Bu anlamda yaşamın temelini oluşturmaktadırlar. Proteinler, enzimatik katalizden, hücreler arası sinyal iletimine kadar uzanan birçok biyolojik fonksiyonu yerine getirmektedirler. Proteinlerin eksiksiz bir şekilde bu işlemleri yapabilmeleri için; biyolojik olarak aktif üç boyutta kararlı yapılarına ulaşmaları yani katlanmaları gerekmektedir. Bir proteinin birçok olası konfigürasyon arasından tam olarak doğru katlanmış yapıya nasıl ulaşabildiği sorusu hem çok şaşırtıcı hem de her geçen gün önemi daha da artmakta olan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bilim adamları artık Alzheimer (hafıza kaybı) hastalığından çeşitli kanser türlerine kadar uzanan kalıtsal hastalıkların temelinde proteinlerin yanlış katlanması veya yanlış bir araya gelmesinin olduğunu belirlemişlerdir. Tüm bu durumlar göz önüne alındığı zaman bu hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi ve tedavi sürecinde yararlı olabilecek ilaçların tasarlanabilmesi noktasında, farklı bilim dallarını içine alan disiplinler arası bir çalışma mekanizması içerisinde bu problem araştırılmaktadır. Bu anlamda, biyolojik sistemlerin incelenmesi, biyoinformatik teknolojilerinin kullanımı ile yeni bir boyut kazanmış durumdadır. Ancak yine de proteinlerin sahip olduğu bu karmaşık yapıyı ve etkileşim çeşitliliğini tam olarak gösterebilen bir potansiyel halen geliştirilememiştir. Deneysel anlamda da birçok farklı gözlem tekniği (NMR, X-Ray,...) ile zincir bilgisi elde edilen milyonlarca protein olsa dahi bunların yapı ve fonksiyonları hakkında geçerli bilgiye henüz sahip değiliz.

Proteinlerin katlanma mekanizmasını belirleyen etkileşimlerin doğasını anlayabilmek için yapılan çalışmaların başında, yarım yüzyıl önce Linus Pauling'in gerçekleştirdiği amino asitlerin  $\alpha$  sarmal ve  $\beta$  tabaka yapılarının oldukça temel düzenlemeleri ile John Kendrew'in 1960'lı yıllarda ilk kez proteinlerin 3 boyutlu yapısını X-Ray kristalografi ile belirlemesi ve sonrasında Anfinsen'in deneysel olarak yaptığı çalışmalarda proteinin birincil yapı zincir bilgisinin üç boyutlu yapısının tahmininde yeterli olduğunu göstermesiyle hızla ilerleyen bu sürecin ilk adımları atılmış olmaktadır (Kendrew 1962;

Anfinsen 1973; Thomasson 1996). Günümüzde ise; artık yapılan çalışmalarda deneysel verilerle karşılaştırma imkanı bulunan öncelikle küçük tek bölgeli proteinlerin katlanma ve açılma geçişlerinin incelenmesiyle, termodinamik ve kinetik özellikler hakkında bilgi sahibi olabilmek için simülasyon metodlarının katkılarıyla basitleştirilmiş modellemeler kullanılmaktadır. Katlı yapının topolojisi kullanılmak suretiyle yani proteinin katlanmış yapısında birbirleriyle etkileşen amino asitler arasındaki kontaklar belirli kriterlere göre seçilerek model tahminleri yapılmıştır. Minimalist bir yaklaşımla oluşturulan protein modellerinde önemli olan protein fonksiyonunun temel belirleyicisi olan dinamik davranışların gerçeğe en yakın haliyle evrensel bir bakış açısı ile betimlemektir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan modellerin başında G $\phi$  modeli olarak bilinen proteinin kristal yapı bilgisi baz alınarak etkileşimlerin katlı durum etrafında merkezlendiği ve kontak tanımlarının belirli uzaysal mesafelerde yapıldığı model yaklaşımı yaklaşık olarak son 15 yıldan beri tercih edilmektedir. Bu model, bir milat olarak kabul edilirse öncesinde kullanılan modellerin eksik tarafları rahatlıkla anlaşılırken daha global bir modelleme için gerekli olan parametrik ve etkileşimsel farklılıklar ise belirlenebilir. Şu ana kadar bu model üzerine yapılan çalışmalar bir örnek (Uniform) etkileşimler göz önüne alınmıştır. Yani amino asitlerin fizikokimyasal etkileri göz ardı edilmiştir. Yine de zincir-yapı-fonksiyon üçgeninde önemli bilgiler ortaya çıkarılmıştır (Pande and Rokhsar 1998; Kaya and Chan 2000; Kaya and Chan 2002; Chan *et al.* 2003; Kaya *et al.* 2004; Knott *et al.* 2004; Karplus and Kuriyan 2005). Ayrıca proteinlerin sahip oldukları birçok fonksiyonun sıcaklıkla beraber ani değişimler yani kooperatif davranışlar göstermeleri dikkat çekicidir. Kooperatif gözlemler, iki durum yaklaşımlarının ortaya çıkmasına yol açarak protein katlanmasının termodinamiğinin ve kararlılıklarının incelenebilmesi için bir referans noktası olarak alınmaktadır (Zhou *et al.* 1999). İki durumlu proteinlerin katlanma oranları ile bazı tanımlanan topolojik parametreler arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Bu çalışmalar ile katlanma mekanizmasının belirlenmesinde topolojinin en önemli etkenlerden biri olduğu sonucuna varılmıştır (Eaton 1999; Clementi *et al.* 2000). Termodinamiksel olarak iki durumlu bir şekilde katlanan proteinler, geçiş durum konformasyonlarının yapısı ve termodinamiklerini açıklamada başarı göstermiştir. Birçok teorik ve deneysel çalışmalar, geçiş durum topluluğunun yapısal karakterizasyonunu anlamaya

odaklanmıştır. Deneysel olarak geçiş durum topluluklarının yapısını  $\Phi$  değeri analizi ile incelemek mümkündür. Bu analiz mutasyona uğramış ve doğal yapıda (Wild-Type) bulunan proteinler arasındaki serbest enerji değişimleri belirlenerek yapılmaktadır.  $\Phi$  değeri deneysel ölçümlerle teorik olarak tasarlanan modellerin tahminlerini karşılaştırmak için önemli bir yoldur (Matouschek *et al.* 1989; Fersht *et al.* 1992; Weikl *et al.* 2007). Protein katlanması sürecinde katlı (Native) ve açık (Denatured) durum popülasyonlarını birbirinden ayıran serbest enerji bariyerinin düşük veya hiç olmadığı yani bariyersiz (Downhill) veya tek durumlu geçişlerde konformasyonların hepsi spektroskopik olarak karakterize edilerek dedekte edilebilmektedir (Eaton 1999). Aynı zamanda tek durumlu geçişler protein katlanmasının enerji yüzeyi analizinin teorik tahminlerinden biridir. Şu an geçerliliğini koruyan ortak görüş, ara durumların yapısal karakterizasyonunun temel mekanizmayı anlamamızda bize ipuçları sağlayacağı yönündedir.

Bu tez çalışmasında amaçlanan farklı özelliklere sahip modeller yardımıyla küçük, tek bölge ve farklı topolojilere sahip çeşitli proteinlerin kooperatif ve kooperatif olmayan davranışlarını ve termodinamiklerini incelemektir. Bu incelemelerin gerçekleşmesinde protein katlanmasının karmaşık sürecini anlamak için geliştirilen modellerde teorik veya bilgisayarla hesaplamalı istatistiksel yaklaşım metodları gerekmektedir. Bu bağlamda farklı özelliklere sahip 4 ayrı modelleme yaparak analitik bir yaklaşımla çözümlenmesi zaten çok zor olan bu problemi bilgisayar simülasyonlarıyla çözüme ulaştırmaya çalışmaktayız. Bu çalışmayı detaylı kılan en önemli unsur; amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerinin dikkate alındığı heterojen etkileşimli G $\phi$  modeli yaklaşımının ileri sürülmesidir. Böylece proteinleri daha gerçekçi yaklaşımlarla tasvir etme yolunda önemli bir adım atılmış olmaktadır. Bu yolla deterministik bir teknik olan moleküler dinamik simülasyon metodunu potansiyel fonksiyonlarından dolayısıyla kuvvet alanların hesaplamalarını yapmak ve doğru etkileşimleri tanımlayabilmek için spesifik olarak hazır programlardan faydalanılmadan oluşturulmuş C++ programlama dilinde yazılmış özel bir algoritma kullandık. Bu yolla elde edilen verilerle termodinamiksel analizler yapılmıştır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

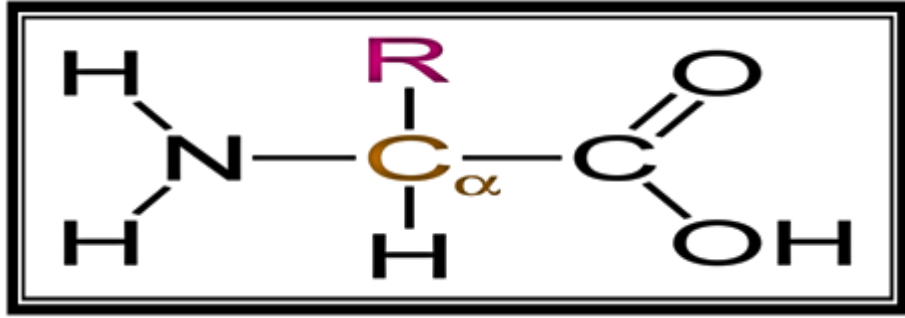
### 2.1. Amino Asitler ve Özellikleri

Amino asitler proteinlerin temel yapıtaşlarıdır. Proteinler, amino asit zincirlerinin meydana getirdiği oldukça karmaşık yapılardır. Proteinlerin üç boyutlu yapısını ve fonksiyonlarının bir çoğunu, büyük ölçüde bileşimlerindeki amino asitlerin türleri, polipeptid zincirindeki diziliş sıraları ve herbir amino asitin bir diğeri ile olan etkileşimleri ortaya çıkarmaktadır. Doğada 300'e yakın farklı amino asit bulunmaktadır. Proteinlerin yapısına katılan 20 temel amino asit bulunur. Proteinlerin yapısında etkin rol oynayan bu 20 temel amino asit standart amino asitler olarak bilinirler. Üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler. Çizelge 2.1'de bu gösterimler sunulmuştur.

**Çizelge 2.1.** 20 standart amino asitin adları ve farklı kısaltılmış gösterimleri

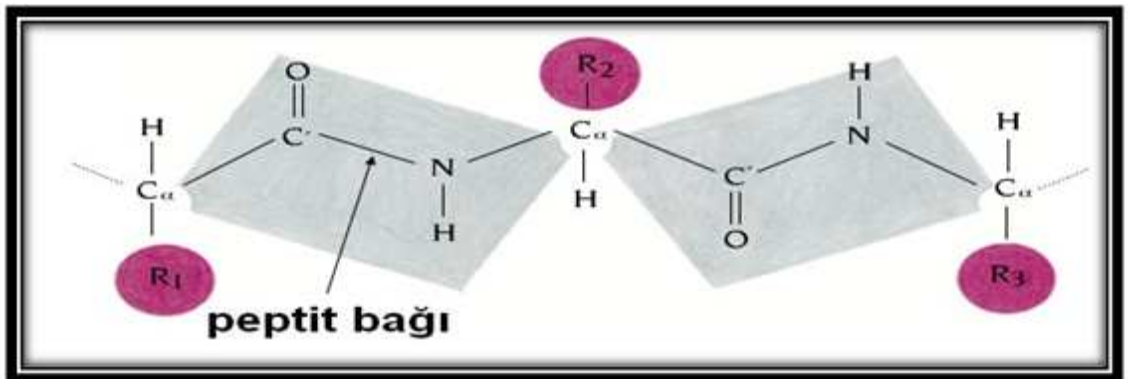
Amino Asit Adı	Üç Harfli Kısaltma	Tek Harfli Kısaltma	Amino Asit Adı	Üç Harfli Kısaltma	Tek Harfli Kısaltma
Alanin	Ala	A	Lösin	Leu	L
Arjinin	Arg	R	Lisin	Lys	K
Asparajin	Asn	N	Metiyonin	Met	M
Aspartik Asit	Asp	D	Fenilalanin	Phe	F
Sistein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
GlutamikAsit	Glu	E	Treonin	Thr	T
Glisin	Gly	G	Triptofan	Trp	W
Histidin	His	H	Tirozin	Tyr	V
İzolösin	Ile	I	Valin	Val	Y

Standart bir amino asit; amino grubu (-NH<sub>2</sub>), karboksil grubu (-COOH) ve her amino asit için farklı özellikte olan kenar zincirden (R) oluşmaktadır. Ayrıca (-COOH) grubu, (-NH<sub>2</sub>) grubu, R grubu ve H atomu  $\alpha$ - karbon atomu ( $C_{\alpha}$ ) olarak adlandırılan karboksil atomuna en yakın 1. Karbon (C) atomuna bağlı bulunmaktadır. Şekil 2.1’de standart bir amino asiti meydana getiren atomlar ve gruplar gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Standart bir amino asitin yapısı

Tüm amino asitler kenar zincirleri (R) dışında aynı yapıyı tekrar ederler. Bu yapı “protein omurgası” (backbone) olarak adlandırılır. Bir amino asitin karboksil grubu ile bir sonraki amino asitin amino grubu arasında oluşan peptid bağlarıyla polipeptid zincirlerini oluştururlar. Şekil 2.2’de peptid bağları ile biraraya gelen polipeptid bir zincir gösterilmektedir.

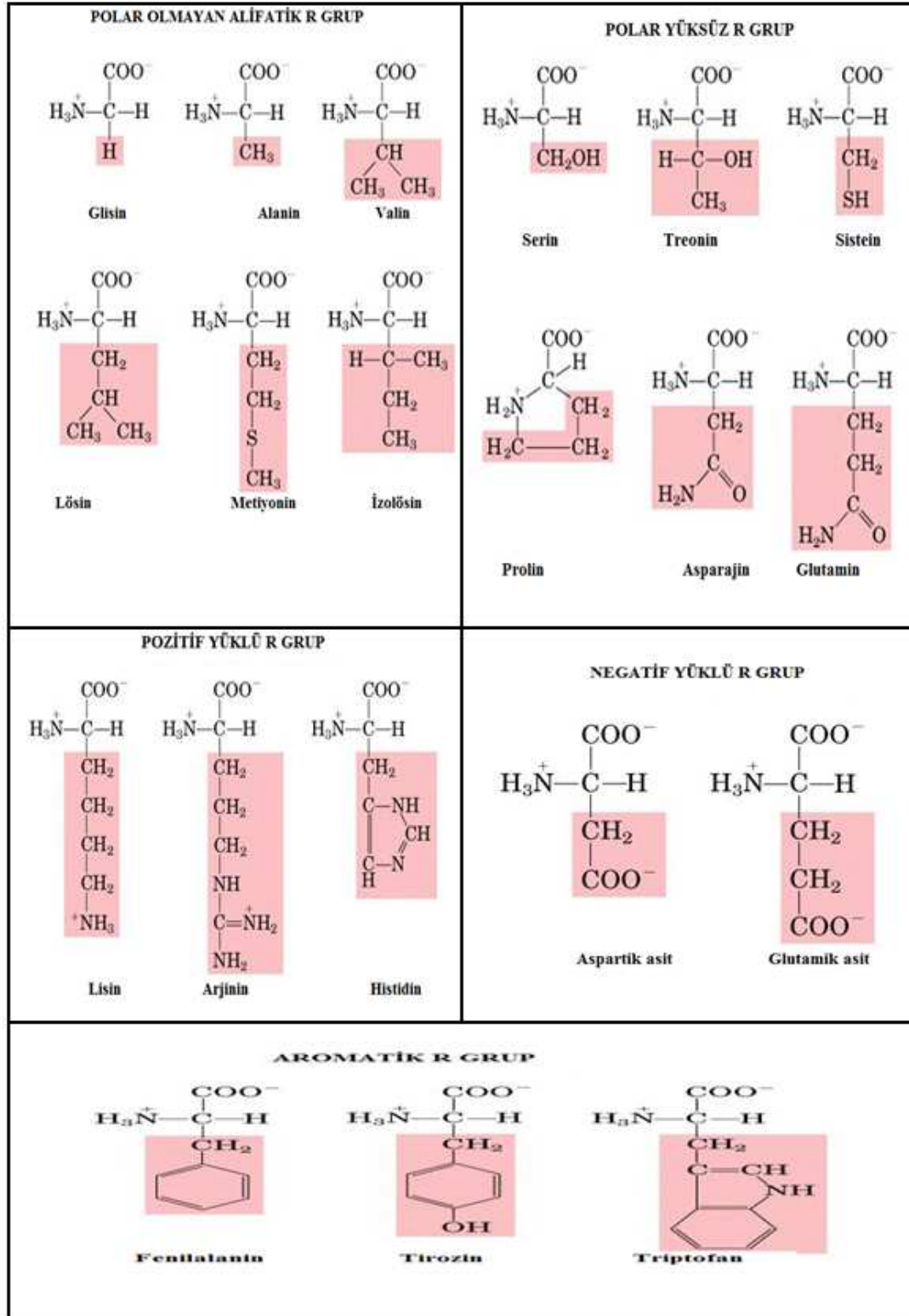


Şekil 2.2. Amino asitler arası peptid bağı oluşumu

Amino asitler sahip oldukarı kenar (yan) zincirlerine (R) göre birbirlerinden farklılaşır. Aynı zamanda sahip oldukları kenar zincirlerin özellikleri, proteinlerin farklı fonksiyonlara sahip olmaları açısından önemlidir. Kenar zincirler, diğer amino asitlerin kenar zincirleriyle etkileşerek hidrofobik bölgeler, elektrostatik bağlar, hidrojen bağları veya disülfid bağları oluşturur (Smith *et al.* 2007). Bu etkileşimler molekülün katlanma modelini belirler. Kenar zincirler polaritelerine veya yapısal özelliklerine göre farklılaşmaktadır. Bu özellikler şu şekilde gruplanabilir:

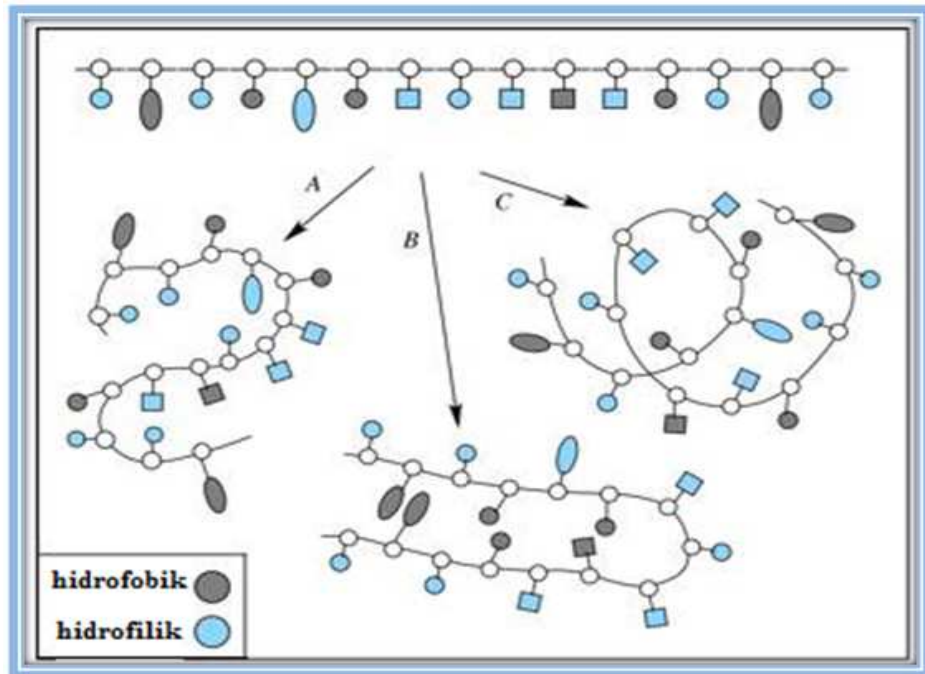
- 1.) Polarite (hidrofobik – hidrofilik veya yüklü)
- 2.) Yük (Pozitif veya Negatif)
- 3.) Kimyasal Özellik (Fonksiyonel Gruplar)
- 4.) Yapı (Alifatik, Aromatik)

Şekil 2.3’de Proteinlerin yapısında bulunan 20 standart amino asit farklı özelliklerine göre gruplandırılmış olup kimyasal formülleri ile karakterize edilmiştir.



Şekil 2.3. 20 standart aminon asitin kenar zincirleri ve kimyasal gösterimleri

Yapısal olarak alifatik grupta olan amino asitler, dallı yan zincirlere sahiptirler. Bu şekildeki yan zincirlerin büyüklüğü arttıkça amino asitlerin sahip olduğu hidrofobik özellikte artış gözlenir. Hidrofobik amino asitler, su ile hidrojen bağı yapma eğilimleri düşük olan amino asitlerdir. Bu şekildeki yan zincirlerde elektronlar, karbon ve hidrojen atomları arasında eşit paylaşıldığı için su ile hidrojen bağı yapamazlar. Proteinler içinde, bu amino asitlerin yan zincirleri biraraya gelerek hidrofobik çekirdek (core) oluştururlar. Bu çekirdekler protein yapısı içerisinde su ile temas etmeyecekleri iç kısımlarda bulunurlar (Smith *et al.* 2007). Aynı şekilde su ile hidrojen bağı yapma eğilimi yüksek olan amino asitlere ise hidrofilik amino asitler denir. Çoğunlukla proteinlerin yüzeylerinde bulunmak isterler. Şekil 2.4’de hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin oluşturduğu zincirin farklı yönelimleri gösterilmektedir. Hidrofobik özellikteki aminoasitlerin üç harfli gösterimleri karakterize edilecek olursa; Val, Leu, Ile, Met ve Phe olarak sıralanırken hidrofilik özellik gösteren yan zincire sahip amino asitler ise; Asn, Glu, Gln, His, Lys, Arg ve Asp olarak sıralanmaktadır. Geriye kalan amino asitler bu özellikleri kısmen göstermektedirler.



**Şekil 2.4.** Hidrofobik ve hidrofilik özelliklere sahip amino asitlerin farklı yönelimleri (Anonim 2009)

Alifatik zincirli amino asitler arasında en dikkat çekici özelliğe sahip olanlar Glisin ve Prolin amino asitleridir. Glisin, en basit yapıya sahip amino asit olup protein yapılarının oluşumunda önemi büyüktür. Proteinin yapısal esnekliğini artıran özellik sergilemektedir. Bu durumun tersi olarak Prolin amino asidi ise proteinin olağan konfigürasyonunu engelleyici davranıştır. Ayrıca pozitif yüklü Lisin amino asiti, negatif yüklü yan zincirlere sahip amino asitler ile oluşturdukları bağlar sayesinde protein molekülünün kararlılığına önemli katkıda bulunmaktadır.

## **2.2. Proteinlerin Yapısı ve Konformasyonu**

Proteinler, en zengin görev çeşitliliğine sahip biyomoleküllerdir. Canlı hücreleri içinde gerçekleşen her süreçte görev almaktadırlar. Proteinler biyolojik katalizden hücre haberleşmesine kadar birçok çeşitli fonksiyona sahiptirler. Proteinlerdeki bu çeşitliliğin nedeni; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) yapı olarak tanımlanan dört hiyerarşik yapısal organizasyona sahip olmalarıdır (Onat vd 2002). Birincil (primer) yapı, amino asitlerin polipeptid zinciri boyunca lineer bir şekilde dizilimidir. Protein bu yapıyı, kovalent bağlı belirli türdeki her bir amino asitin peptid bağları yardımıyla bir araya gelmesiyle oluşturur (Whitford, 2005). Amino asitlerin sıralaması her protein için spesifiktir. Primer yapı genetik olarak kontrol edilmekte olan tek yapı olup bir proteinin sekonder, tersiyer ve kuarterner yapılarını belirlemektedir (Onat vd 2002).

Birincil yapı, proteinlerin sekonder yapısının oluşumuna öncülük eder. Kovalent olmayan bağlar sayesinde belirlenen kararlı konformasyonlara ikincil (sekonder) yapı denir. Polipeptid zincirlerinin yerel konformasyonları, amino asitlerin farklı uzaysal yakınlıkları, yani gelişigüzel helezonik kıvrılmalar ve periyodik olarak tekrarlanan çeşitli yapılardan meydana gelmektedir.

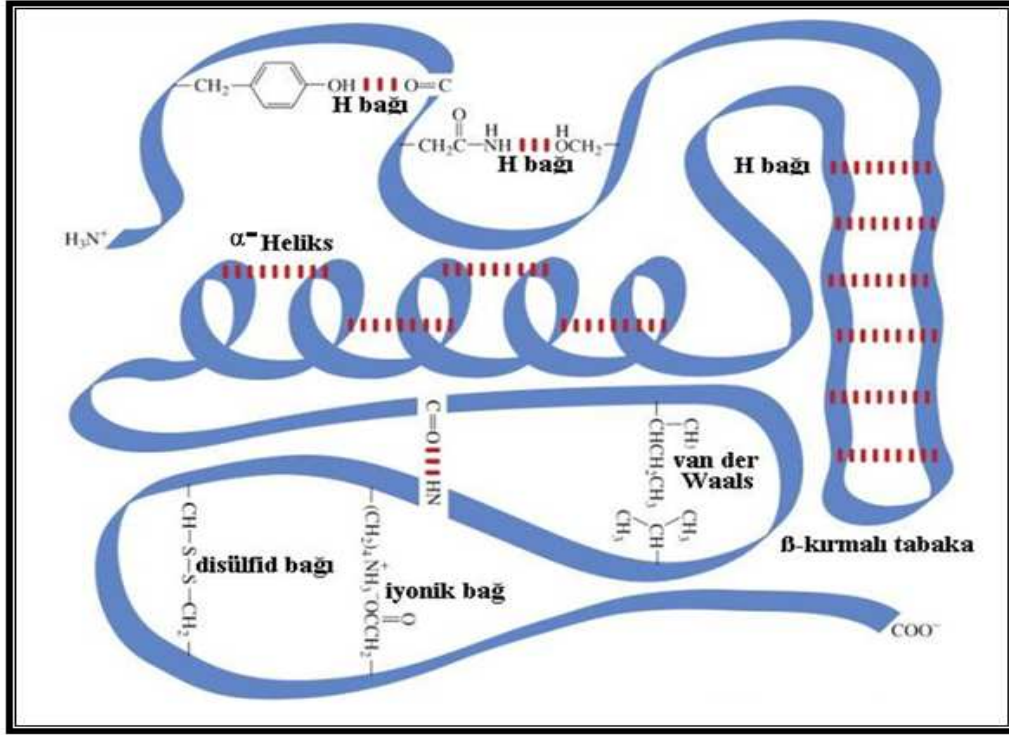
Globüler yapıdaki proteinlerde ikincil yapıyı oluşturan üç temel bileşen vardır:

- 1.)  $\alpha$ - sarmal yapılar
- 2.)  $\beta$  kırmalı tabaka yapılar
- 3.)  $\beta$  kıvrım yapılar

$\alpha$  sarmal yapılar, polipeptid zincirinin bir ana eksen etrafında kıvrılması ve periyodik bir şekilde kendini tekrarlaması sonucu oluşur. Kenar zincirler sarmal yapısının merkezinden dışa doğru bir şekilde yönelmiştir. Proteinleri oluşturan polipeptid zincirlerinin yerel katlanmalarından oluşan sarmal yapılar, neredeyse tüm globüler proteinlerde bulunmaktadır.  $\alpha$  sarmalların yapısal basitliği ve her yerde bulunma özelliği, protein katlanması ve kararlılığında karmaşık enerjetik faktörleri içeren niceliksel çalışmaların detaylandırılması için ideal bir adaydır. Çoğunlukla, proteinlerdeki sarmal yapıları 5-14 amino asit aralığında değişmektedir.  $\beta$  kırmalı tabaka yapıları ise 2 ila 5 polipeptid zincirinin paralel ya da antiparalel bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşur (Whitford 2005). Kenar zincirler, tabaka düzleminin ya alt ya da üst bölümünde yer almaktadır. Proteinlerdeki bu iki yapı  $\beta$  kıvrım yapıları yardımıyla birbirlerine bağlanmaktadır. Kıvrım yapılar zincirlerin yönlerini değiştirici etkilerde bulunmaktadır.

Proteinlerin ikincil yapılarında birçok kuvvet mevcuttur. Bu kuvvetler, proteinin yapısına büyük miktarda esneklik ve kararlılık kazandırmaktadır. Bunlar hidrofobik etkileşimler, proteinlerin çoğunlukla yüzey kısımlarında gerçekleşen zıt yüklü gruplar arasındaki elektrostatik (tuz bağlar) ve birbirlerine yakın pozisyonda bulunan atomların yörüngelerindeki aynı yüklü dipollerin birbirini itmesi, zıt yüklü dipollerin birbirini çekmesi şeklinde oluşan Van Der Waals etkileşimleri olarak sıralanabilir. Ayrıca hidrojen bağları,  $\alpha$  sarmal yapılarının kararlılığında önemli rol oynar. Ayrıca paralel ve paralel olmayan  $\beta$  kırmalı tabakaların  $\beta$  kıvrımlarıyla olan etkileşimlerinde varlık göstererek katlanmış yapının kararlılığını belirleyen unsurlar arasında yer alır.

(Whitford 2005). Şekil 2.5’de bir protein zincirinde oluşan bağlar, alfa ve beta yapılar gösterilmektedir.



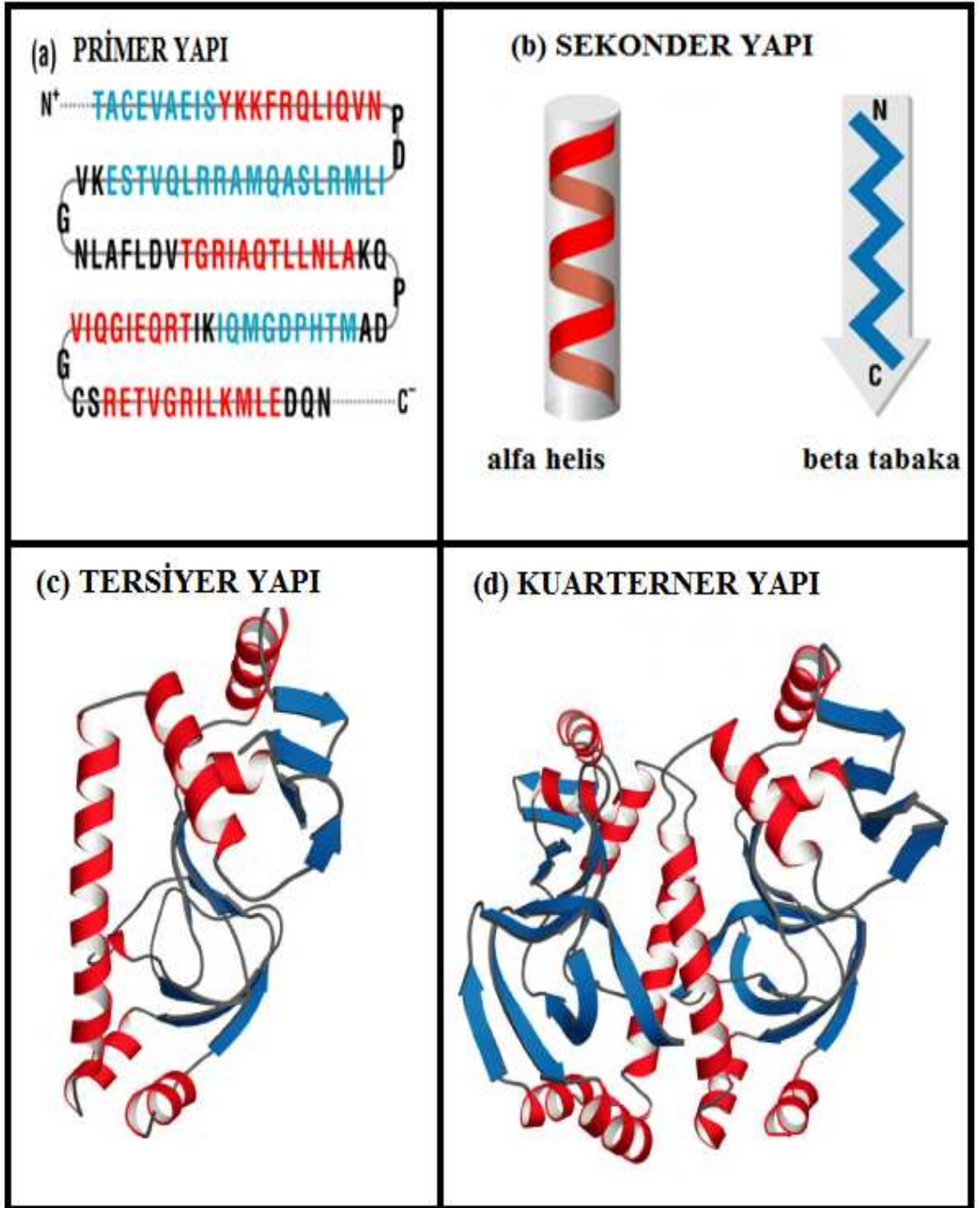
Şekil 2.5. Protein zincirinde oluşan bağların gösterimi (Anonim 2009)

Proteinler, ikincil yapıları ile kazandıkları şekillenimlerden sonra birbirine yaklaşan veya uzaklaşan amino asitlerin etkisiyle katlanmaya veya ani dönüşler yapmak suretiyle yepyeni üç boyutlu yapılar haline dönüşmektedirler. Bu yapılar üçüncül (tersiyer) yapılar denir. Bir proteinin tersiyer düzenlenimi, polipeptid zincirin termodinamik olarak en dayanıklı şekli olmasına rağmen esnek bir yapıdır. Tersiyer yapı proteinin fonksiyonel karakterini belirlemektedir (Murray *et al.* 2004).

Alt birimleri olan iki veya daha fazla polipeptitten oluşmuş proteinlerin göstermiş olduğu yapısal organizasyon dördüncül (kuarterner) yapı olarak tanımlanmaktadır. Kuarterner yapıları, proteinlerin birbiri ile benzer veya benzer olmayan alt birimlerinin biraraya gelmesi olarak da adlandırabiliriz (Onat vd 2002). Şekil 2.6’da proteinlerin



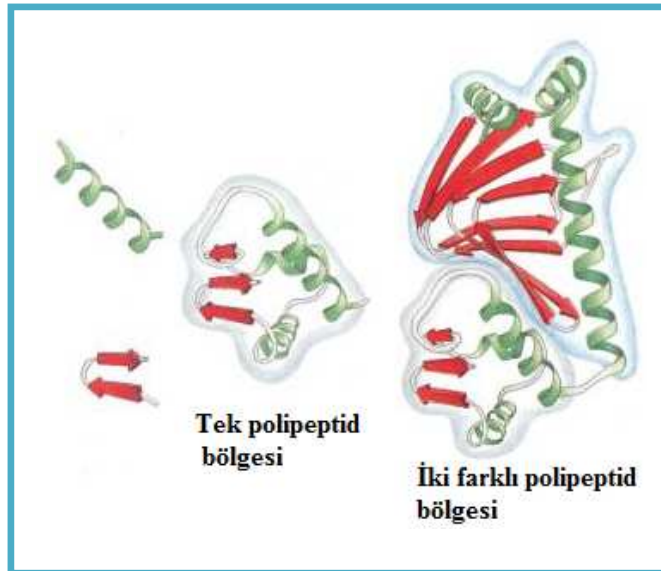
sahip olduğu 4 ayrı yapısal durum gösterilmektedir. Proteinlerin çatısını oluşturan bu dört aşamalı duruma ek olarak, proteinler işlevlerini gerçekleştirirken birbirleriyle ilişkili bir yapıdan başka bir yapıya geçmeleri de protein yapısının başka bir boyutunu oluşturmaktadır. Bir proteinin yapısını meydana getiren tüm atomlar topluluğunun üç boyutlu uzaydaki herhangi bir yapısal konumuna proteinin konformasyonu denir. Konformasyon, bir proteinin üç boyuttaki yapısını belirtmekte olup bu yolla, bütün atomların diğerlerinin tümü ile uzamsal ilişkileri ifade edilmektedir (Murray *et al.* 2004). Bu noktada göz önüne aldığımız protein molekülleri için konformasyon ve konfigürasyon terimlerini birbirlerinden ayırmak faydalı olacaktır. Konfigürasyon, genel olarak belli bir atom grubundan oluşan bir bölgesinin kendi arasındaki geometrik durumudur. Çeşitli konfigürasyonlar arasındaki dönüşüm yalnızca kovalent bağların kopması veya yeniden oluşması ile sağlanmaktadır. Konformasyonların birbirleri arasındaki dönüşümler ise; sadece kovalent bağların kopması ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda da belli bir konformasyonu kararlı duruma getirmekle sorumlu olan hidrojen bağları, tuz bağları..vb gibi kovalent olmayan bağların veya kuvvetlerin ayrılması veya yeniden biraraya gelmesi gibi süreçleri de içine almaktadır (Murray *et al.* 2004). Teorik olarak gerçekleşmesi mümkün olan çok sayıdaki konformasyonların, biyolojik şartlar altında bazen sadece bir veya ikisi baskın olabilmektedir.



Şekil 2.6. Proteinlerin 4 ayrı yapısının gösterimi (Petsko and Ringe 2004)





### 2.3. Protein Zincir Uzunlukları ve Farklı Protein Aileleri

Yaklaşık olarak 150 amino asitten daha büyük olan proteinler için tersiyer yapı, bir veya daha fazla yapısal birim etrafında organize olabilir ( Whitford 2005). Buradaki her bir yapısal birim, bölge (domain) olarak adlandırılır. Şekil 2.7’de gösterilen bu bölgeler, farklı katlanma yapılarına sahiptirler. Farklı protein bölgelerinden oluşan yapılarda her bir bölge, bağımsız olarak katlanabilen kararlı yapı birimleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Aynı zamanda bu bölgelerin analizi, bize proteinin yapısı ve fonksiyonu hakkında bilgi vermektedir. Protein bölgelerinin genişliği, yaklaşık 25 amino asit ile 500 amino asit aralığında değişim göstermektedir. 300 amino asitten büyük bölgeler, genellikle çoklu hidrofobik çekirdek bölgeleri içermektedirler. Proteinlerin hangi bölgelerden oluştuğunun bilinmesi, yapısal özelliklerin incelendiği çeşitli deneysel metodların kullanımı için önemlidir. NMR ve X-Ray kristalografi yöntemlerinde incelenecek olan proteinin büyüklüğünün bilinmesi gerekir. Küçük bölgelerden oluşan birimlerin çözümlenmesi, çoklu bölgelerden oluşan yapıları incelemekten daha kolaydır.



Şekil 2.7. Proteinlerin tek ve iki bölgeli gösterimi

Bölgeleri içerikleri açısından tamamen  $\alpha$  sarmal, tamamen  $\beta$  tabakası ve her ikisinin bir arada bulunduğu ( $\alpha+\beta$  ve  $\alpha/\beta$ ) üç temel sınıfta toplayabiliriz. Bu sınıflandırma, aynı zamanda protein ailelerinin gruplandırılması için de kullanılmaktadır. Polipeptid zincirinin bir eksen etrafında sağa ve sola kıvrılarak oluşturduğu sarmal yapıların oluşturduğu tamamen  $\alpha$  proteinlerindeki zincir içi hidrojen bağları, yapıyı kararlı hale getirmektedir. Ayrıca bu tür yapılarda atomlar birbirlerine Van der Waals yarıçapı mesafesinde yaklaşmakta ve son derece sıkı bir yapılanma içinde bulunmaktadırlar (Onat vd 2002). Tamamen  $\beta$  tabakalarından meydana gelen protein ailelerinde, farklı polipeptid zincirleri arasında oluşabilecekleri gibi aynı polipeptid zincirinin kendi üzerine katlanma noktalarındaki uygun amino asitler arasında paralel veya antiparalel tabakalar olarak oluşabilirler.  $\alpha/\beta$  protein ailesinin  $\alpha+\beta$  ailesinden farkı,  $\beta$  tabakalarının birbirlerine paralel bir şekilde yapılanmış olmasıdır.

4 FARKLI PROTEİN AİLESİ			
TAMAMEN ALFA (PDB Kodu: 1BBL)	TAMAMEN BETA (PDB Kodu: 1SHG)	ALFA+BETA (PDB Kodu: 1UBQ)	ALFA/BETA (PDB Kodu: 1MLA)
			

**Şekil 2.8.** Protein veri bankasından elde edilen PDB kodlarına göre yazılmış farklı proteinler

Şekil 2.8'de protein veri bankası kullanılarak elde edilmiş 3 boyutta protein yapıları gösterilmiştir. Protein veri bankasına ek olarak proteinlerin yapısal olarak

sınıflandırıldığı “SCOP” (Structural Classification of Proteins Database) adı verilen bir veri tabanı çok sık olarak kullanılmaktadır. Burada yapıları bilinen proteinlerin evrimsel ilişkilerini ve yapısal tanımlamalarının anlaşılmasında detaylı bilgi sunulmaktadır. SCOP, proteinleri kategorize etmek için sınıf, katlanma, süper aile ve aile gibi 4 hiyerarşik sınıflandırma seviyesi kullanmaktadır (Murzin *et al.* 1995).

#### **2.4. Protein Katlanması**

Bir polipeptid zincirinin kendine has olan bir karakteristikte aldığı şekillenim sürecine protein katlanması denir. Proteinin bu hali katlı (native) yapı olarak adlandırılır. Proteinler gibi biyolojik moleküller, genellikle çeşitli fonksiyonlarını yerine getirebilmek için katlı duruma geçmeye ihtiyaç duyarlar. Buradaki temel soru, amino asitlerin tek boyutta diziliminden katlanmış yapısını nasıl bulduğu sorusudur. Proteinlerin katlanmasının nasıl olduğunu anlamak için yapılan ilk çalışmalarda, bir proteinin topaklanma yani katlanma sürecinin denaturasyon ve çökelme olarak nitelenen iki aşama geçirdiği anlaşılmıştır. Anson and Mirsky (1931) denaturasyon sürecinin tersinir olduğunu ayrıca denaturasyonun iki durumlu yani ya “var” ya “yok” olarak adlandırılacak bir süreç olduğunu ve moleküler geçişler sonucunda kimyasal olarak birçok değişikliğin ortaya çıktığını ifade etmiştir. Ancak o dönemlerdeki şartlarda gözlemlenen değişikliklere sebep olabilecek nedenler hakkında çok az şey bilinmekteydi. İlerleyen süreçte ise artık Anfinsen proteinlerin katlanma mekanizmasını proteinin amino asit diziliminin belirlediğini ve katlanma sırasındaki sıcaklık, çözücü şartları vb. gibi çevresel şartlarda katlanmış yapının tek, kararlı ve minimum serbest enerjiye erişebildiğini çalışmalarında vurgulamıştır (Anfinsen 1973). Protein katlanması ile ilgili olan bu termodinamik hipotezde, proteinin katlanmış hali protein serbest enerjisinin global minimum noktasına karşılık gelmektedir. Bu gözlemlerle her bir proteinin eş amino asit dizisinin onun katlanmış yapısını belirlemede yeterli olduğu tanımlandı. Proteinlerin katlanma hipotezlerinin ortaya atılmasından sonra katlanmış proteinin kararlılığında önemli rol oynayan fiziksel etkileşmelerin doğası araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan bu çalışmaların üzerinden çok fazla zaman geçmeden Levinthal proteinlerin katlanmış yapılarına çok hızlı bir şekilde nasıl ulaşabildikleri sorusuna

cevap aramıştır. Bir proteinin doğru katlanmış yapısını rastgele bir şekilde bulması için geçen sürenin, evrenin şimdiki yaşından daha fazla olduğunu Levinthal Paradoksu ile açıklanmıştır. (Levinthal 1968). Proteinler, mikrosaniye mertebesinde katlanma hızına sahip olması bu sürecin hiç de rastgele olmadığını bizlere göstermektedir.

## 2.5. Protein Katlanmasıyla İlgili Deneysel ve Teorik Çalışmalar

Günümüzde yapılan bilimsel çalışmalar genel olarak üç ana başlık altında toplanır:

I. Deneysel olarak yapılan çalışmalar

II. Teorik (Analitik) olarak yapılan çalışmalar

III. Bilgisayara dayalı (Simülasyonlar) olarak yapılan çalışmalar

Tümdengelimci bir yaklaşımla bilimsel araştırmaların genel olarak sınıflandırdıktan sonra incelediğimiz sistem biyolojik özellikte olduğu için kullanılan metodlarda bazı farklılıklar göze çarpar. Bu sınıflandırma ise ana hatları ile şu şekilde yapılmaktadır:

I. Hücre içi ortamında (*In Vivo*)

II. Deney tüpü ortamında (*In Vitro*)

III. Bilgisayar ortamında (*In Silico*)

Bu sınıflandırmada, canlı organizmalar üzerinde yapılan araştırmalar *in vivo* grubuna girerken, laboratuvarlarda deney tüpü ortamında yapılan çalışmalar *in vitro* olarak adlandırılır. Son zamanlarda ise önemi hızla artan ve kullanma sıklığı bakımından diğerlerinden ayrılan bir diğer metod ise bilgisayara dayalı benzetim metodlarının kullanıldığı *in silico* metodudur. Deneysel teknikler üzerine yapılan çalışmalar, son yıllarda önemli bir artış göstermiştir. Eş zamanlı olarak protein katlanması incelemelerinde de önemli gelişmeler söz konusudur. İnsan gen haritasının tamamlanmasıyla birlikte hız kazanan biyolojik moleküllerin yapısal incelemeleri sonucunda şu an itibarıyla kristal yapısı bilinen 38858 protein bulunmaktadır (Anonim 2009). Zincir bilgisine sahip olduğumuz proteinlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Ancak hala birçok proteinin yapı ve fonksiyonu hakkında çok az bilgiye sahibiz. Burada

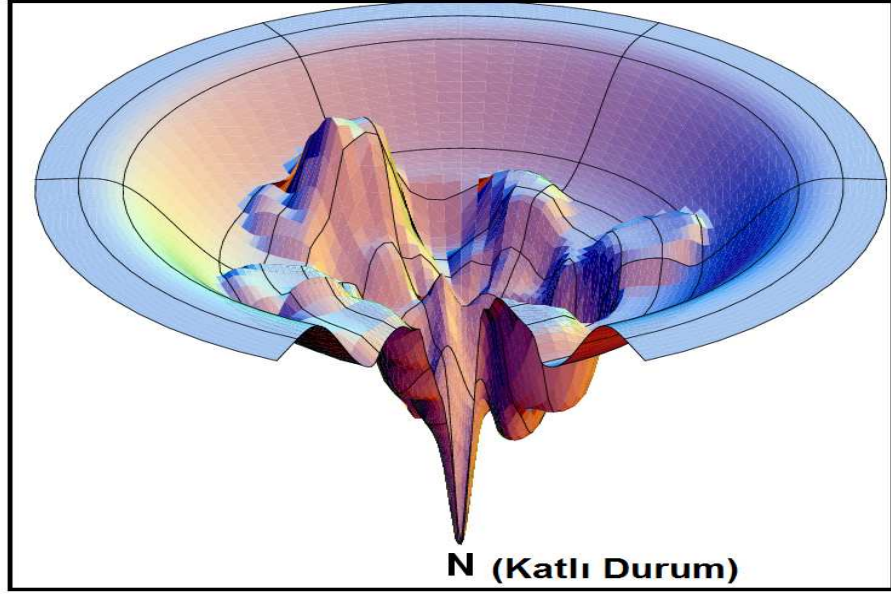
elde edilen bilgilerin istenilen seviyeye ulaştığı zaman, artık birçok biyolojik problemin cevabını bulma noktasında önemli aşamalar kaydedilmiş olacaktır. Bu doğrultuda çalışmalar büyük bir hızla devam ederken, uygulanan bilimsel tekniklerde karşılaşılan çeşitli zorluklar mevcuttur. Deneysel teknikler; oldukça pahalı ve protein katlanma süreci çok hızlı olduğu için konformasyonel geçişleri takip etmek mümkün olmamaktadır. Protein katlanması üzerine yapılan analitik çalışmalarda ise bilinen tüm fiziksel ve kimyasal etkileşim potansiyelleri, proteinlerin canlı organizmada ulaştığı yapıyı bulmakta yetersiz kalmıştır. Bilgisayara dayalı hesaplama metodlarının sağladığı avantajlar ve simülasyon tekniğinde tercih edilen etkileşim potansiyellerinden moleküler dinamik simülasyonları bölümünde detaylı bilgi verilecektir. Ancak üzerinde çalışılan konu, biyolojik bir sistem olup hem kendi içinde hem de çevresel şartların getirdiği çeşitli zorluklar burada söz konusudur. Örneğin; proteinlerde bulunan kovalent bağlardan dolayı sistemin düşük serbestlik derecesine sahip olması birçok davranışın detaylandırılarak incelenmesi noktasında büyük ölçüde sınırlamalar getirmektedir. Proteinleri oluşturan amino asitlerin etkileşim çeşitliliği, incelemeleri zorlaştıran yapısal etkenler arasında ilk sırayı almaktadır. Ayrıca su, tuz, pH, çözücü gibi çevresel ve fizyolojik faktörlere olan hassaslıklar, karşılaşılan teknik zorluklar arasında yerini almaktadır.

## **2.6. Proteinlerin Termodinamiği**

### **2.6.1. Protein Katlanmasında Termodinamik Hal Değişimleri**

İki durumlu davranışa sahip olan sistemler, protein katlanmasını en temel haliyle anlatmaktadır. Bu davranışta katlanma yolu (pathway) boyunca açık, (Unfolded) katlı (Native) ve çok az sayıdaki ara durumlara (Transition State) ait belli bir makroskobik durumla tutarlı mikroskobik durumların tümünü gösteren populasyon yoğunluklarının dağılımları mevcuttur (Jackson 1998). Açık ve katlı durumlara ait yapısal topluluklar, birbirlerinden bir bariyerle ayrılmaktadır. Buradaki her bir konformasyonel topluluk katlanma sürecinin kinetik olarak incelenebildiği huni şeklindeki “Energy Landscape Theory” (Enerji Yüzeyi) ile açıklanır. Şekil 2.9’da enerji yüzeyindeki tümsekler

(tepeler) olarak görülen yerel minimum noktaları, ara durumlar yani geçiş durumlarını gösterir ve katlanma hızını belirler. Bu teoriye göre termal bariyeri belirleyen geçiş durumları farklı konformasyonlara sahiptirler. Huninin genişliği, konformasyonel heterojenlik hakkında bilgi verir (Dill and Chan 1997).



**Şekil 2.9.** Enerji Yüzeyi (Energy Landscape) (Dill and Chan 1997)

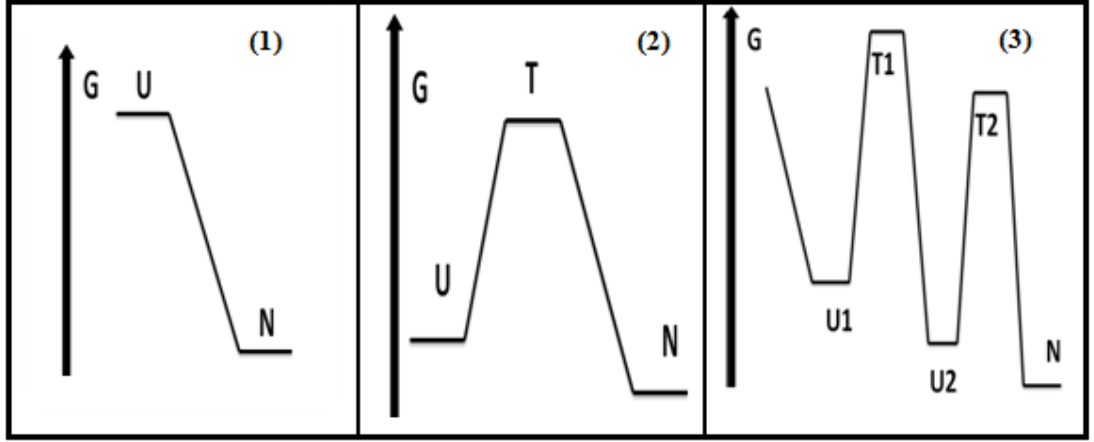
Protein katlanmasının izlediği yol (pathway) geçiş durumlarını anlamak için sayısız teorik ve deneysel çalışmalar hem kinetik hem de termodinamik özellikler incelenmek suretiyle yapılmıştır. Birçok farklı yapıdaki, farklı dizilimdeki ve farklı kararlılık gibi çeşitli niteliklerdeki küçük proteinlerin katlanma durumları incelendiğinde çoğunlukla iki durumlu katlanma özelliğine sahip olduklarını biliyoruz. Hızlı katlanan küçük bir protein olan Chymotrypsin Inhibitor-2'nin (2ci2) herhangi bir ara durum popülasyonunda bulunmadan hızlı bir şekilde katlanabildiği gösterilmiştir (Jackson ve Fersht 1991). İstatistiksel enerji yüzeyi yaklaşımı ile iki durumlu geçişler hakkında bilgi sağlanmıştır (Bryngelson *et al.* 1994). Ayrıca basit iki durum davranışı gösteren proteinlerin sınırlı sayıda biraraya gelmiş ara durumlar aracılığıyla katlandığı gösterilmiştir (Fersht 2000).



Şekil 2.10'da (1) ile gösterilen grafik, amino asit sayısının genellikle 60'tan küçük olduğu proteinler için tek durumlu geçişleri, (2) ile gösterilen grafik amino asit sayısının yaklaşık olarak 100'den küçük olduğu proteinler için iki durumlu davranışı son olarak (3)'te ise amino asit sayısı yaklaşık olarak 100'den büyük olan proteinler için çoklu durum geçişlerini göstermektedir. Ayrıca açık (U) ve katlı (N) durumlarını gösteren topluluklar arasındaki tepe katlanma bariyeridir. Katlanma bariyeri, çok sayıda kısa ömürlü geçiş durum yapılarını içerir. Bu yapıların her biri, katlanma süreci boyunca oluşma ihtimaliyeti eşit olan kısmen açık veya katlı yapılardan oluşmaktadır. Geçiş durumu yapıları, yüksek bir kararsızlığa sahip oldukları için direkt olarak gözlemlenmeleri zordur. (Weikl 2007). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda iki durumlu katlanmaları incelemek için aynı proteinin mutasyona uğramış halinden faydalanırlar. Mutasyonlar, genel olarak sadece bir amino asit ile orjinal (Wild-type) proteinden farklılaşmaktadır. Ancak az miktarda geçiş durum bariyeri değişir. Yer değiştiren bariyer ile deneysel olarak orjinal ve mutasyona uğramış proteinin katlanma zamanları belirlenerek  $\Phi$  değeri analizleri yapılabilir.

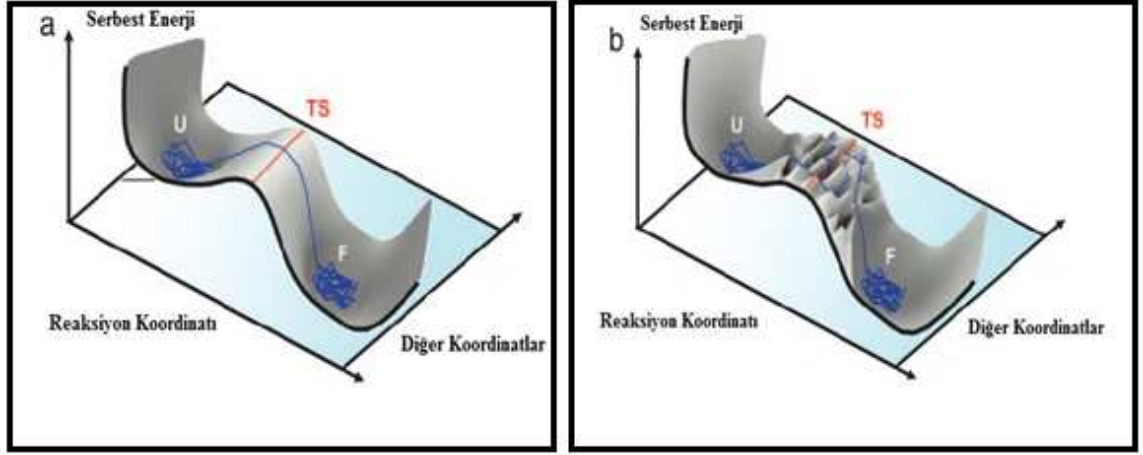
Açık ve katlı durumlar arasında bariyerin bulunmadığı katlanma, bariyersiz (Downhill) veya tek durumlu katlanma olarak adlandırılmaktadır. Global bariyersiz katlanma terimi ise protein katlanmasının, tüm şartlar altında serbest enerji bariyeri olmaksızın gerçekleştiği duruma karşılık gelmektedir. İki durumlu katlanmanın bariyersiz katlanmadan farkı dereceli bir şekilde katlanmış yapıdan açık yapıya doğru azalan bir kararlılıkla değişen tek bir termodinamik duruma sahip olmasıdır. Ayrıca bariyersiz katlanma, açık durumdan katlı duruma doğru olan yollarda ara durum yapılarını gözlemlemeye izin vermektedir. Bariyersiz katlanma, enerji yüzey teorisinin en önemli kestirimlerinden biridir. Bu teori, belirli şartlar altında (sıcaklık, çözücü, vb.) katlanmanın bariyersiz olarak ilerleyebileceğini tahmin etmektedir (downhill scenario). Bu işlemde protein katlanırken dikkate değer makroskopik bir boyutta herhangi bir serbest enerji bariyeri ile karşılaşmaz (Eaton 1999). Enerji yüzeyi teoremine göre herhangi bir çözücünün olmadığı veya düşük sıcaklıklarda katlı duruma doğru bir enerji eğilimi olduğunda açık ve katlı durumlar arasında enerji bariyeri azalır. Bu gibi şartlar altında katlanma süresince, geniş dağılımlı geçici konformasyonlar dizisi boyunca

ilerleyen iki durum katlanmaları ve ardışık ara durum modellerinin bariyersiz katlanma durumuna dönüştüğü düşünülmektedir (Bryngelson *et al.* 1994). Bariyersiz katlanma, çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Katlanma hız limiti protein dizisi ve yapısına bağlı olarak değişmektedir. Yaklaşık olarak  $N/100$   $\mu$ s'dir (N: amino asit sayısı) (Kubelka *et al.* 2004). Protein katlanma çalışmalarında katlanma hız limitinin belirlenmesi, katlanma mekanizmasının bilinmesi ve deneylerle simülasyonların karşılaştırılmasının yapılması açısından önemlidir. Hızlı katlanan proteinlerde görülen bariyerin ortadan kalkması, katlanmanın öngörülen zamanının belirlenmesine izin verir. Hızlı katlanan proteinler, global bariyersiz katlanmanın gözlemlenebileceği potansiyel adaylardır (Zhang 2008). Garcia-Mira *et al.* (2002)' de BBL olarak isimlendirilen yaklaşık 40 amino asite sahip PSBD (Peripheral Subunit Binding Domain) bölgesi Escherichia Coli's 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzim kompleksi, spektroskopik ve kalorimetrik tekniklerden oluşan bir kombinasyon çalışma ile deneysel olarak bariyersiz bir şekilde katlandığını göstermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan her bir deneysel teknik, incelenen proteinin farklı bir özelliğini göz önüne almaktadır. Diferansiyel kalorimetri tekniği ile (DSC) enerjetik ölçümler yapılırken floresans enerji transfer (FRET) ile 2 alfa sarmal yapısından oluşan proteinin uçtan uca mesafeleri belirlenmiştir. Böylelikle BBL'nin zengin konformasyonel değişimlerindeki global dalgalanmalarda incelenmiştir. Sadqi *et al.* (2006)' da NMR tekniği ile pH 5.3'Naf-BBL'nin farklı termal atomik ölçeklerde yapılan incelemelerde bariyersiz katlanma gözlenmiştir. Doğal olarak bariyersiz davranış gösteren proteinlerin dışında mutasyonlarla iki durum davranıştan tek durumlu davranışa geçebilen Lambda Repressor (1LMB) proteininde ve WW bölgesi dizilimlerde deneysel olarak downhill davranış gözlenmiştir. PSBD ailelerinin dışında 62 amino asitli protein gpW bariyersiz katlanma için aday bir proteindir (Liu and Gruebele 2007, Badasyan *et al.* 2008). Bunagan *et al.* (2006) çalışmasında, Trp-cage proteininin bariyersiz katlanma için iyi bir aday olduğunu göstermiştir. Küçük boyutlarda olan bu protein çok hızlı katlanabilmektedir.



**Şekil 2.10.** Protein katlanmasında gözlemlenebilen farklı termodinamik geçişler (Weikel 2007)

Proteinlerin katlanma süreci boyunca gözlemlediğimiz termodinamiksel geçişlerin nasıl gerçekleştiğini daha iyi anlayabilmek için seçilen reaksiyon koordinatının uygun olması çok önemlidir. Çünkü katlanma mekanizmasının nasıl gerçekleştiğini anlamak için açık ve katlı durumların popülasyonlarının konumu birbirleriyle olan ilişkilerini açıklanmasında ayrıca ara durum geçişlerindeki sanal olarak ortaya çıkan çoklu durumların gösterimi açısından reaksiyon koordinatının seçimi önemlidir. Protein spesifik modellerde genellikle reaksiyon koordinatı olarak katlı (Native) konformasyona benzerlik parametresi olarak  $Q$  kullanılmaktadır (Kaya and Chan 2003). 0-1 arasında değerlere sahip olan bu parametrede  $Q = 1$  olduğunda katlı yapıyı,  $Q = 0$  olduğu zaman ise hiçbir katlı durum kontaklarının meydana gelmediği düşünülmektedir.  $Q$ , konformasyondaki katlı kontak sayısının, katlanmış yapıdaki toplam konformasyon sayısına olan oranıdır.  $Q = Q_{\text{kontak}}^{\text{katlı}} / Q_{\text{toplam}}^{\text{katlı}}$  şeklinde ifade edilir. Ancak reaksiyon koordinatı olarak  $Q$  parametresinin kullanımı, Şekil 2.11'de b ile gösterilen grafikteki gibi enerji çeşitliliğine yol açmaktadır. Oysa şekil 2.11'de a ile gösterilen geçiş durumunda enerji çeşitliliği gözlemlenmemektedir. Yani aynı  $Q$  parametresine sahip konformasyonlar özellikle geçiş bölgelerinde çok farklı enerji değerlerine sahip olmaktadır. Böylece konformasyon popülasyonu da yüksek olabilmektedir.

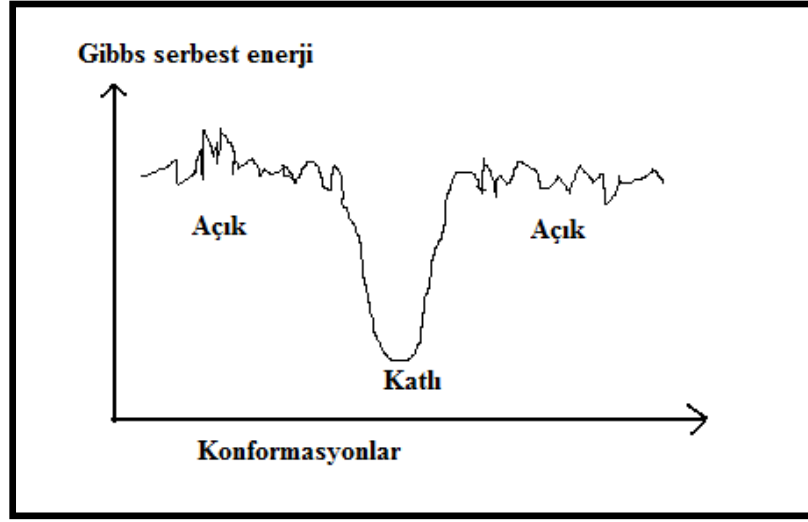


**Şekil 2.11.** Farklı reaksiyon koordinatlarına göre termodinamik geçişler (Cho *et al.* 2006)

### 2.6.2. Proteinlerin Kararlılığı

Protein molekülleri için kararlılık, yapısal olarak en düşük enerjili durumunu devam ettirmesidir. Bir proteinin en kararlı olduğu hal, termodinamik açıdan en küçük serbest enerjiye sahip olduğu katlanmış (Native) yapısıdır. Protein konformasyonunun kararlılığına hidrojen bağları ve diğer etkileşimlerin katkısı, bilim çevrelerince halen bir değerlendirme konusudur. Proteinlerin doğal yapılarında kararlılığı sağlayan etkenler arasında iyonik ilişkiler, dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik molekülleri bir arada tutan kuvvetler, hidrojen ve disülfid bağları bulunmaktadır. Hidrofobik kuvvetler ve disülfid bağlar protein katlanmasında üç boyutlu doğal yapının korunması için önemli rol oynamaktadır. Proteinlerin kararlılığı açık ve katlı durumlar arasındaki serbest enerji farklılığı ile tanımlanabilmektedir. Açık ve katlı konformasyonların birbirlerine göre popülasyonları kararlılığı belirlemektedir. Kararlılığın, katlanma mekanizması içerisinde serbest enerji bariyer yüksekliği, geçiş durum topluluğu konumu gibi farklı durumlarda değişim gösterdiği bilinmektedir. Şekil 2.12’de küçük bir protein için serbest enerji profili gösterilmiştir. Burada açık ve katlı olmak üzere iki farklı kararlı durum vardır. Açık durum konformasyonlarının sayısı katlı durumun konformasyon sayısından oldukça fazladır. Açık durum konformasyonlarının enerjileri farklılık

gösterse bile bu fark oldukça küçüktür. Böylece açık konformasyonların oluşturduğu topluluğu tek bir durum olarak ele alabiliriz. İki durum arasındaki enerji farklılığı da oldukça fazladır.



Şekil 2.12. Herhangi bir protein için serbest enerji grafiği

### 2.6.3. Kalorimetrik iki durum davranışı ve Kooperatiflik

Protein yapıları statik değildir. Proteinlerdeki çoğu bağlar esnek ve kolaylıkla karbon bağları etrafında döndürülebilmektedirler. Ayrıca proteinin yapısal segmentleri çeşitli zaman ölçeklerinde hareket edebilmektedir. Bu hareketler proteinlerin fonksiyonlarını anlamamız için önemlidir. Proteinler polipeptitlerden oluşan makro moleküller oldukları için milyonlarca ara durum konformasyonlarında bulunabilirler. Sıcaklık, basınç, pH, kimyasal çözücüler, vb. şartlarda oluşan değişimler çeşitli konformasyonel durumları beraberinde getirir (Cooper 1999). Proteinlerin dinamiksel açıdan incelenmesi iki farklı yolla gerçekleşmektedir. Bunlardan biri termodinamik yani sıcaklığın bir fonksiyonu olarak değişen nicelikler üzerine yapılan çalışmalar diğeri ise kinetik yani zamana bağlı olarak yapılan çalışmalardır. Bu tez çalışmasında proteinlerin termodinamiksel davranışları kalorimetrik metodlar kullanılarak incelenmektedir. Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan kalorimetrik metodlardan bazıları şunlardır:

1. İzotermal Titrasyon Kalorimetri (ITC)
2. Diferansiyel Tarama Kalorimetri (DSC)
3. Küçük Açık X Işını Saçılımı (SAXS)

İzotermal titrasyon kalorimetri; biyofiziksel bir teknik olup serbest enerji, entropi ve entalpi değişimleri gibi termodinamiksel parametrelerin belirlenmesi için kullanılırlar (Nienhaus 2005). Protein- protein, protein- DNA, enzim- inhibitör gibi herhangi iki molekülün etkileşimlerini incelenmesinde de kullanılmaktadır. Diferansiyel Tarama Kalorimetri analiz sistemi ise ilk olarak sıcaklığın bir fonksiyonu olarak proteinlerdeki değişimleri belirlemek için kullanılmıştır (Shirley 1995). Ayrıca camsı geçiş sıcaklıklarının belirlenmesinde, ısı kapasitesi ölçümlerinde, lipid membran karakterizasyonlarının belirlenmesi için kullanılır. SAXS metodu ise makromoleküllerin boyutu, şekli, tıksızlığı hakkında bilgi sağlamaktadır. Kullanılan tüm bu deneysel tekniklerle elde edilen sonuçlar analitik olarak yapılan çalışmalara ışık tutmaktadır. Bu tez çalışmasında; DSC tekniği ile yapılan inceleme metodunu baz alarak veriler elde ettik. Protein katlanmasını daha iyi anlayabilmek proteinlerin fonksiyonlarının altında yatan detayları biraz olsun çözümlenebilmek için onların termodinamik özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. Proteinlerin termodinamiğini genel bir bakış açısı ile anlatmak gerekirse proteinler katlı durum olarak adlandırılan üç boyutlu konformasyonel yapısına katıldığı zaman etkin olduğu düşünülmektedir. Katlanma süreci spontane bir süreç olup serbest enerji ( $\Delta G$ ) değişimiyle bağlantılıdır. Bu süreçte katlı durum minimal serbest enerji değerindedir. Çözücü etkisi de göz önüne alındığı zaman katlanmış durumun kararlılığı zincir entropisi ve efektif enerji arasındaki dengeden ileri gelmektedir. Bir sistemin serbest enerjisi termodinamiksel olarak niceliklerini belirlemek için önemlidir.  $N$  tane özdeş parçacıktan oluşan istatistiksel topluluklarda sistemin Gibbs enerji fonksiyonu ( $G$ ) ile gösterilmektedir. Gibbs serbest enerjisi eşitlik (2.1) ile gösterilmektedir.

$$\Delta G = H - T\Delta S \quad (2.1)$$

olarak ifade edilebilir. Burada  $H$  entalpi,  $T$  Kelvin cinsinden mutlak sıcaklık,  $S$  ise entropiyi karakterize etmektedir. Konformasyonel potansiyel enerji değişimleri entalpi değişimlerini sağlar. Termodinamik olarak serbest enerji eşitlik (2.2)'de gösterildiği gibi seçilen uygun reaksiyon koordinatının populasyonunun tersinin logaritması olarak ifade edilir (Kaya and Chan 2003).

$$F(E) = -\ln P(E) \quad (2.2)$$

Isı kapasitesi ( $C_p$ ) proteinler için ölçülebilen birkaç temel termodinamik nicelikten biridir. Sistematik olarak yapılan kalorimetrik ölçümleri ilk olarak 1780'lerde Benjamin Thompson tarafından yapılmıştır. Bir varil suyun artan sıcaklıkla ısı miktarındaki değişiminin ölçümü ile başlayan süreç ilerleyen zamanlarda daha hassas kalorimetrik ölçümler haline dönüşmüştür. Günümüzde artık birçok protein reaksiyonunun ısı değişimleri belirlenebilmektedir. Proteinler üzerine yapılan biyofizik çalışmalarında yaygın olarak sabit basınç altında tanımlanan ısı kapasitesi ( $C_p$ ) ölçümlerinden elde edilen veriler kullanılır. Sabit basınçta sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülen ısı entalpi değişimini vermektedir. Isı kapasitesi sistemin depoladığı enerjinin bir ölçüsüdür. Sıcaklıkla beraber sistemin depoladığı enerji artmaktadır. Isı kapasitesi farklı şekillerde ifade edilebilir (Prabhu and Sharp 2005).

$$C_p = \frac{\partial H}{\partial T} \quad (2.3)$$

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p \partial T \quad (2.4)$$

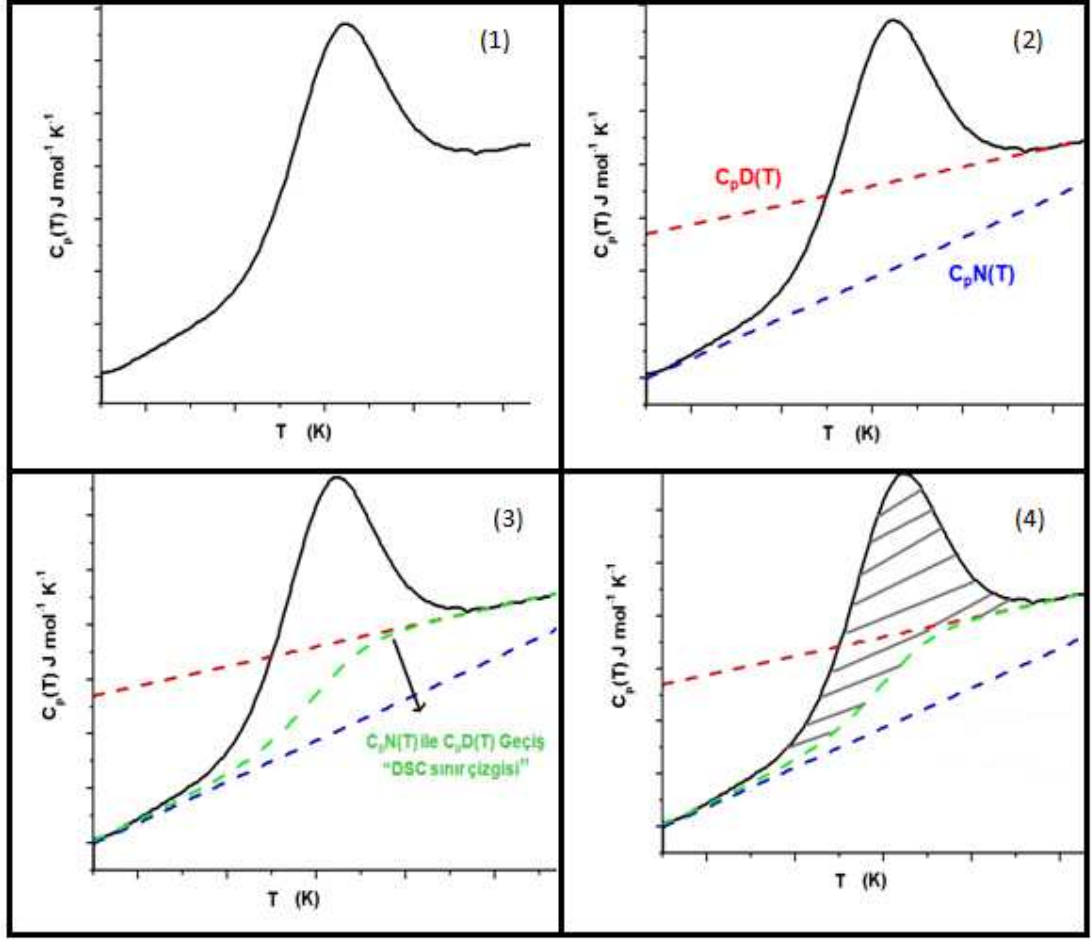
Diğer uygun tanımlamalara göre ise ısı kapasitesi sırasıyla; entropinin sıcaklığa bağlı ifadesi, serbest enerjinin ikinci türevi ve  $kT^2$  ile ölçöklenen enerjideki ortalama dalgalanma olarak ifade edilmektedir.

$$C_P = T \frac{\partial S}{\partial T} = -T^2 \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} = \frac{\langle \delta H^2 \rangle}{kT^2} \quad (2.5)$$

Her iki eşitlikte ısı kapasitesi, entropi, entalpi ve serbest enerji ( $\Delta C_P$ ), ( $\Delta S$ ), ( $\Delta H$ ) ve ( $\Delta G$ ) değişimleri ile gösterilebilir. Isı kapasitesinin çoklu tanımlamaları termodinamik ölçümleri için zengin bir konsensüs oluşturmaktadır.

Deneysel olarak yapılan kalorimetrik ölçümlerde DSC metodu, proteinlerde veya diğer biyolojik moleküllerdeki sıcaklığa bağlı konformasyonel değişimleri karakterize eden güçlü bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. DSC tekniğinde referans ve örneklem olarak adlandırılan protein çözeltisinin ve çözücünün bulunduğu iki ayrı hücre arasında gerçekleşen ısı kapasitesi farklılıklarından yola çıkılarak ölçümler gerçekleştirilmektedir. Proteinlerin açık ve katlı olarak adlandırılan durumları arasındaki ısı kapasitesi farklılığı genellikle polar ve apolar olmak üzere sınıflandırılan amino asitlerden gelen hidrasyon katkıları ile açıklanabilir. Bir DSC termogramında açık ve katlı durumların ısı kapasitesi seviyeleri sınır çizgi (baseline) çıkarımı yapılmasından önce veya sonra en az bir tepe göstermektedir (Arrondo and Alonso 2006).





**Şekil 2.13.** Deneysel tekniklerle elde edilen ısı kapasitesi gösterimi ve sınır çizgisi (baseline) çıkarımı (Blaber 2009)

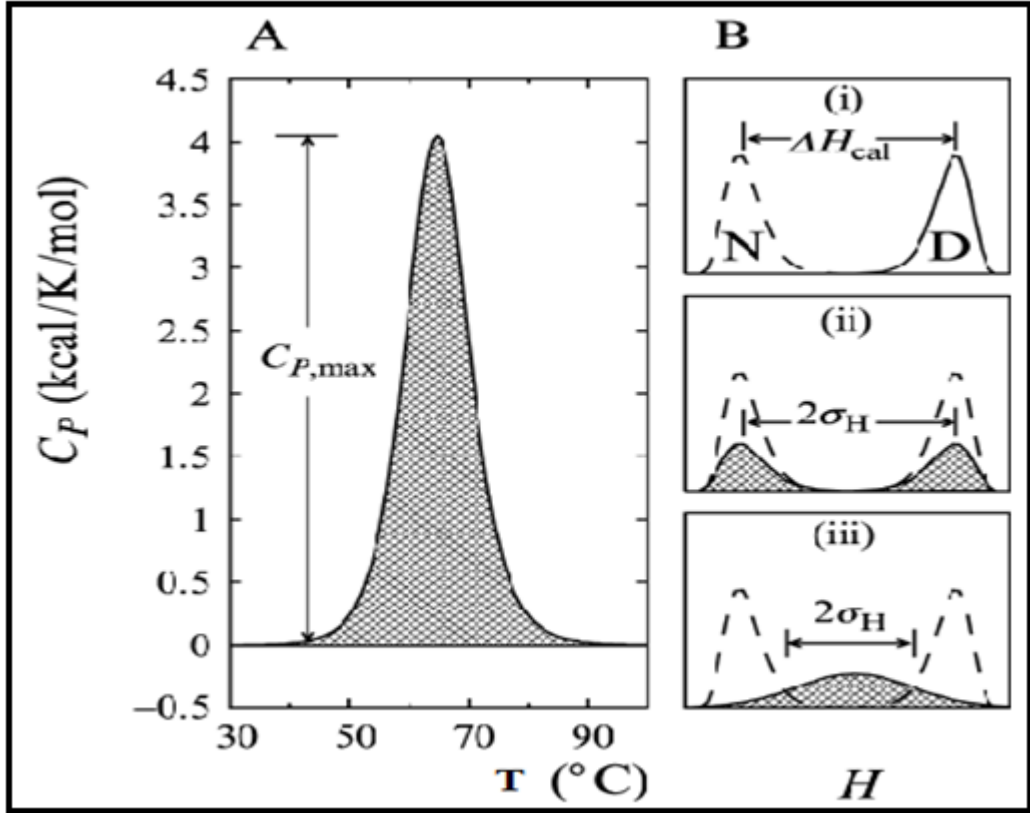
Şekil 2.13’de (1), (2), (3) ve (4) şekilleri DSC metodu ile herhangi bir protein için elde edilen ısı kapasitesi eğrisini ve sınır çizgisi çıkarımlarını göstermektedir. Şekil 2.13 (2)’de katlı durum (Native) düşük sıcaklık şartları altında katı faz benzeri bir durum gibi düşünülebilir.  $C_pN(T)$  katlı durumun ısı kapasitesi fonksiyonunu göstermektedir. Açık durum (Denatured) ise yüksek sıcaklık şartları altında sıvı faz benzeri bir durum gibi düşünülebilir.  $C_pD(T)$  açık durumun ısı kapasitesi fonksiyonunu göstermektedir. Şekil 2.13 (3)’de ise; katlı durumdan açık duruma doğru olan sistem geçişlerinde proteinin ısı kapasitesi fonksiyonları ( $C_pN(T)$ ,  $C_pD(T)$ ) sıcaklığa bağlı olarak bir faz geçişi sınır çizgisi (Baseline) ile gösterilmektedir. Şekil 2.13 (4)’de taralı alan kalorimetrik entalpiyi gösterir. Geçişin gerçekleştiği orta nokta ise geçiş sıcaklığı değerine karşılık

gelmektedir.  $\Delta C_p = C_p D(T) - C_p N(T)$  değeri proteinlerin denaturasyonu için pozitif değer almaktadır.

Teorik olarak yapılan termodinamik çalışmalar arasında da en çok karşılaşılan ölçüm fiziksel ve kimyasal süreçler için ısı değişiminin belirlendiği kalorimetrik ölçümlerdir. Kalorimetri konformasyonel geçiş ve bağlanmaları karakterize etmektedir (Zielenkiewicz and Margas 2002). Kalorimetrik kriter protein katlanmasının iki durum geçişini belirlenmesinde en önemli deneysel yaklaşımlardan biridir. Kalorimetrik kriter şartına göre; kalorimetrik entalpi değişimlerini ve iki durum Van't Hoff entalpi değişimlerini gösteren iki durum geçişi vardır (Zhou *et al.* 1999). Deneysel kalorimetrik iki durum kriteri; açılma katlanma geçiş orta noktası çevresindeki van't Hoff entalpinin  $\Delta H_{vH}$  geçişin baştan sona tamamını kapsayan kalorimetrik entalpiye  $\Delta H_{cal}$  oranının yaklaşık 1'e eşit olmasıdır (Kaya and Chan 2000).

$$\kappa = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} \approx 1 \quad (2.6)$$

Bu entalpi oranı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ısı kapasitesi ölçümlerinden elde edilmektedir. Isı kapasitesinin genişliği konformasyonel geçiş için termodinamik bilgi içermektedir. Kalorimetrik iki durum kriterinin fiziksel anlamı Şekil 2.14'de B'deki gösterimlerle açıklanmıştır.



**Şekil 2.14.** Proteinlerin termodinamik kooperatif davranışları (Jackson *et al.* 1993; Chan and Kaya 2004)

Kalorimetrik entalpi; ısı kapasitesi eğrisi altında kalan alan olarak tanımlanmaktadır.

$$\Delta H_{\text{cal}} = \int_{T_0}^{T_1} dT C_p(T) = \int_{T_0}^{T_1} dT \frac{\partial \langle H(T) \rangle}{\partial T} = \langle H(T_1) \rangle - \langle H(T_0) \rangle = \langle H \rangle_D - \langle H \rangle_N \quad (2.7)$$

Eşitlik açık durumun ortalama entalpisi ile katlı durumun ortalama entalpisi arasındaki farkı vermektedir. Şekil 2.14.B (i)' de N (katlı durum) ve D (açık durum) ile gösterilen tepeler sırasıyla  $T_0$  ve  $T_1$  sıcaklıklarındaki entalpi dağılımlarını göstermektedir (Chan and Kaya 2004). Van't Hoff entalpi için belirtilen birkaç farklı tanım mevcuttur. Genel olarak sıcaklığa bağlı van't Hoff entalpi şu şekilde ifade edilmektedir (Kaya and Chan 2000).

$$\Delta H_{vH}(T) = k_B T^2 \frac{d \ln K^{eff}}{dT} = k_B T^2 \frac{1}{\theta(1-\theta)} \frac{d\theta}{dT} \quad (2.8)$$

İki durum geçişleri durum I (reaktant) ve durum II (ürün) şeklinde bir kimyasal reaksiyon olarak tanımlandığında burada  $K^{eff}$  sistemin efektif denge sabitini göstermektedir (Zhou *et al.* 1999).  $\theta = \theta(T)$  ise iki durum parametresini göstermektedir.  $K^{eff} = \theta/(1-\theta)$  ifadesinde  $\theta$  0'dan (düşük sıcaklık) 1'e (yüksek sıcaklık) kadar değerler almaktadır. Proteinlerin sıcaklık denaturasyonu için  $\theta = 0$  ve  $\theta = 1$  sırasıyla tamamen katlı ve tamamen açık durumları ifade etmektedir. Böylece geçiş sıcaklığında;

$$\theta(T = T_g) = 1/2 \quad (2.9)$$

$$\Delta H_{vH} = 4k_B T_g^2 \left. \frac{d\theta}{dT} \right|_{T=T_g} \quad (2.10)$$

Bu ifade ile  $\theta$  değerinin farklı seçilmesi ile farklı van't Hoff entalpileri ve farklı geçiş sıcaklığı değerleri elde edilmektedir (Kaya and Chan 2000).

$$\Delta H_{vH} = 2T_{1/2} \sqrt{k_B C_{P,1/2}} \quad (2.11)$$

$$\Delta H_{vH} = 2T_{max} \sqrt{k_B C_{P,max}} \quad (2.12)$$

$$\Delta H_{vH} = 2T_d \sqrt{k_B C_{P,d}} \quad (2.13)$$

Teorik olarak populasyonlardaki farklı geçiş durum sıcaklıkları bu değerlere göre belirlenir.  $T_{1/2}$  olarak alınan orta nokta sıcaklık değerinde zincir populasyonunun yarısının açık diğer yarısının ise katlı olduğu durumdur.  $T_{max}$  geçiş sıcaklığı değerinde ise; katlanma ve açılma geçişlerinin sayısının birbirine eşit olduğu ısı kapasitesinin maksimum değerine karşılık gelen sıcaklık değeridir.  $T_d$  geçiş sıcaklığı değeri ise;

toplam populasyonda katlı durumun göz ardı edildiği açık durum popülasyonunun dikkate alındığı sıcaklık değeridir. Bu değerler eşitlik (2.11), (2.12) ve (2.13) ile gösterilmektedir. Burada kullanılan üç ayrı sıcaklık değeri ile elde edilen van't Hoff entalpi ifadeleri kullanılarak eşitlik (2.14), (2.15) ile (2.16) ile gösterildiği gibi farklı şekillerde kalorimetrik kriter değerleri elde etmek mümkündür.

$$\kappa_1 = 2T_{1/2} \sqrt{k_B C_P(T_{1/2}) / \Delta H_{cal}} \quad (2.14)$$

$$\kappa_2 = 2T_{max} \sqrt{k_B C_P(T_{max}) / \Delta H_{cal}} \quad (2.15)$$

$$\kappa_3 = 2T_d \sqrt{k_B C_P(T_d) / \Delta H_{cal}} \quad (2.16)$$

Bu tez çalışmasında yapılan termodinamik analiz sonuçlarında daha sonraki bölümlerde detaylarını sunacağım  $\kappa_2$  kalorimetrik kriter oran değerini kullandık. Genellikle ısı kapasitesi entalpinin varyansı ( $\sigma_H$ , standart sapmanın karesi) ile orantılıdır (Kaya and Chan 2004).

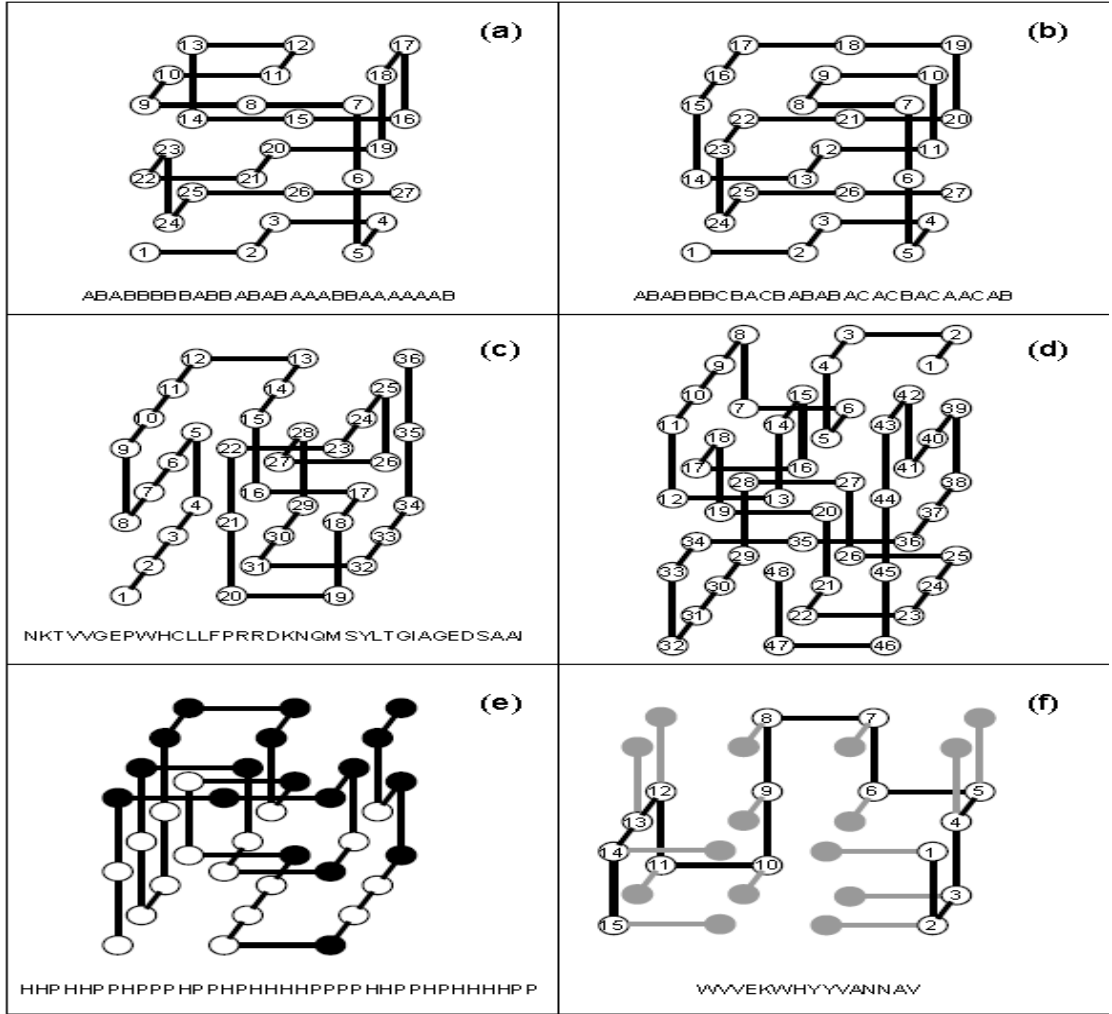
$$C_P = \frac{\langle H^2(T) \rangle - \langle H(T) \rangle^2}{k_B T^2} = \frac{\sigma_H^2}{k_B T^2} \quad (2.17)$$

$$\Delta H_{vH} = 2(\sigma_H)_{max} \quad (2.18)$$

Şekil 2.14 B (ii)'de görüldüğü gibi van't Hoff entalpi  $T_{max}$  değerinde entalpinin standart sapma değerinin iki katına eşittir. Bu durum kalorimetrik iki durum kriterini desteklemektedir.  $T_{max}$  değerindeki bu durumda kalorimetrik entalpi değerini içine alacak bir şekilde genişler. Popülasyon dağılımlarını [N] ve [D] gibi aynı ortalama entalpi değerlerine sahip olacak şekilde iki ayrı duruma ayrılır. Bu durum kesinlikle entalpi değerleri arasında herhangi bir konformasyon olmayacağı anlamına gelmemektedir.  $\kappa \cong 1$  kalorimetrik kriteride az bir ara durum popülasyonunu gerektirmektedir. Şekil 2.14 B (iii)'de eğer protein geçiş orta noktasında önemli

derecede ara durum konformasyonel popülasyonuna sahipse bu durum termodinamik kooperatiflik için kalorimetrik iki durum kriterinin 1'den daha küçük değerlerine karşılık gelmektedir.

Kalorimetrik iki durum kriteri deneysel gözlemlerle olan uyumu ve aynı zamanda protein katlanma sürecinin kooperatifliği hakkında bize bilgi vermektedir. En iyi tanımlanmış deneysel kalorimetrik kriter  $\kappa$  değerinin yaklaşık olarak 1'e eşit olması protein katlanmasında termodinamik kooperatif bir davranışa işaret etmektedir (Kaya and Chan 2000). Bu bağlamda gözlemlenen kooperatif durumları incelemek amacıyla Kaya and Chan (2000) tarafından yapılan çalışmada 6 farklı basitleştirilmiş protein modeli incelenmiştir. Bu modeller sırasıyla şekilde de gösterildiği sıra ile **a)** 2- harf modeli **b)** 3-harf modeli **c)** 20-harf modeli **d)** Go modeli **e)** HP modeli **f)** 20- harf kenar zincir modelidir. Bu modellerin tümü birbirleinden farklı özelliklere sahip olmakla birlikte protein katlanma problemini anlayabilme noktasında değişik bakış açılarını içermektedirler. İncelenen tüm bu model yaklaşımları Şekil 2.15'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.15.** Termodinamik olarak incelenen 6 farklı protein modeli (Kaya and Chan 2000)

Proteinlerin genel olarak davranışları hakkında, kooperatif karşılıklı etkileşmenin termodinamik davranışlar üzerine olan etkilerini inceleyebilmek için farklı özellikteki modeller tercih edilmiştir. Bu modellerin tümü için kalorimetrik iki durum kriteri ile uyumlu olduğu düşünülürken modellerin birçoğu için uyumsuzluk ortaya çıkmıştır. Yani farklı orjine sahip olan protein modellerinin gerçek protein davranışından uzak olduğu anlaşılmıştır. Yine de seçilen modeller protein katlanmasının temelini oluşturan düşünceleri açıklamaya biraz da olsa ışık tutmaktadır.

Farklı orta nokta sıcaklık değerleri ile elde edilen  $\kappa_0, \kappa_1, \kappa_2, \kappa_3$  olarak gösterilen 2 durum kalorimetrik gözlem kriteri ( $\kappa = \Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} \approx 1$ ) kullanılarak farklı modellerin ısı kapasiteleri sınır çizgisi çıkarımı yapılmadan ve yapıldıktan sonra elde edilen kooperatif davranışlar hakkında bilgi edinildi (Kaya and Chan 2000). Orta nokta sıcaklık değerleri açısından yapılan değerlendirmede  $T_{max}$  sıcaklık değerinin kullanıldığı  $\kappa_2$  oranı kooperatif davranışa daha yakın olduğu görülür. Çünkü sıcaklık arttığı zaman temel durum konformasyonu diğer düşük entalpi konformasyonlarının transferi ile artışı sürdürmektedir. Böylece sıcaklık  $T_{max}$  olduğu zaman çok sayıdaki yüksek entalpi değerine sahip konformasyonların tamamı ile düşük entalpi değerine sahip konformasyonlar grubu arasındaki geçişler tarafından ısı kapasitesinin tepe değeri dağılımları baskın olmaktadır.

Deneysel sınır çizgisi çıkarımı (baseline subtraction) yapılarak kalorimetrik gözlem kriteri yeniden incelenmiştir. Bu çıkarım ile daha yüksek kooperatiflik beklenmektedir. Bunun için katlı ve açık durumlardaki kuyruk kısımları ısı kapasitesi eğrisinden çıkartılır. Hem yapısal hem de entalpi olarak önemli farklılıkları bulunan konformasyonlar arasındaki termal geçişleri içeren tek tepe bölgesi olan ısı kapasitesi dağılımlarında sınır çizgisi çıkarımı yapılarak temel olarak çözücü etkileri, proteinlerin küçük genlikli hareketleri ve bunun gibi çeşitli katkılar ekarte edilmektedir. Deneysel olarak olası çıkarımlar ısı kapasitesi fonksiyonunun yüksek sıcaklık yani proteinin denaturasyonuna karşılık gelen parçası ile düşük sıcaklık yani proteinin katlı durumuna karşılık gelen kısımlar arasında yapılmaktadır. Kalorimetrik kooperatiflik üzerine yapılan çıkarımların etkisi mevcuttur. Bu bakış açısına göre ısı kapasitesi eğrisinin altındaki bazı alanlar dışarılandığı için kalorimetrik entalpinin değeri azalmaktadır. Bu durum  $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$  oranı için artırıcı, ısı kapasitesinin tepe değerini ise azaltıcı bir etki göstermektedir.

Deneysel sonuçlarla uyum anlamında katlanma açılma geçişleri ile ilgili ısı kapasitesi değişimi sadece ısı kapasitesinin maksimum yani tepe bölgesindedir. Bu yüzden ısı kapasitesinin sıcaklığa göre değişiminde kendini gösteren fakat katlanma ve açılma geçişleri ile ilgisi olmayan bölgelerin çıkarımı yapıldığında kalorimetrik kriter



değerinde veya bu değere yakın sonuçlar elde edilmektedir. Yani bu çıkarımlar çoklu konformasyona sahip katlı durumu belirleme ve açık topluluktaki entalpik değişimi göz ardı etmeyi ifade etmektedir (Kaya and Chan 2000). Geçiş sıcaklığı etrafındaki değerlerde katlanma ve açılma geçişleri daha sık gözlemlenmektedir. Geçiş sıcaklığı değerinden uzaklaşıldığı zaman geçişler yeterince sık olmamakta ve iyi örneklem toplulukları ortaya çıkmamaktadır. Bu yüzden ısı kapasitesi ve serbest enerji gibi termodinamik analizler geçiş sıcaklığında ve bu sıcaklığa yakın değerlerde yeterince uzun zaman adımlı simülasyonlar sonucu elde edilen konformasyonel enerji toplulukları göz önüne alınarak yapılmaktadır. Bir proteinin entalpik durumlarının yoğunluğunda kalorimetrik iki durum kooperatiflik ve diğer deneysel olarak belirlenen termodinamik özelliklerin önemi bu noktada ortaya çıkmaktadır.

Tek durumlu yani bariyersiz termodinamik geçişler göz önüne alındığı zaman iki durum kalorimetrik gözlem kriteri  $\kappa$  değerinde görülen sapmalar kooperatif davranışların azaldığına işaret etmektedir. Zuo *et al.* (2006) çalışmasında 17 ayrı proteinin katlanma özelliklerini istatistiksel olarak incelemiştir. Bu proteinler tamamen  $\alpha$  sarmalları, tamamen  $\beta$  yapıları ve  $\alpha$  sarmalları ile  $\beta$  yapılarının birarada bulunduğu ( $\alpha+\beta$ ) gibi yapılardan oluşan iki durumlu, çok durumlu ve tek durumlu geçişlere sahip olan proteinlerde yerel olmayan kontak sayıları hesaplanarak kooperatif davranışları araştırılmıştır. Tek durumlu geçişlerde kooperatifliğin azaldığı belirlenmiştir. Bariyersiz bir şekilde katlanmanın fiziksel başlangıcı kooperatif olarak katlanmayı belirleyen yerel olmayan kontakların az olmasından kaynaklanmaktadır. Genel olarak termodinamik geçişler incelendiğinde tek durumlu katlanma özelliğine sahip olan proteinlerin kooperatifliklerinde azalma belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında tek durumlu geçişlere sahip proteinlerin termodinamik analizleri yapıldığında kooperatifliğin azaldığı hem  $\kappa$  değerinin 1'den uzaklaşması ile hem de ısı kapasitesi eğrisinin daha yeğin bir hal almasından anlaşılmıştır. Bir proteinin katlı durum topolojisi kooperatiflik derecesinde önemli bir rol oynamaktadır.

## 2.7. Moleküler Dinamik Simülasyon Tekniği

Bilgisayarların özelliklerinin ve kullanım amaçlarının her geçen gün gelişmesi ile birlikte birçok araştırma, artık bilgisayar simülasyonlarına dayalı hesaplama yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır. Simülasyon; bir sistemi tasvir edebilecek düzeyde modellemeler oluşturulmasıdır. Bilgisayar simülasyonları yardımıyla mikro boyutlarda gerçekleşen karmaşık olayların incelenmesi moleküler biyolojiden, fiziğe kadar uzanan çeşitli bilim dalları için belirleyici olmaktadır.

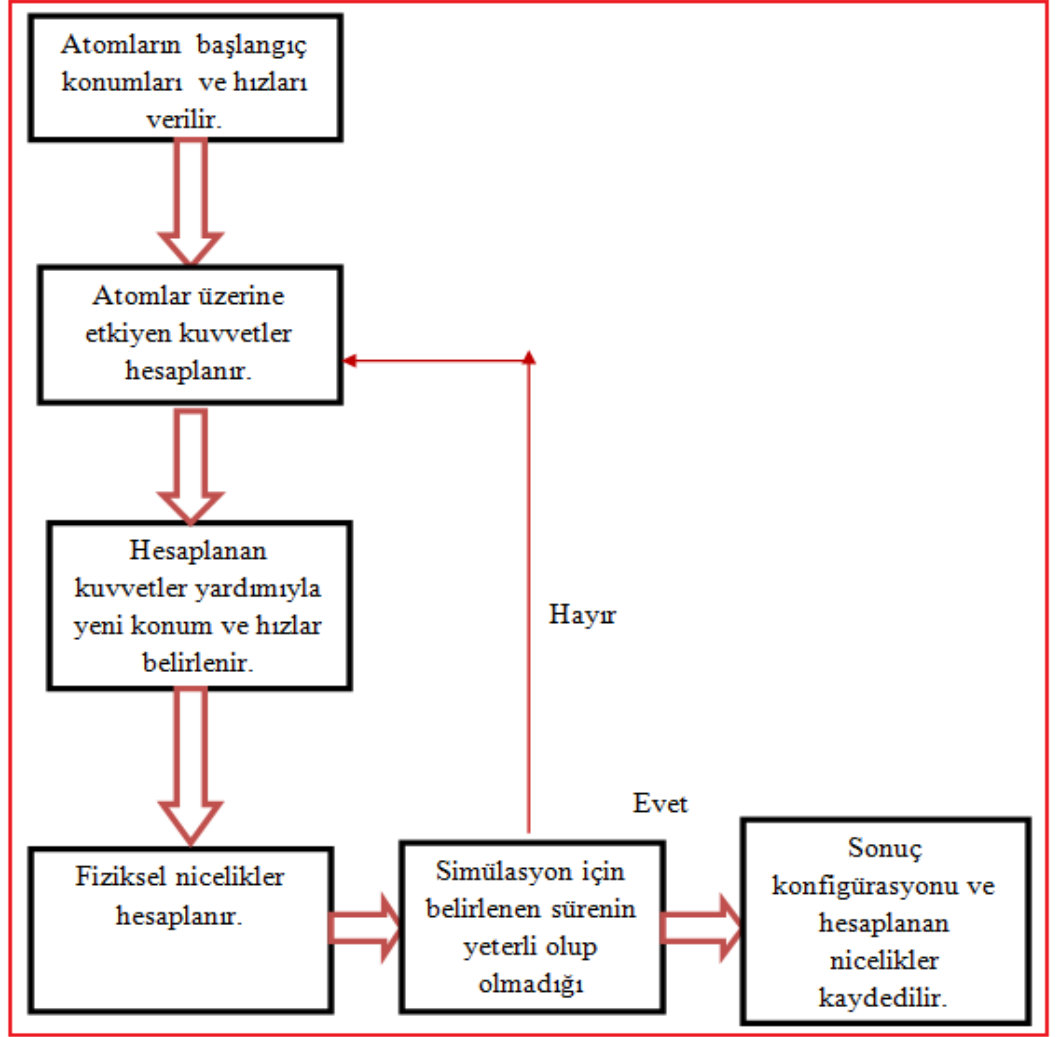
Fiziksel sistemleri daha detaylı bir şekilde inceleyebilmek için kuantum mekaniksel hesaplama yöntemleri, yarı deneysel metodlar gibi çok çeşitli hesaplama yolları geliştirilmiştir. Gerçeğe yakın davranışlar sergileyen bilgisayar simülasyonlarına, deneysel ve teorik çalışmaların yeterli olmadığı durumlarda başvurulur. Deneysel olarak incelenmesi zaman alan, gözlemlenmesi zor ve maliyeti yüksek olan karmaşık sistemlerin davranışlarını anlayabilmek için simülasyon tekniklerine başvurulmaktadır. Simülasyon hesaplamaları, deneysel çalışmalar ile teorik çalışmalar arasında bir köprü görevi üstlenir. Simülasyon teknikleri arasında en çok göze çarpan iki metod vardır. Bunlardan biri Monte Carlo, diğeri ise moleküler dinamik simülasyon tekniğidir. Monte Carlo simülasyonları stokastik bir yaklaşım içermektedir. Herşeyin gelişigüzel olduğu bu metod yaklaşımında ise hareket setleri belirli olasılık dağılımlarından oluşmaktadır. Sistemi oluşturan parçacıkların başlangıçta seçilen hareket setlerinin gerçeğe yakın bir şekilde modellenmesinde zorluklar mevcuttur. Örneğin korunumlu büyüklükler simülasyon boyunca hep aynı düzlem üzerinde konumlarını muhafaza etmelidirler. Veya çeşitli açısız dönüşler global rotasyon yapılmaktadır.

Simülasyon teknikleri arasında yaygın olarak kullanılan metodlardan bir diğeri ise moleküler dinamik simülasyon tekniğidir (MD). Bu modelleme tekniği ile çok parçacıklı sistemlerin davranışları zamana bağlı olarak incelenmektedir. Moleküler dinamik metodunda süreklilik kavramı önem arz etmektedir. Örneğin bir gradiyent hesaplamaları için bir sürekliliğin olması gerekmektedir. Bununla birlikte yeni enerji fonksiyonları veya yeni fikirleri bu simülasyona yerleştirmek de bir o kadar zordur. Son

25 yıldan beri uzun zaman ölçekleri için büyük ve karmaşık moleküllerin modellemeleri için sıklıkla tercih edilmektedir. Moleküler dinamik tekniği ile yapılan ilk hesaplama çalışmaları Alder ve Wainwright tarafından 1957 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada küre (hard spheres) sisteminin özellikle katı ve sıvı bölgeleri dikkate alınarak faz diyagramı incelenmiştir (Alder and Wainwright 1957). Bu sistemde parçacıklar ani çarpışmalar vasıtası ile etkileşirler ve iki çarpışma arasında serbest bir şekilde hareket ederler. Ayrıca 1960 yılında J.B Gibson tarafından 500 atomdan oluşan bir sistemde sonlu farklar zaman integrasyonu yöntemine dayanan sürekli potansiyellerle ilk moleküler dinamik simülasyon örneği yapıldı (Gibson *et al.* 1960). Moleküler dinamik metodunda en çok dikkat çeken gelişme 1964 yılında A.Rahman tarafından yapılan sıvı Argon için Lennard-Jones potansiyelinin kullanıldığı simülasyondur (Rahman 1964). İlerleyen yıllarda moleküler dinamik simülasyonları elektronikten biyomoleküllere kadar uzanan geniş bir yelpazede gelişme göstermiştir. Moleküler dinamik simülasyonları genel olarak üç temel adım altında incelenir.

- 1.) Başlangıç aşaması (Hazırlık)
- 2.) Sistemin integrasyonu ve dengelenmesi
- 3.) Sonuçların analiz edilmesi

Bir simülasyonun başlangıç aşamasında öncelikle incelenen sistemi oluşturan parçacıklar için ilk koordinatlar ve hızlar tanımlanır. İkinci aşamada tüm parçacıklar üzerinden kuvvet hesaplanarak hareket denklemlerinin sayısal integrasyon ile çözümüne geçilerek sistemin minimum enerjili bir noktaya hareket etmesi sağlanır. Son aşamada ise dengelenmiş sistemde tüm nicelikler üzerinden analiz yapılır. Genel olarak bir moleküler dinamik simülasyonunu içeren algoritma Şekil 2.16 ile gösterilen akış diyagramı ile özetlenebilir.



**Şekil 2.16.** Moleküler dinamik simülasyonunu özetleyen akış diyagramı

Moleküler dinamik simülasyon metodunda çok parçacıktan oluşan sistemlerin özelliklerini belirlemede deterministik bir yaklaşım söz konusudur. Göz önüne alınan sistemin başlangıç koşulları bilinmesiyle birlikte bir sonraki adım için sistemin zamana bağlı davranışlarının incelenebilmesidir. Süreklilik söz konusudur. Model sistemin durumu çok boyutlu uzayda konum ve momentumlara bağlı olarak faz uzayında tanımlanır. Faz uzayında meydana gelen noktalar topluluğu (ensemble) belirli bir termodinamik koşulu sağlamalıdır. Bu termodinamik koşullar çeşitli özelliklere sahiptirler. Moleküler dinamik simülasyonlarında incelenen topluluklar arasında en çok kullanılanlar arasında mikrokronik ve kanonik topluluk sayılabilir. Mikrokronik

topluluk; sabit parçacık sayısı, sabit hacim ve sabit enerjiye karşılık gelen termodinamik durumları içermektedir. Kanonik topluluk ise sabit parçacık sayısı, sabit hacim ve sabit sıcaklık değerlerine karşılık gelmektedir. İncelenen topluluğun özellikleri belirlendikten sonra moleküler dinamik simülasyonu ile çok parçacıklı bir sistemin doğru bir şekilde ifade edilebilmesi ve mikroskobik ölçekteki simülasyonlarla makroskobik anlamda incelenebilecek özelliklere ulaşabilmek için Newton, Hamiltoniyen ve Lagrangien hareket denklemlerinden uygun olan herhangi biri kullanılabilir. Sistemin potansiyelinin tanımlanması atom ve molekül topluluklarının hareketlerini anlamak için önemlidir. Etkileşme potansiyellerinin bilinmesi yardımıyla sistemi oluşturan parçacıklar üzerine etkiyen kuvvetler hesaplanmaktadır. Hareket denklemlerinin çözümünde sayısal integrasyon metodları  $\Delta t$  zaman adımı için hesaplanmaktadır. Sayısal algoritmaların çözümleri ile sabit enerjili veya sabit sıcaklığa sahip toplulukların (ensemble) konformasyonel trajektörleri elde edilir.

İncelenen sistemi oluşturan parçacıkların hareketlerini gösteren denklemlerin çözümünde çeşitli algoritmalar yani sayısal integrasyon metodlarından faydalanılmaktadır. Bunlar aynı zamanda Verlet algoritmasının çeşitli varyasyonlarından oluşmaktadır. Bu algoritmaların en çok kullanılanlarını şu şekilde sıralayabiliriz.

- Verlet Algoritması
- Leap-Frog Algoritması
- Beeman Algoritması
- Verlet Hız Algoritması

İntegrasyon algoritmalarının seçiminde çeşitli kriterler göz önüne alınır. Bu kriterlerin en çok dikkat edilenleri arasında integrasyon için yeterli zaman adımına izin vermesi, hızlı olması, algoritmanın enerji ve momentum terimlerini içermesi, etkili bir şekilde hesaplamalara yön verebilmeleri sayılabilir. Taylor seri açılımı yardımıyla küçük bir  $\delta t$  zaman adımı düşünülerek incelenen sistemdeki  $t$  anı için  $i$  parçacığının bilinen konum ve hız gibi dinamik özellikleri kullanılarak  $t + \delta t$  anındaki özellikleri hesaplanır. Bu işlemler ardışık bir şekilde tekrar ettirilerek sistemin dinamik olarak özellikleri

incelenebilir. Tüm integrasyon algoritmalarında konum, hız ve ivme Taylor seri açılımına göre eşitlik 2.19, 2.20, 2.21 ile ifade edilir.

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.19)$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + a(t)\delta t + \frac{1}{2}b(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.20)$$

$$a(t + \delta t) = a(t) + b(t)\delta t + \frac{1}{2}c(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.21)$$

Burada  $r$  konumu ifade ederken zamana göre birinci türev; hızı  $v$  ikinci türev ise ivmeyi  $a$  verir. Bu ifadelere göre Verlet algoritması şöyle yazılabilir.

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 \quad (2.22)$$

$$r(t - \delta t) = r(t) - v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 \quad (2.23)$$

Bu iki eşitlik kullanılarak eşitlik 2.24 ifade edilebilir.

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + a(t)\delta t^2 \quad (2.24)$$

Verlet algoritması  $t$  anındaki konum ve ivme değerleri ile  $t - \delta t$  anındaki konum değerlerini kullanarak  $t + \delta t$  anındaki yeni pozisyonları hesaplar. Basit ve simetrik olan bu algoritmada hız kullanılmamaktadır. Ancak toplam enerji değeri için gerektiği zaman hız değeri hesaplanabilir.

$$v(t) = \frac{r(t + \delta t) - r(t - \delta t)}{2\delta t} \quad (2.25)$$

Leap-Frog algoritmasında ise; konum ve hız ifadeleri aşağıdaki eşitlikler ile bulunabilir. Bu algoritma ile hızlar net bir şekilde hesaplanabilir.

$$r(t + \delta t) = r(t) + \left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \delta t \quad (2.26)$$

$$v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) a(t)\delta t \quad (2.27)$$

$$v(t) = \frac{1}{2}\left[v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right)\right] \quad (2.28)$$

Beeman algoritması Verlet algoritması ile yakından ilişkilidir. Diğer algoritmalara göre daha karmaşık ifadeler içermesi bu integrasyon metodunun dezavantajı olarak sayılabilir. Ancak hız ve daha iyi bir enerji korunumu için eşitlikler daha doğru sonuç vermesi açısından avantajlıdır.

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t) + \frac{2}{3}a(t)\delta t^2 - \frac{1}{6}a(t - \delta t)\delta t^2 \quad (2.29)$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{3}a(t)\delta t + \frac{5}{6}a(t)\delta t - \frac{1}{6}a(t - \delta t)\delta t \quad (2.30)$$

Verlet algoritmasının en çok kullanılan varyasyonu Velocity Verlet olarak adlandırılan konum ve hızların eşit zaman aralıklarına karşılık gelecek şekilde hesaplandığı algoritmadır. Genel olarak konum ve hız aşağıda verildiği gibi hesaplanır.

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 \quad (2.31)$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + \frac{1}{2}[a(t) + a(t + \delta t)]\delta t \quad (2.32)$$

Bu çalışma için moleküler dinamik simülasyon tekniğini kullanılarak uygun algoritmalar yardımıyla denklem çözümlerinin nasıl elde edildiğine materyal ve yöntemler bölümünde detaylı bir şekilde değinilecektir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Protein Katlanması için Farklı Model Yaklaşımları

Bilgisayar simülasyonları ile yapılan modellemeler biyolojik karakterizasyonlar için deneylerle tamamlayıcı bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır. Moleküler simülasyonlarda iki tane yaklaşım dikkat çekicidir. Bunlardan ilk olanı; minimalist basitleştirilmiş modelleri kullanarak yapılan kaba taslak (coarse grained) simülasyonlardır. Bu modeller tipik olarak ya basitleştirilmiş varsayımları kullanırlar. Örneğin basitleştirilmiş Hamiltonien'lerin kullanıldığı Gō modelleri gibi ya da daha kaba taslak gösterimleri kullanılır. Mesela bir protein katlanmasını simüle etmek için modelde her bir amino asitin sadece bir  $C_{\alpha}$  atomu ile temsil edilmesi gibi. Bunlara alternatif olarak daha detaylandırılmış modellerin kullanımı ise ikinci bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tür modeller, tüm atomik detaylara sahiptirler. Detaylandırılmış modellerin kullanımının bir faydası net bir şekilde ortada olmakla beraber deneysel sonuçlarla olan bağılılığı da göz ardı edilemez bir gerçektir (Munoz 2008). Protein katlanması araştırmaları için oldukça basitleştirilmiş latis model gösterimleri sıklıkla kullanılmaktadır. Latis modellerle konformasyonel uzayda yeterince örneklem elde edilebilmektedir. Ayrıca doğru parametreler tercih edildiğinde yapı tahmini uygulamalarında başarılı sonuçlar verebilmektedir. Protein latis zincir modelleri üç boyutta basit kübik latis veya iki boyutta kare latis olarak konfigüre edilmektedir. Bu tarzdaki gösterimler yalnızca proteinin temel zincir yapısı hakkında bilgi vermektedir. Ancak model zincirin yapısal detaylarını açıklamada yetersizdir (Chan *et al.* 2002). Latis model simülasyonları protein katlanmasını yöneten temel fiziksel özellikleri anlamak için veya proteinlerin katlı durumları boyunca enerji yüzeyini sınırlayan karakteristikleri belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca hidrofobik etkileşimlerin önemini açıklamada yine aynı yaklaşım yeterli olmaktadır. Amino asitleri polarite özelliklerine göre polar ve apolar olmak üzere iki farklı grup altında toplayabiliriz. Protein konformasyonlarında farklı polaritelere sahip olan amino asitlerin çözücü içerisinde aldıkları konumlar farklılaşmaktadır. Bu düşünceler altında



hidrofobik (H) ve polar (P) amino asitlere göre yapılan basitleştirilmiş model yaklaşımına HP modeli denir. Bu modelde hidrofobik amino asitler üç boyutlu konformasyonun iç kısımlarına yerleşerek moleküllerarası bağlar oluştururlar. Bu model yaklaşımları ile yerel ve yerel olmayan etkileşmelerin artırılıp azaltılmasıyla protein benzeri davranışlar elde edilebilmektedir (Pande and Rokhsar 1998). Burada hem enerjetik hem de entropik faktörler yer almaktadır. Doğadaki herşey minimum enerjili maksimum entropiye sahip oldukları durumları tercih ederler. Hidrofobik özellikli amino asitler hidrojen bağı oluşturamadıkları için su molekülleri ile olan temasları azalmaktadır ve birbirlerine yaklaştıkça enerjileri düşmektedir. Polar amino asitlerde ise bu durumun tam tersi geçerlidir. Hidrojen bağı oluştukça enerjileri azalmaktadır. Modelleme çalışmalarında her zaman basitleştirilmiş bir şekilde gerçekleştirilen genelleştirilmeye uygun model yaklaşımları tercih edilmektedir. Farklı simülasyon yöntemleri yardımıyla gerçek sistemlerle daha yakın sürekli uzayda yapılan ve proteinlerdeki çeşitli spesifik yönelim ve etkileşimleri açıklayabilecek deneysel gözlemlerde dikkate alınan çeşitli çevresel şartların göz önüne alınabildiği modeller gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır.

### **3.1.1. Gō modeli**

Proteinler oldukça karmaşık bir yapı içinde etkileşimlerin çeşitliliğinin fazla olduğu bir biyolojik sistem olarak karşımıza çıkmaktadır. Deneysel ve teorik olarak yapılan çalışmalarda öncelikli olarak incelenen proteinler küçük ve tek bölge proteinlerdir. Bu proteinlerin hem termodinamik hem de kinetik özellikleri hakkında bilgi sahibi olmamıza rağmen gerçekte proteinlerin daha spesifik etkileşmeler içinde olduğuda yadsınamaz bir gerçektir. Bu alanda bilim adamlarının üzerinde çalıştıkları en önemli imge proteinlerin tüm davranışlarını içine alan global ölçekte dinamik modellemeler geliştirmektir. Bu aşamaya henüz ulaşamamış olsak dahi şu an için yaygın olarak kullanılan modeller arasında en önde Gō modeli gelmektedir. Gō modeli protein çalışmaları için ilk kez Nobuhiro Gō tarafından 1983 yılında kullanılmıştır (Gō 1983). Kabataslak (Coarse grained) bir model yaklaşımı da olan Gō modelinin temel özelliği proteinin katlı konformasyonunun biliniyor olmasıdır. Katlanmış yapı bilgisine dayanan

bu model ile proteinin katlanmış yapısından elde edilen potansiyeller sadece elde edilen protein için kullanılır. Burada katlı durumda konumları bilinen amino asit çiftleri arasındaki etkileşimleri tanımlamak önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Simülasyon sonunda da amino asitlerin konumunu bilmekteyiz. Bu model yaklaşımı açık konformasyondan kapalı konformasyona veya çoklu duruma giderken tuzak konformasyonlara gidişi engelliyor. Böylece enerjetik bunalımları ortadan kaldırarak relaksasyonu azaltarak yerel minimumları daha az olan bir enerji yüzeyine ulaşılmaktadır. Tüm bunlarla beraber model daha basitleştirilmiş bir yaklaşım haline dönüşmüş olmaktadır. Ayrıca en düşük enerjili durumun bilinmesi modelin tercih edilme nedenleri arasında sayılabilmektedir. Kullanılan hareket denklemlerinin çözümü ile katlanma yolağı elde edilmektedir. Gō modelinde sadece katlanmış yapıda etkileşen amino asitler, dinamik süresince etkileşebilmektedir. Her amino asitin farklı bir parçacık gibi davrandığını düşünürsek herhangi bir amino asit zincirinde 30 tane amino asit varsa, biz 30 çeşit amino asit varmış gibi davranarak modellemeyi gerçekleştirmekteyiz. Bununla birlikte her bir etkileşim terimlerinde bulunan denge mesafesinin veya açılal terimlerin protein spesifik olarak değişmesi bu modelin dezavantajı olarak sayılabilir.

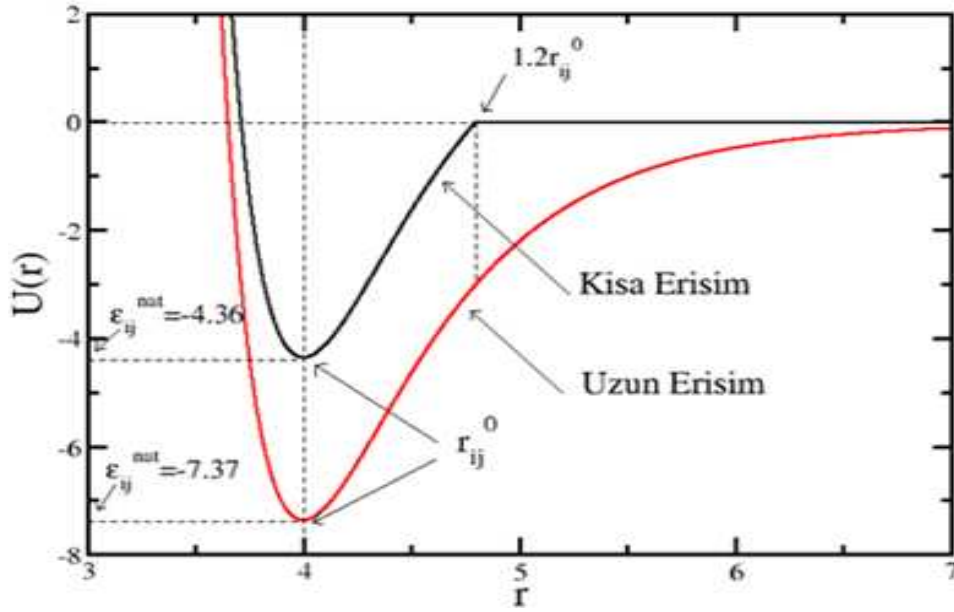
### 3.1.2. Homojen ve Heterojen Etkileşimli Gō modeli

Protein spesifik olan Gō modelleri için proteinin kristal yapı bilgisi kullanılarak katlı durumdaki ve katlı olmayan durumdaki kontakların belirlenmesi önemlidir. Böylece proteindeki amino asitlerden hangilerinin etkileşmekte olduğu bilgisine erişmiş olmaktadır. Kristal yapıdaki amino asitlerin birbirlerine göre mesafeleri için farklı kriterler söz konusudur. Bu kriterler arasında farklı kontak mesafeleri belirlenebilmektedir. Belirlenen kontak haritaları arasındaki fark %10'nu geçmediği sürece genel davranışı her ne kadar değişmediği düşünülse de amino asit bazında gerçekleşebilecek değişimlerin ne oranda olabileceği henüz bilinmemektedir (Kaya 2009). Bu çalışma için kristal yapıdaki etkileşimler için  $C_{\alpha} - C_{\alpha}$  mesafesi 6,4 Å ve diğer ağır atomlar için etkileşim mesafesi ise 4,5Å olarak alındı. Amino asitler kristal yapıda ancak bu şartları yerine getirdikleri zaman etkileşmektedirler. Bu etkileşimler katlı (Native) etkileşmeler olarak adlandırılmaktadır. Bu kriterleri belirleyebilmek için

protein veri bankasından (PDB) 6116 proteinden oluşan protein setleri üzerinden inceleme yaptık. Bu proteinler %30 zincir özdeşliğine sahip resolüsyonu  $2 \text{ \AA}$ 'dan küçük kristal yapıya sahiptirler. Bu verilere dayanarak  $C_{\alpha} - C_{\alpha}$  mesafesinin ilk maksimum olduğu bölge  $6,2$  ila  $6,4 \text{ \AA}$  aralığına denk gelerek  $6,4 \text{ \AA}$  değerinden sonra ise azalmaya başlamıştır. Böylece kristal yapıda gözlemlenen etkileşmeler için  $C_{\alpha} - C_{\alpha}$  mesafesi  $6,4 \text{ \AA}$  olarak alınmıştır.

Homojen etkileşimli Gō modelinde incelenen protein için amino asitler arasındaki etkileşmeler bir örnek olarak alınmıştır. Etkileşimlerin büyüklüğü ise amino asit çiftine göre değişmemektedir. Yani amino asitlerin ayrı ayrı fizikokimyasal özellikleri dikkate alınmamıştır. Kristal yapıdaki bir protein için etkileşmeleri bağlı ve bağımsız etkileşmeler olarak gruplandırabiliriz. Homojen etkileşimleri içeren Gō modeli için amino asitler arasında var olan uzun ve kısa etkileşimlere göre modelimiz farklı sınıflara ayrılabilir. Bağlı ve bağımsız etkileşmelerin detaylı bilgisine simülasyon tekniğinin anlatıldığı kuvvet alanları alt başlığında yer verilmiştir. İncelenen proteindeki amino asitlerin davranışları sahip oldukları karakteristik özelliklerine ve buldukları ortamın niteliklerine göre farklı fizikokimyasal özelliklerde bulduklarını bilmekteyiz. Örneğin su ortamında etkileşen amino asitler arasındaki su moleküllerinin etkisiyle perdeleme mekanizmasına maruz kalabilmektedir. Ancak bu durumun amino asit spesifik olarak ne kadar efektif olduğu henüz bilinmemektedir. Kovalent olmayan etkileşmeler olarak adlandırılan hidrofobik etkileşmeler, elektrostatik Coulomb etkileşmeleri, hidrojen bağları ve Van Der Waals etkileşimleri hem protein katlanmasını belirlemekte hem de proteinlerin kararlılığında rol oynamaktadırlar. Van der Waals etkileşimleri tüm bunların arasında en dikkat çekici etkileşim olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu etkileşimler bağımsız atomlar arasındaki yakınlığı sınırlamaktadırlar. Uzun ve kısa olarak adlandırabileceğimiz bağımsız etkileşmeler Lenard-Jones potansiyeli tanımlanmaktadırlar. Uzun erişimli etkileşimler vakum ortamında geçerliliğini korurken, herhangi bir çözücü içerisinde de kısa erişimli etkileşimlerin olabileceği durumda dikkate alınırken erişim mesafesinin etkisi yadsınamaz bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır. Şekil 3.1'de iki amino asit birbirlerine denge mesafelerinin  $1,2$

katından daha yakınlarsa etkileşmektedirler. Lenard-Jones potansiyeli  $r = 1,2r_{ij}^0$ 'de sıfırı kesecek şekilde yukarı kaydırılmıştır.  $r > 1,2r_{ij}^0$  itibaren etkileşim olmayacak şekilde düzenlenmiştir. Böylece etkileşimin sadece bir noktada minimum değere sahip olması sağlanmış olmaktadır.



**Şekil 3.1.** Kısa ve uzun erişimli bağımsız etkileşimler (Kaya 2009)

Heterojen etkileşimlerin olduğu Gō modeli ise amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerinin dahil edildiği etkileşimlerin eşit olmadığı bir durum söz konusudur. Burada gerçekleştirilen modelleme amino asitlerin özelliklerini yansıttığı için daha gerçekçidir. (Miyazawa and Jernigan) 1985 yılında yaptıkları çalışmada tek bir protein molekülünün çözelti içerisinde olduğu düşünülerek proteinin her bir amino asitinin latis köşelerinde ve bu çözelti moleküllerinin boş kalan diğer bölümlerde olduğu düşünülmüştür. Miyazawa-Jernigan matrisinin hesaplanmasında latis model yaklaşımı ön plana çıkmıştır. Etkileşimlerin oluşumunun bir kimyasal reaksiyona benzediği yarı-kimyasal olan bu yaklaşım; etkileşim enerjileri ile etkileşim sayısının istatistiksel ortalamaları göz önünde bulundurularak, çözücü molekülleri ve proteinin birbirlerinden bağımsız olan amino asitlerinin oluşturduğu bir sisteme uygulanmıştır.

Amino asitler arasındaki toplam etkileşim sayısının, çözücü molekülleri ve amino asitler arasındaki etkileşmelerin beklenen değerine eşit olduğu düşünülerek her bir proteinin çözücü moleküllerinin sayısı hesaplanmaktadır. Kontak enerjileri, protein kristallerindeki amino asitlerin çeşidine bağlı olduğunu gösterir. Böylece etkileşimlerin en yakın amino asitler ve çözücü molekülleri arasında olduğu düşünülür ve en yakın komşuların sayısı ya da amino asit sayısı başına düşen kontaklar amino asit türüne bağlıdır.

Eşitlik (3.1)'de  $q_i$ ,  $i$  türündeki amino asitler için koordinasyon sayısını;  $n_i$ ,  $i$  türündeki amino asitlerin kontak sayısını ve  $n_{ij}$ ,  $i$  ve  $j$  türündeki amino asitler arasındaki kontak sayısını göstermektedir. Eşitlik (3.1)'de  $n_{ij} = n_{ji}$  olarak alınmaktadır.

$$\frac{q_i n_i}{2} = \sum_{j=0}^{20} n_{ij} \quad (3.1)$$

$$n_{ir} = n_{ri} \equiv \sum_{j=1}^{20} n_{ij}, n_{rr} \equiv \sum_{i=1}^{20} n_{ir}, n_{r0} = n_{0r} \equiv \sum_{i=1}^{20} n_{i0} \quad (3.2)$$

Eşitlik (3.2)'de alt indis olarak yazılan 0 simgesi çözücü moleküllerini, 1'den 20'ye kadar olan diğer indisler ise amino asitlerin türlerini göstermektedir.  $n_{rr}$  ise amino asitler arasındaki toplam kontak sayısını,  $n_{r0}$  amino asitler ile çözücü molekülleri arasındaki kontak sayısını göstermektedir. Sistemin kontak enerjisi eşitlik (3.3) ile gösterilmektedir.

$$E_c = \sum_{i=0}^{20} \sum_{j=0}^{20} E_{ij} n_{ij} \quad (3.3)$$

Eşitlik (3.1) ve (3.3) kullanılarak (3.4) ile gösterilmekte olan eşitlik elde edilmektedir.

$$E_c = \sum_{i=0}^{20} (2 E_{i0} - E_{00}) \frac{q_i n_i}{2} + \sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^{20} e_{ij} n_{ij} = \sum_{i=0}^{20} E_{ii} \frac{q_i n_i}{2} + \sum_{i=0}^{20} \sum_{i=0}^{20} e'_{ij} n_{ij} \quad (3.4)$$

Eşitlik (3.4) ile gösterilen ifade için;  $e_{ij}$  ve  $e'_{ij}$  terimleri (3.5) eşitliği ile verilmektedir.

(Miyazawa and Jernigan 1985; Li *et al.* 1996; Miyazawa and Jernigan 1996)

$$e_{ij} \equiv E_{ij} + E_{00} - E_{i0} - E_{j0}$$

$$e'_{ij} \equiv E_{ij} - (E_{ii} + E_{jj})/2 \quad (3.5)$$

(Miyazawa and Jernigan) 1996 yılında yaptıkları çalışmada X-Ray metodu ile analiz edilen 1168 protein yapısı kullanılmıştır. Protein yapılarında amino asitler arası etkileşimlerin sıklığını gözlemleyerek bir potansiyel geliştirdi. Yeterince büyük bir örneklem için amino asit dizilerinin spesifik etkileri ve proteinlerin kristal yapısında gözlemlenen bağımsız amino asit etkileşimlerinin sayısı proteinlerdeki amino asitler arasındaki etkileşim farklarını göstermektedir. Bu potansiyel proteinlerin konformasyonel geçişleri ve katlanma hesaplamaları için geniş bir alanda geçerlilik sağlamaktadır (Miyazawa and Jernigan 1985; 1996) Bu tez çalışmasında Miyazawa-Jernigan tarafından geliştirilen istatistiksel potansiyel değerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1.'de Miyazawa-Jernigan potansiyeli ( $\epsilon_{ij}^{\text{nat}}$ ) gösterilmektedir. Bu tablo değerleri amino asitlerin birbirlerine yakın oldukları durumlara bağlı kalınarak oluşturulan istatistiksel etkileşimlerden meydana gelir. Ayrıca çizelgede gösterilen amino asitler arası etkileşmelerin tamamı çekici özelliktedir. Bu etkileşim değerleri geniş bir enerji spektrumuna işaret etmektedir. 20x20'lik bu matristeki değerlerin ortalamaları alındığı zaman yani etkileşmelerin büyüklüklerine bakılınca çok geniş bir alanda yayılım gösteren bu değerlerin ortalama değeri  $\langle \epsilon_{ij} \rangle_{MJ} = -3.166$  olmaktadır. Bu değer oldukça küçük olmakla birlikte amino asitler arasındaki etkileşmelerin daha şiddetli olacağını göstermektedir.

Homojen ve heterojen etkileşimli Gō modellerinin birbirlerinden ayrıldığı temel noktayı şu şekilde özetleyebiliriz. Homojen etkileşimler göz önüne alındığı zaman amino asit farklılığı gözlemlenmeden tüm etkileşimler eşit alınmaktadır ( $\epsilon = -1$ ). Heterojen etkileşimlerin dikkate alındığı model için ise; etkileşimlerin büyüklüğü amino asit çiftine göre değişmektedir. Örneğin Şekil 3.1’de farklı Lys-Lys etkileşiminin büyüklüğü -0.12 değerindeyken, Leu-Leu etkileşim büyüklüğü -7.37 değerindedir.

En küçük ve en büyük skala aralıkları olarak verilen bu amino asitler farklı yan zincir özelliklerine sahiptirler. Böylece her amino asit çiftinin karakteristik özellikleri etkileşim büyüklüklerindeki farklılıklar olarak karşımıza çıkmaktadır.

**Çizelge 3.1.** Miyazawa-Jernigan etkileşim potansiyeli ( $\epsilon_{ij}^{\text{nat}}$ )

	CYS	MET	PHE	ILE	LEU	VAL	TRP	TYR	ALA	GLY	THR	SER	ASN	GLN	ASP	GLU	HIS	ARG	LYS	PRO
CYS	-5.44	-4.99	-5.80	-5.50	-5.83	-4.96	-4.95	-4.16	-3.57	-3.16	-3.11	-2.86	-2.59	-2.85	-2.41	-2.27	-3.60	-2.57	-1.95	-3.07
MET	-4.99	-5.46	-6.56	-6.02	-6.41	-5.32	-5.55	-4.91	-3.94	-3.39	-3.51	-3.03	-2.95	-3.30	-2.57	-2.89	-3.98	-3.12	-2.48	-3.45
PHE	-5.80	-6.56	-7.26	-6.84	-7.28	-6.29	-6.16	-5.66	-4.81	-4.13	-4.28	-4.02	-3.75	-4.10	-3.48	-3.56	-4.77	-3.98	-3.36	-4.25
ILE	-5.50	-6.02	-6.84	-6.54	-7.04	-6.05	-5.78	-5.25	-4.58	-3.78	-4.03	-3.52	-3.24	-3.67	-3.17	-3.27	-4.14	-3.63	-3.01	-3.76
LEU	-5.83	-6.41	-7.28	-7.04	-7.37	-6.48	-6.14	-5.67	-4.91	-4.16	-4.34	-3.92	-3.74	-4.04	-3.40	-3.59	-4.54	-4.03	-3.37	-4.20
VAL	-4.96	-5.32	-6.29	-6.05	-6.48	-5.52	-5.18	-4.62	-4.04	-3.38	-3.46	-3.05	-2.83	-3.07	-2.48	-2.67	-3.58	-3.07	-2.49	-3.32
TRP	-4.95	-5.55	-6.16	-5.78	-6.14	-5.18	-5.06	-4.66	-3.82	-3.42	-3.22	-2.99	-3.07	-3.11	-2.84	-2.99	-3.98	-3.41	-2.69	-3.73
TYR	-4.16	-4.91	-5.66	-5.25	-5.67	-4.62	-4.66	-4.17	-3.36	-3.01	-3.01	-2.78	-2.76	-2.97	-2.76	-2.79	-3.52	-3.16	-2.60	-3.19
ALA	-3.57	-3.94	-4.81	-4.58	-4.91	-4.04	-3.82	-3.36	-2.72	-2.31	-2.32	-2.01	-1.84	-1.89	-1.70	-1.51	-2.41	-1.83	-1.31	-2.03
GLY	-3.16	-3.39	-4.13	-3.78	-4.16	-3.38	-3.42	-3.01	-2.31	-2.24	-2.08	-1.82	-1.74	-1.66	-1.59	-1.22	-2.15	-1.72	-1.15	-1.87
THR	-3.11	-3.51	-4.28	-4.03	-4.34	-3.46	-3.22	-3.01	-2.32	-2.08	-2.12	-1.96	-1.88	-1.90	-1.80	-1.74	-2.42	-1.90	-1.31	-1.90
SER	-2.86	-3.03	-4.02	-3.52	-3.92	-3.05	-2.99	-2.78	-2.01	-1.82	-1.96	-1.67	-1.58	-1.49	-1.63	-1.48	-2.11	-1.62	-1.05	-1.57
ASN	-2.59	-2.95	-3.75	-3.24	-3.74	-2.83	-3.07	-2.76	-1.84	-1.74	-1.88	-1.58	-1.68	-1.71	-1.68	-1.51	-2.08	-1.64	-1.21	-1.53
GLN	-2.85	-3.30	-4.10	-3.67	-4.04	-3.07	-3.11	-2.97	-1.89	-1.66	-1.90	-1.49	-1.71	-1.54	-1.46	-1.42	-1.98	-1.80	-1.29	-1.73
ASP	-2.41	-2.57	-3.48	-3.17	-3.40	-2.48	-2.84	-2.76	-1.70	-1.59	-1.80	-1.63	-1.68	-1.46	-1.21	-1.02	-2.32	-2.29	-1.68	-1.33
GLU	-2.27	-2.89	-3.56	-3.27	-3.59	-2.67	-2.99	-2.79	-1.51	-1.22	-1.74	-1.48	-1.51	-1.42	-1.02	-0.91	-2.15	-2.27	-1.80	-1.26
HIS	-3.60	-3.98	-4.77	-4.14	-4.54	-3.58	-3.98	-3.52	-2.41	-2.15	-2.42	-2.11	-2.08	-1.98	-2.32	-2.15	-3.05	-2.16	-1.35	-2.25
ARG	-2.57	-3.12	-3.98	-3.63	-4.03	-3.07	-3.41	-3.16	-1.83	-1.72	-1.90	-1.62	-1.64	-1.80	-2.29	-2.27	-2.16	-1.55	-0.59	-1.70
LYS	-1.95	-2.48	-3.36	-3.01	-3.37	-2.49	-2.69	-2.60	-1.31	-1.15	-1.31	-1.05	-1.21	-1.29	-1.68	-1.80	-1.35	-0.59	-0.12	-0.97
PRO	-3.07	-3.45	-4.25	-3.76	-4.20	-3.32	-3.73	-3.19	-2.03	-1.87	-1.90	-1.57	-1.53	-1.73	-1.33	-1.26	-2.25	-1.70	-0.97	-1.75



**Çizelge 3.2.** Miyazawa-Jernigan etkileşim potansiyel değerlerinin ortalaması sıfır olduğu durum ( $\epsilon_{ij}^{\text{non-nat}}$ )

	CYS	MET	PHE	ILE	LEU	VAL	TRP	TYR	ALA	GLY	THR	SER	ASN	GLN	ASP	GLU	HIS	ARG	LYS	PRO
CYS	-2.27	-1.8	-2.63	-2.33	-2.66	-1.79	-1.78	-0.99	-0.4	0.01	0.05	0.3	0.5	0.31	0.79	0.89	-0.43	0.59	1.21	0.09
MET	-1.8	-2.29	-3.39	-2.85	-3.24	-2.15	-2.38	-1.74	-0.77	-0.22	-0.34	0.13	0.21	0.13	0.99	0.27	-0.81	0.04	0.68	-0.28
PHE	-2.63	-3.39	-3.81	-3.67	-4.11	-3.12	-2.99	-2.49	-1.64	-0.96	-1.11	-0.85	-0.58	-0.93	-0.31	-0.39	-1.60	-0.81	-0.19	-1.08
ILE	-2.33	-2.85	-3.67	-3.34	-3.87	-2.88	-2.61	-2.08	-1.41	-0.61	-0.86	-0.35	-0.07	-0.50	-0.00	-0.10	-1.24	-0.46	0.15	-0.59
LEU	-2.66	-3.24	-4.11	-3.87	-4.20	-3.31	-2.97	-2.50	-1.74	-0.99	-1.17	-0.75	-0.57	-0.87	-0.23	-0.42	-1.37	-0.86	-0.20	-1.03
VAL	-1.79	-2.15	-3.12	-2.88	-3.31	-2.35	-2.01	-1.45	-0.87	-0.21	-0.29	0.11	0.33	0.09	0.68	0.49	-0.41	0.09	0.67	-0.15
TRP	-1.78	-2.38	-2.99	-2.61	-2.97	-2.01	-1.89	-1.49	-0.65	-0.25	-0.05	0.17	0.09	0.01	0.32	0.17	-0.81	-0.24	0.47	-0.56
TYR	-0.99	-1.74	-2.49	-2.08	-2.50	-1.45	-1.49	-1.00	-0.19	0.15	0.15	0.38	0.40	0.19	0.41	0.37	-0.35	0.01	0.56	-0.02
ALA	-0.4	-0.77	-1.64	-1.41	-1.74	-0.87	-0.65	-0.19	0.44	0.85	0.84	1.15	1.32	1.27	1.46	1.65	0.75	1.33	1.85	1.13
GLY	0.01	-0.22	-0.96	-0.61	-0.95	-0.21	-0.25	0.15	0.85	0.92	1.08	1.34	1.42	1.50	1.57	1.94	1.01	1.44	2.01	1.29
THR	0.05	0.34	-1.11	-0.86	-1.17	-0.29	-0.05	0.15	0.84	1.08	1.04	1.20	1.28	1.26	1.36	1.42	0.74	1.26	1.85	1.26
SER	0.3	0.13	-0.85	-0.35	-0.75	0.11	0.17	0.15	1.15	1.34	1.20	1.49	1.58	1.67	1.53	1.68	1.05	1.54	2.11	1.59
ASN	0.5	0.21	-0.58	-0.07	-0.57	0.33	0.09	0.40	1.32	1.42	1.28	1.58	1.48	1.45	1.48	1.65	1.08	1.52	1.95	1.63
GLN	0.31	-0.13	-0.93	-0.50	-0.87	0.09	0.01	0.19	1.27	1.50	1.26	1.67	1.45	1.62	1.70	1.74	1.18	1.36	1.87	1.43
ASP	0.79	0.59	-0.31	-0.00	-0.23	0.68	0.32	0.40	1.46	1.57	1.36	1.53	1.48	1.70	1.95	2.14	0.84	0.87	1.48	1.83
GLU	0.89	0.27	-0.39	-0.10	-0.42	0.49	0.17	0.37	1.65	1.94	1.42	1.68	1.65	1.74	2.14	2.25	1.01	0.89	1.36	1.90
HIS	-0.43	-0.81	-1.60	-1.24	-1.37	-0.41	-0.81	-0.35	0.75	1.01	0.74	1.05	1.08	1.18	0.84	1.01	0.11	1.01	1.81	0.91
ARG	0.59	0.04	-0.81	-0.46	-0.86	0.09	-0.24	0.01	1.33	1.44	1.26	1.54	1.52	1.36	0.87	0.89	1.01	1.61	2.57	1.46
LYS	1.21	0.68	-0.19	0.15	-0.20	0.67	0.47	0.56	1.85	2.01	1.85	2.11	1.95	1.87	1.48	1.36	1.81	2.57	3.04	2.19
PRO	0.09	-0.28	-1.08	-0.59	-1.03	-0.15	-0.56	-0.02	1.13	1.29	1.26	1.59	1.63	1.43	1.83	1.90	0.91	1.46	2.19	1.41

Tüm bunlara ek olarak heterojen etkileşimli modeller için katlı durumdaki etkileşmeler için Çizelge 3.1.'de verilen değerler dikkate alınırken katlı yapıda olmayan etkileşmeler için amino asit çiftleri arasındaki etkileşimlerin ortalaması sıfır olacak şekilde bir düzenlemeye gidilir.  $\langle \epsilon_{ij} \rangle_{MJ} = 0$  Bu şekilde etkileşim terimleri pozitif ve negatif değerler almaktadır. Çizelge 3.2'de bulunan değerler incelendiği zaman pozitif olarak gösterilenler itici, negatif olarak gösterilenler ise çekici etkileşimleri göstermektedir. İtici etkileşimlerin dikkate alındığı ve alınmadığı durumlar için kısa erişimli etkileşmeler incelenmiştir. Çünkü heterojen etkileşimli Gō modelinde etkileşimlerin uzun erişimli olduğu ve orjinal Miyazawa-Jernigan potansiyel değerlerinin kullanıldığı durumda yapılan incelemelerde (Kaya 2009) herhangi bir açılma ve katlanma geçişine rastlanamamıştır. Seçilen her sıcaklık değerinde incelenen proteinler hızlı bir şekilde katlı olmayan bir globüler sıcaklık değerine ulaşır bu yapı etrafında dalgalanmaktadır. Dolayısıyla uzun erişimli etkileşmeler bu tez çalışmasındaki verilerin elde edilmesinde kullanılmamıştır. Göz önüne alınan model yaklaşımlarında tüm bu durumlar göz önüne alınarak yapılmıştır. Kullanılan modellerin tamamı Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.** Farklı özelliklere sahip 4 farklı model yaklaşımı

Bu dört modelin kullanılmasıyla küçük tek bölgeli proteinlerde gözlemlenen bariyerli ve bariyersiz davranışlara sebebiyet veren etkileşim mekanizmaları incelendi. Simülasyon tekniği olarak belirlenen moleküler dinamik simülasyon tekniği ile açılma-katlanma geçişleri tek ve iki durumlu olarak farklı proteinler için elde edilmiş olup bu değerlendirmelere sonuçlar bölümünde yer verilecektir.

### 3.2. Simülasyon Tekniği

Çalışmamız sırasında moleküler dinamik simülasyon tekniğini kullanıldı. İncelenen proteindeki amino asitlerin her birini bir  $C_\alpha$  atomu ile temsil edildi. Amino asitler birbirlerine kovalent bağlarla bağlı oldukları için sistemin serbestlik derecesi düşüktür. Sistemin konformasyonel kuvveti modelin toplam potansiyel enerjisinin negatif gradyentine eşittir. Eşitlik 3.1 ile gösterilmektedir.

$$F_{konf} = -\nabla V \quad (3.1)$$

Protein spesifik bir yaklaşım içinde konformasyonel kuvvetin hesaplanabilmesi için; yerel ve yerel olmayan etkileşimlerden oluşan etkileşim potansiyelinin bilinmesi gerekmektedir. Proteinlerin atomik etkileşimleri, temel olarak yarı deneysel potansiyel enerji fonksiyonu ile modellenmektedir. Binlerce atom içeren bu sistemlerde sadece bir enerji hesabı bile bu durumda birçok terimin hesaplanmasını dolayısıyla güçlü bilgisayar hesaplamalarına olan büyük ihtiyacı gösterir.

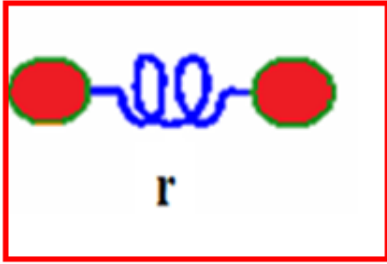
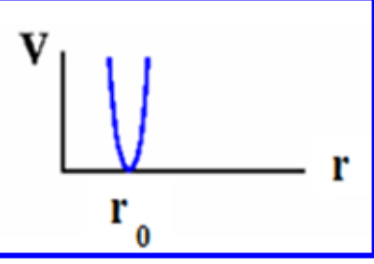
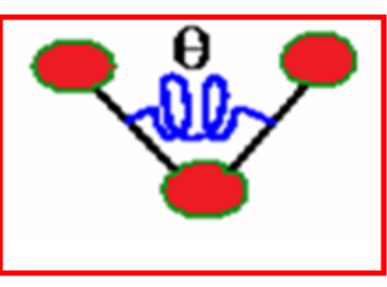
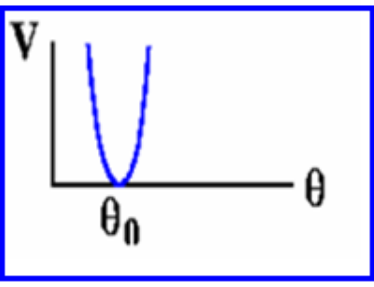
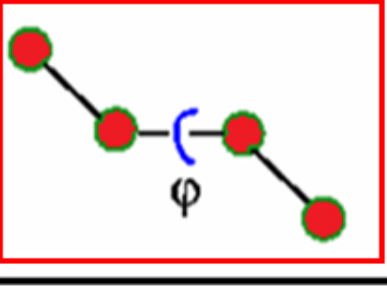
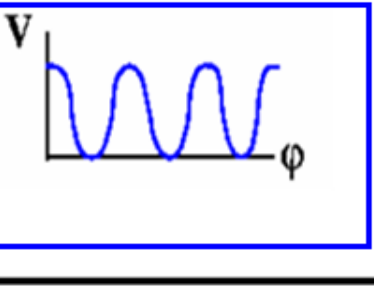

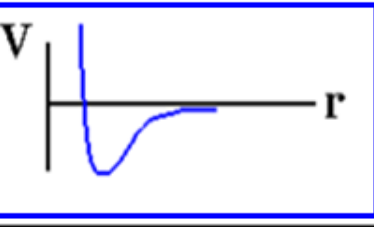
### 3.2.1 Kuvvet Alanları

Kuvvet alanları molekülleri oluşturan atomların koordinatlarında molekülün enerjisine bağlı olarak tanımlanan matematiksel ifadedir. Kuvvet alanları yapı tahminleri ve konformasyonel enerjinin belirlenmesi problemlerinde kullanılmaktadır. Moleküler dinamik simülasyon tekniği ile kuvvet alanlar kullanılarak yapılan çalışmalar günümüzde küçük moleküller için yüksek derecede doğruluğa yakın bir şekilde tasarlanırken proteinler gibi makro moleküller için yapılan çalışmalarda mevcuttur. Kuvvet alan ifadeleri deneysel olarak yapılan çalışmalardan elde edilen veriler kullanılarak geliştirilmektedir. Protein katlanma problemi için kullanılan atomik modeller klasik kuvvet alanlarından faydalanılarak yapılmaktadır. Protein ve çözücü (solvent) içinde bulunan atomlar arasındaki fiziksel etkileşimleri en iyi ifade eden yol budur. Sistemin enerjisi atomlar arası potansiyellerin toplamı olarak tanımlanmaktadır (Pande 2005).

Kuvvet alanları çeşitli parametre setlerinden oluşmaktadır. Bir moleküler dinamik simülasyonunda bulunan tipik bir potansiyel enerji fonksiyonu üç ayrı bölümden meydana gelmektedir. Bu bölümler; bağlı etkileşimler, bağımsız etkileşimler ve diğer özel terimlerdir. Bağımsız etkileşimler genellikle Lenard Jones ve Coulomb etkileşimlerini içermektedir. Bağılı etkileşimler ise birbirlerine kovalent bağlarla bağlanmış gerilme, eğilme ve bükülme terimlerini içermektedir. Bağılı etkileşimler molekülün özel sterokimyasını ele alarak kovalent bağların doğasını içine almaktadır. İncelenen molekülün konformasyonel uzayının belirlenmesinde önemli rol oynar.

Genel olarak proteinlerdeki atomik ölçekteki etkileşimleri yerel ve yerel olmayan olarak iki ayrı grup altında toplayabiliriz. Yerel (Local) etkileşimler proteini meydana getiren amino asit zinciri üzerindeki birbirlerine yakın amino asitler arasındaki etkileşimleri oluşturur. Bunlara örnek olarak gerilme, eğilme ve bükülme etkileşimleri verilebilir. Yerel olmayan (Non-local) etkileşimler ise birbirinden uzak olan amino asitler arasındaki etkileşimleri tanımlamak için kullanılmaktadır.

Bağısız etkileşimler ise yerel olmayan etkileşimler grubunda bulunmaktadır. Protein katlanma problemini açıklamak için moleküler dinamik simülasyonunda kullanılacak yerel ve yerel olmayan terimlerden meydana gelen konformasyonel enerjisi şu şekilde ifade edilir (Kaya and Chan 2003).

Gerilme etkileşim potansiyeli	 <p style="text-align: center;"><math>r</math></p>	 <p style="text-align: center;"><math>r_0</math></p>
Eğilme etkileşim potansiyeli	 <p style="text-align: center;"><math>\theta</math></p>	 <p style="text-align: center;"><math>\theta_0</math></p>
Bükülme etkileşim potansiyeli	 <p style="text-align: center;"><math>\phi</math></p>	 <p style="text-align: center;"><math>\phi</math></p>
Bağısız etkileşim potansiyeli		 <p style="text-align: center;"><math>r</math></p>

Şekil 3.3. Potansiyel enerji ifadesinde yer alan her bir terim

$$\begin{aligned}
V &= V_{\text{gerilme}} + V_{\text{eğilme}} + V_{\text{bükülme}} + V_{\text{bağımsız}} \\
&= \sum_{\text{bağlar}}^{N-1} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\substack{\text{eğilme} \\ \text{açıları}}}^{N-2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
&+ \sum_{\substack{\text{bükülme} \\ \text{açıları}}}^{N-3} \left\{ K_\phi^{(1)} [1 - \cos(\phi - \phi_0)] + K_\phi^{(3)} [1 - \cos 3(\phi - \phi_0)] \right\} \\
&+ \sum_{i < j-3}^{\text{native}} \epsilon_{ij}^{\text{nat}} \left[ 5 \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 6 \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{10} \right] + \sum_{i < j-3}^{\text{native olmayan}} \epsilon \left( \frac{r_{\text{rep}}}{r_{ij}} \right)^{12} \\
&+ \sum_{i < j-3}^{\text{native olmayan}} \epsilon_{ij}^{\text{non-nat}} \left( \frac{r_{ij}^{\text{rep}}}{r_{ij}} \right)^{12} \tag{3.2}
\end{aligned}$$

Şekil 3.3’de potansiyel ifadesinde bulunan her bir terim gösterilmektedir. Burada incelenen sistem polimer bir yapı olduğu için bu yapıyı oluşturan birimler arasındaki ilişkiler göz önüne alınır. Bu yapı birimleri arasındaki bağlar kovalent bağlarla birarada buldukları için harmonik potansiyellerle ifade edilebilir. Konformasyonel enerji ifadesinde bulunan ilk üç terim bağlı etkileşimleri göstermekte olup yerel konformasyonel eğilimleri belirlemektedir.  $N$  toplam amino asit sayısını göstermektedir. Bu terimlerdeki  $r_0, \theta_0$  ve  $\phi_0$  parametreleri proteinin kristal yapısından elde edilmiştir. Bu şekilde gerekli olan biyoinformatik bilgiler elektronik ortamda bulunan (PDB, SCOP, vb) çeşitli veri bankalarından elde edilebilmektedir. Yine aynı terimlerde bulunan  $K_r, K_\theta, K_\phi^{(1)}$  ve  $K_\phi^{(3)}$  parametreleri etkileşim katsayılarını göstermektedir. Bu parametrelerin aldıkları değerler ise;  $100\epsilon, 20\epsilon, \epsilon$  ve  $0.5\epsilon$  değerine sahiptir. (Kaya and Chan 2003) Gerilme (Stretching) etkileşim potansiyelinde iki amino asiti birbirlerine yay ile bağlı bir fiziksel sistem olarak düşünebiliriz. İkinci terim eğilme (Bending) etkileşim potansiyelinde ise; zincir üzerindeki birbirine bağlı üç amino asit aynı davranış içindedir. Birbirlerine komşu dört amino asit arasında gerçekleşen etkileşim bükülme (Torsion) potansiyeli olarak tanımlanmaktadır. Dört parçacığın koordinatına bağlı olan bu potansiyel teriminde parçacıklar aralarında  $\Phi$  açısı olacak

şekilde iki farklı düzlem üzerindedir. Bu tarzda düşünülen etkileşimler sistemin statik ve dinamik özelliklerini değiştiren etkenler oldukları için göz önüne alınması önemlidir.

Konformasyonel enerjisi ifadesinde bulunan dördüncü terim ise; amino asit zinciri üzerinde birbirinden en az dört amino asit kadar uzak mesafede olan amino asitler için ele alınan etkileşim potansiyelidir. Protein katlanmasında atomlar arasındaki etkileşimleri kontrol eden itici ve çekici özelliklerdeki Van Der Waals kuvvetleridir. Bu etkileşimler komşu yüksüz ve bağırsız atomlar arasında oluşur ve atomların içindeki yük yoğunluklarındaki dalgalanmalardan dolayı dipollerin indüksiyonundan meydana gelir. Van der waals kuvvetleri zayıf olmasına rağmen özellikle protein konformasyonlarının etkilendiği diğer kuvvetlerle karşılaştırıldığında proteinlerdeki tersiyer yapının sürekliliğinde bu etkileşimler önemli bir etki yapar (Whitford 2005).

Bu potansiyel Lenard-Jones potansiyeli olarak adlandırılmaktadır. Bu ifadede bulunan pozitif terim itmeyi, negatif terim ise çekmeyi ifade etmektedir.  $r_{ij}^0$  denge mesafesini göstermektedir. Konformasyonel enerjisi ifadesinde bulunan bir diğer terim ise; proteinin katlanmış yapısında birbirleriyle etkileşmeyen ancak konformasyonel geçişler sırasında birbirlerine dört amino asitten daha yakın olan amino asitler için itme potansiyelini göstermektedir.  $r_{rep}$ , iki atomun birbirlerine yaklaşabileceği maksimum mesafeyi (hard-core) tanımlamaktadır. Simülasyon çalışmalarında genel amaç minimum serbestlik derecesi ile maksimum gerçekliği sağlamaktır. Bu yüzden yapılan her detaylı inceleme için kuvvet alanı oluşturan terimlere ve parametrelere bir yenisi eklenebilmektedir. Bu potansiyel ifadesindeki farklardan biri,  $\epsilon_{ij}^{nat}$  yani katlanmış yapıda birbirleriyle etkileşen amino asit çiftleri için çekici etkileşim büyüklüğüdür. Bunun için Miyazawa-Jernigan ( $MJ$ ) değerleri kullanılmıştır. Buradaki beşinci terim katlanmış yapıda birbirleriyle etkileşmeyen ama konformasyonel geçişler sırasında birbirlerine 4 Angstrom'den daha yakın olan amino asitler için itme potansiyelidir ( $r_{rep} = 4 \text{ \AA}$ ). En son terim ise katlanmış yapıda birbirleriyle etkileşmeyen fakat konformasyonel geçişler sırasında birbirlerine etkileşecek kadar yaklaştıklarında ( $r_{ij}^{rep} < 6,4$ ) birbirlerini iten yani, katlı yapıda olmayan itici etkileşme terimidir.

Katlanma ve açılma kinetiklerinin simüle edildiği model proteinin her bir serbestlik derecesi için Langevin dinamikleri ise şu şekilde ifade edilebilir.

$$m\dot{v}(t) = F_{\text{konf}}(t) - m\gamma v(t) + \eta(t) \quad (3.3)$$

Bu eşitlikteki her bir terimi sırasıyla açıklarsak  $m$ ,  $v$ ,  $\dot{v}$ ,  $F_{\text{konf}}$ ,  $\gamma$  ve  $\eta$  kütle, hız, ivme, konformasyonel kuvvet, sürtünme katsayısını ve rastgele kuvveti göstermektedir. Toplam etkileşim enerjisinin negatif gradyenti olarak  $F_{\text{konf}}$  hesaplanmaktadır. Otokorelasyon şartını yerine getiren rastgele kuvvet (random force) ifadesi ise;

$$\langle \eta(t)\eta(t') \rangle = 2m\gamma k_B T \delta(t - t') \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte yer alan  $k_B$ , mutlak sıcaklıktaki Boltzman sabitidir. Herbir integrasyon zaman adımında  $C_\alpha$  atomlarına etki eden rastgele kuvvet ise;

$$\eta_i = \sqrt{\left(\frac{2m\gamma k_B T}{\delta t}\right)} \xi_i \quad (3.5)$$

$\xi_i$ , ortalaması sıfır, standart sapması bir olan simetrik bir Gauss dağılımına uyan rastgele sayı üreten bir fonksiyondur.  $\delta t$ , integrasyon zaman aralığıdır. Simülasyonun başlangıcında T sıcaklığında rastgele sayı üreten bir fonksiyon ile ilk hız değerleri ise;

$$v_i = \sqrt{\left(\frac{k_B T}{m}\right)} \xi_i \quad (3.6)$$

Bu ifade için kullanılan eş bölüşüm teoreminde N serbestlik derecesine sahip  $x$ ,  $y$ ,  $z$  koordinatlarının herhangi biri için kinetik enerji;  $\frac{1}{2}k_B T$  olurken  $3N$  serbestlik derecesi



için;  $\frac{3}{2}k_B T$  olmaktadır. Simülasyona açık veya kapalı konformasyonlardan elde ettiğimiz koordinat setlerinin herhangi biri ile başlarız.

Bununla birlikte,  $T$  (sıcaklık),  $x$ ,  $y$ ,  $z$  (başlangıç koordinatları) ve  $V_x$ ,  $V_y$  ve  $V_z$  (başlangıç hızları) bilinmelidir.  $N$  atom sayısı için  $3N$  tane hız terimi vardır.

$$V_{toplam} = \sum_i^{3N} V_i \quad (3.7)$$

Bu ifadeyi normalize etmek için eşitlik 3.8 ile verilen ifade kullanılır.

$$\bar{v} = \frac{v_{toplam}}{3N} \quad (3.8)$$

Normalize etmekle amacımız kinetik enerji ile simülasyon sıcaklığını karşılaştırmaktır. Böylece gerçekten hızların sıcaklığa uygun olarak üretilip üretilmediğine bu yolla bakılabilmektedir. Burada bulunan hız ile kinetik enerji gerçeğe daha yakın olmaktadır. İncelenen sistemin herhangi bir  $t$  zamanında parçacıkların konum ve hız gibi dinamikleri bilindiğine göre  $t + \delta t$  şeklinde verilen bir zaman adımı sonrasında hesaplayabilmek için; Verlet hız algoritması kullanılmaktadır. Bu algoritma yardımıyla hesaplanan konumlar şu şekilde ifade edilebilmektedir (Veithans *et al.*1996).

$$x(i) = x(i) + \delta t v_x(i) + \delta t^2 [F_{x,konf}^{\text{önceki}}(i) + F_{x,rastgele}^{\text{önceki}}(i) - \gamma v_x(i)]/2 \quad (3.9)$$

$$y(i) = y(i) + \delta t v_y(i) + \delta t^2 [F_{y,konf}^{\text{önceki}}(i) + F_{y,rastgele}^{\text{önceki}}(i) - \gamma v_y(i)]/2 \quad (3.10)$$

$$z(i) = z(i) + \delta t v_z(i) + \delta t^2 [F_{z,konf}^{\text{önceki}}(i) + F_{z,rastgele}^{\text{önceki}}(i) - \gamma v_z(i)]/2 \quad (3.11)$$

Burada koordinatlara göre önceki ve yeni şekilde ifade edilen konformasyonel ve rastgele kuvvetler gösterilmiştir. Artık her yeni konformasyon için bu şekilde birbirine atamalar yapılarak simülasyonun sürekliliği sağlanır. Parçacıkların hızları ise kullanılan sabitler şu şekilde ifade edilmektedir.

$$v_x(i) = c_1 v_x(i) + c_2 [F_{x,konf}^{\text{önceki}}(i) + F_{x,rastgele}^{\text{önceki}}(i) + F_{x,konf}^{\text{yeni}}(i) + F_{x,rastgele}^{\text{yeni}}(i)] \quad (3.12)$$

$$v_y(i) = c_1 v_y(i) + c_2 [F_{y,konf}^{\text{önceki}}(i) + F_{y,rastgele}^{\text{önceki}}(i) + F_{y,konf}^{\text{yeni}}(i) + F_{y,rastgele}^{\text{yeni}}(i)] \quad (3.13)$$

$$v_z(i) = c_1 v_z(i) + c_2 [F_{z,konf}^{\text{önceki}}(i) + F_{z,rastgele}^{\text{önceki}}(i) + F_{z,konf}^{\text{yeni}}(i) + F_{z,rastgele}^{\text{yeni}}(i)] \quad (3.14)$$

Eşitlik (3.12), (3.13), (3.14) ile verilen ifadelerde  $c_0$ ,  $c_1$ ,  $c_2$  ile gösterilen sabitlerin değerleri aşağıda gösterilmektedir.

$$c_0 = \frac{\gamma \delta t}{2m}$$

$$c_1 = (1 - c_0)(1 - c_0 + c_0^2)$$

$$c_2 = \frac{\delta t}{2m} (1 - c_0 + c_0^2)$$

Verlet algoritmalarında daha hassas hesaplamalar için türev dereceleri artırılabilir. Ancak bu durum hesaplamalarda zaman kaybına neden olmaktadır. Uzun zaman aralıklarında çalışması gereken simülasyonlarda daha çok Verlet algoritması tercih edilmektedir. Dinamik süreçlerin davranışlarını kontrol etmek oldukça hassas olarak belirlenmiş parametreler ve zamanlama gerektirir. Moleküler dinamik simülasyonlarında süre belirlenirken dikkat edilen kriter; istatistiksel tahminler yapabilecek kadar çok veriye sahip olunmasıdır. Simülasyon sırasında model sistemin

zaman ölçeği;  $\tau = \sqrt{ma^2/\epsilon_0}$  niceliği ile kontrol edilirken,  $a$  ile gösterilen mesafenin değeri (hard-core)  $4\text{Å}$  olarak alınmıştır. Enerji ölçeği  $\epsilon_0 = 1$ 'dir.

Aynı şekilde Boltzman sabiti ve kütle değerleri,  $k_B = 1$ ,  $m = 1$  olarak simülasyon boyunca alınmıştır. Viskozitenin dinamiğe etkisi  $\gamma = 0,05\tau^{-1}$  olarak gösterilmiştir. Sayısal integrasyon sırasında moleküler dinamik zaman ölçeği ;  $\delta t = 0,005\tau$  alınmıştır. Etkileşim ne kadar güçlü ise  $\tau$  o kadar küçük olmaktadır. Konformasyonel örneklemler her 400 adımda birbirinden bağımsız örnekleme uzayından alınan enstantane (snapshot) üzerinden gösterilmektedir. Yapılan simülasyon ile dinamik ve enerjetik değişimler hakkında bilgi sahibi olabiliriz.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

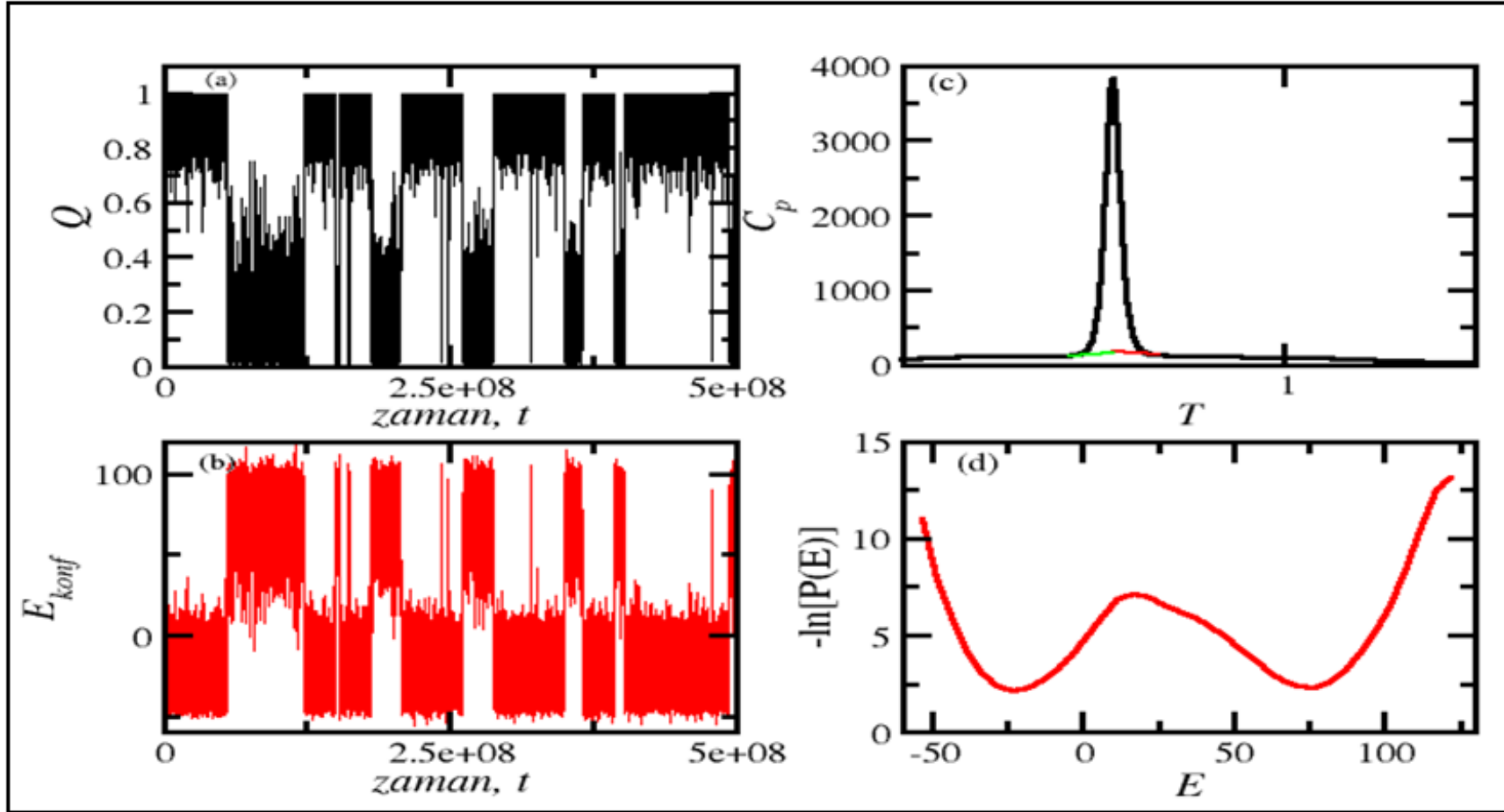
### 4.1. Tüm Model Yaklaşımlar İçin İki ve Tek Durumlu Davranış Gösteren Proteinlerin Termodinamik Analizi

Bu tez çalışmasında, üzerinde çalışılan her bir protein için moleküler dinamik simülasyon metodu yardımıyla incelediğimiz dört farklı model yaklaşımında öncelikle geçiş sıcaklığını elde edebilmek için çeşitli sıcaklık değerlerinin bir taraması simülasyon dahilinde birbirinden bağımsız 400 adımda gerçekleştirildi. Geniş bir sıcaklık aralığında yapılan tarama sonucunda protein katlanma ve açılma geçişlerinin en iyi örneklendiği yani maksimum ısı kapasitesine karşılık gelen sıcaklık değeri geçiş sıcaklığı olarak belirlendi. İncelenen proteinlerin 500 000 000 zaman adımında trajektörleri elde edilerek ısı kapasitesi eğrisi, serbest enerji profili oluşturulmak suretiyle termodinamik analizi yapıldı. Bu genel bilgilerin ışığında termodinamik olarak iki durumlu davranış gösteren tamamen beta yapısına sahip, PDB (protein veri bankası) kodu 1RLQ (C-SRC Tyrosine Kinase SH3 Domain), amino asit sayısı ise; 56 olan protein ile tek durumlu davranış gösteren tamamen alfa yapısına sahip PDB kodu 1BBL (Escherichia coli's 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex) amino asit sayısı 37 olan proteinin termodinamik analizleri yapıldı. 1RLQ proteini sinyal iletimi yapan bir peptid olup Escherichia coli kaynaklıdır. 1BBL ise canlıda glikoliz görevi yapmaktadır. Escherichia coli bakterisinin çoklu enzim kompleksidir. Her iki protein arasında termodinamiksel olarak gözlemlenen farklar tablo ve grafikler olarak sunulmuştur. Ayrıca 1RLQ ve 1BBL proteinlerinin 3 boyutlu yapıları RASMOL isimli makromolekül görüntüleme yazılımıyla görselleştirilmiştir.

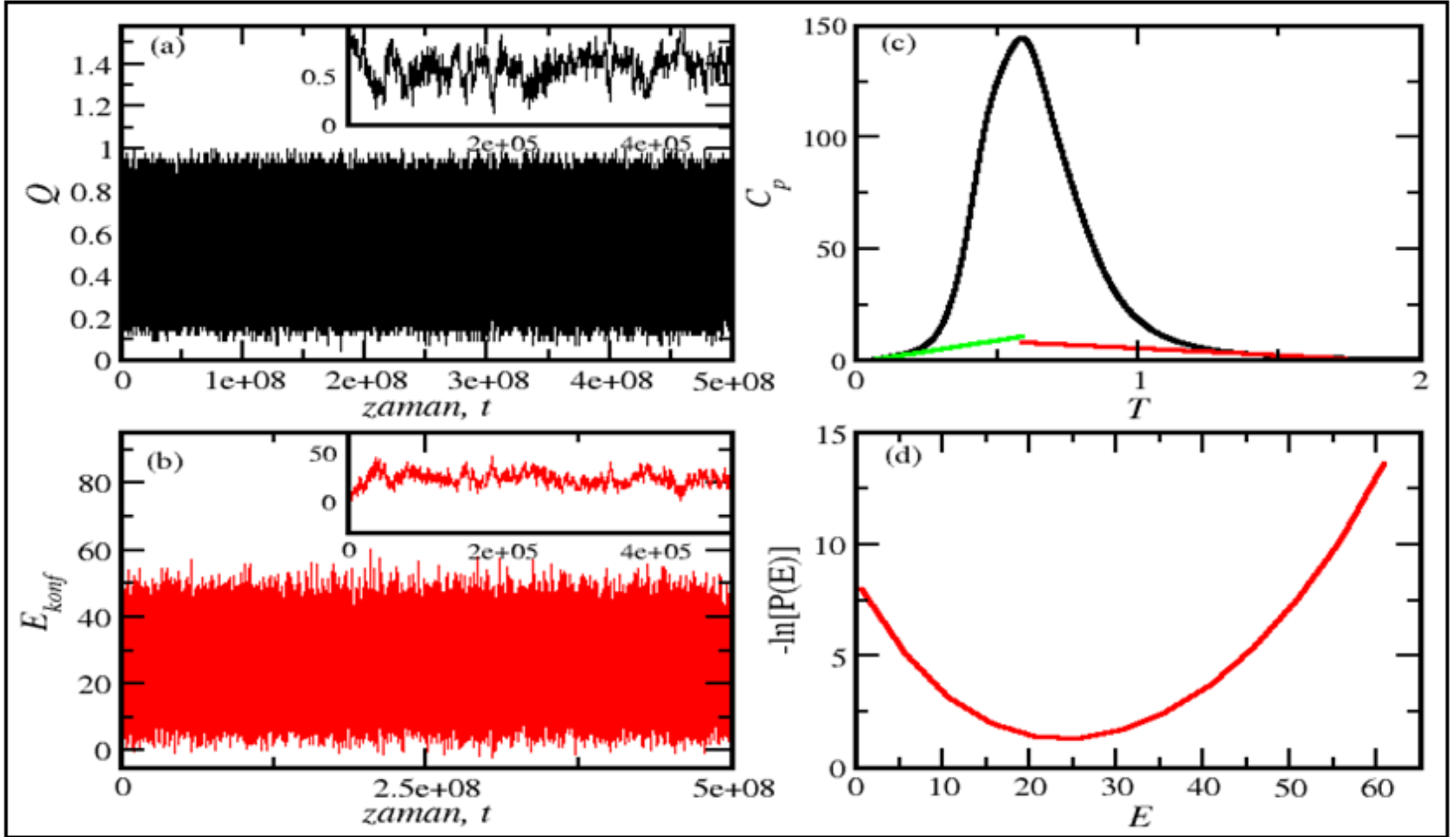


**Şekil 4.1.** 1BBL ve 1RLQ proteinlerinin topolojik gösterimleri

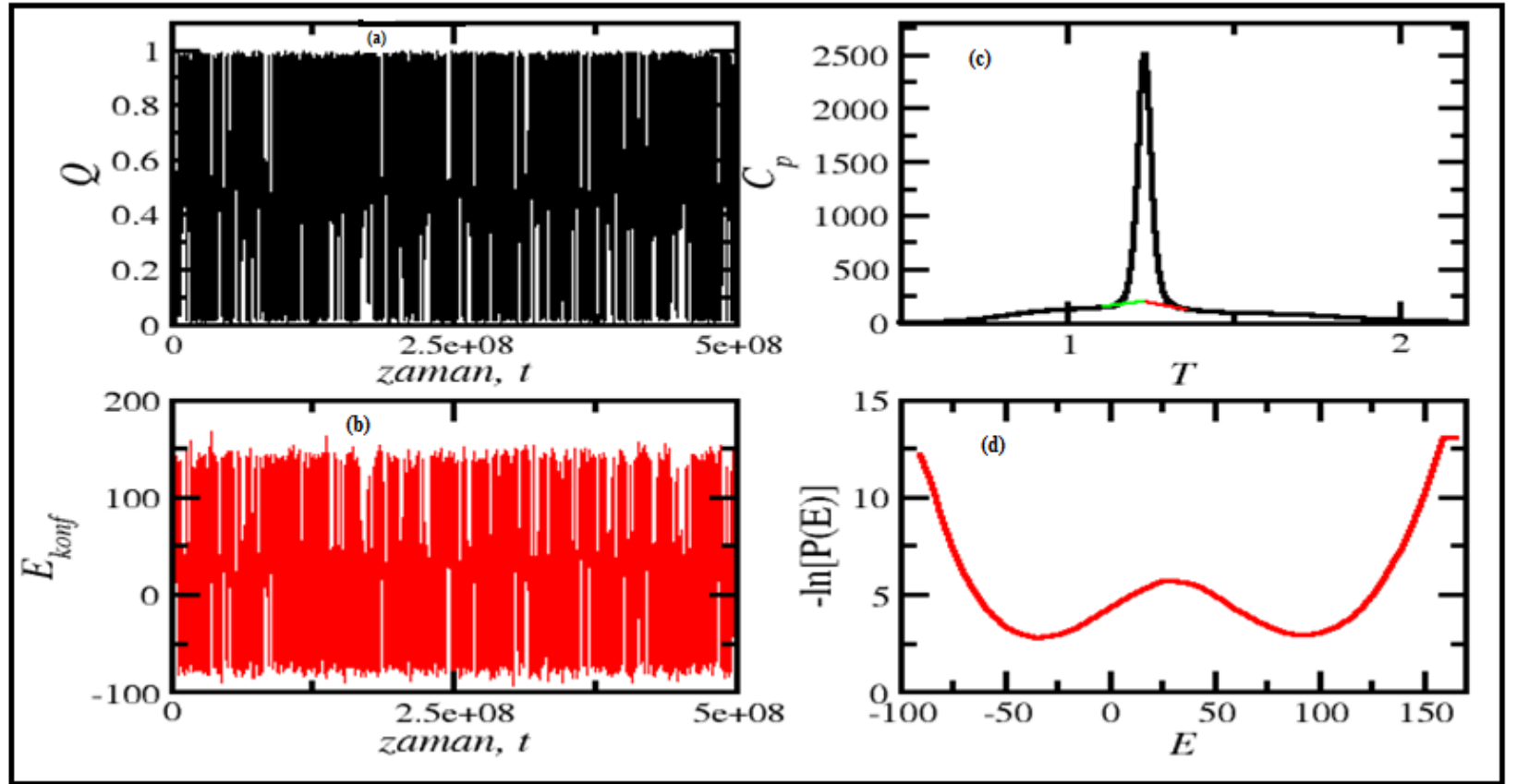
Şekil 4.1’de iki proteinin topolojik yapısına baktığımızda 1BBL proteinin 3 tane alfa sarmal yapından meydana geldiği, 1RLQ proteininin ise tamamen beta yapılarından oluştuğu görülmektedir. Bu şekildeki katlanmış yapı geometrisi ve proteinlerin amino asit sayılarını gösteren zincir uzunluklarının farklı olması bu proteinlerin termodinamik olarak farklı davranışlar sergilemelerinin sebepleri arasında sayılmaktadır. Bu iki protein için Şekil 4.2’den Şekil 4.9’a kadar olan grafiklerde sırasıyla şu gösterimler bulunmaktadır. Grafiklerde (a) ile  $Q$  katlanmış yapıya benzerlik parametresinin zamana karşı değişimi, (b) ile konformasyonel enerjinin zamana karşı trajektörüsü, (c) ile gösterilmekte olan ısı kapasitesi eğrisi olup yeşil renk sol sınır çizgisi çıkarımını (baseline subtraction), kırmızı renk ise sağ sınır çizgisi çıkarımını gösterirken son olarak (d) ile serbest enerji profilinin gösterimine yer verildi.



Şekil 4.2. 1RLQ proteini için kısa erişimli homojen etkileşimlerin olduğu Gō modeli yaklaşımı

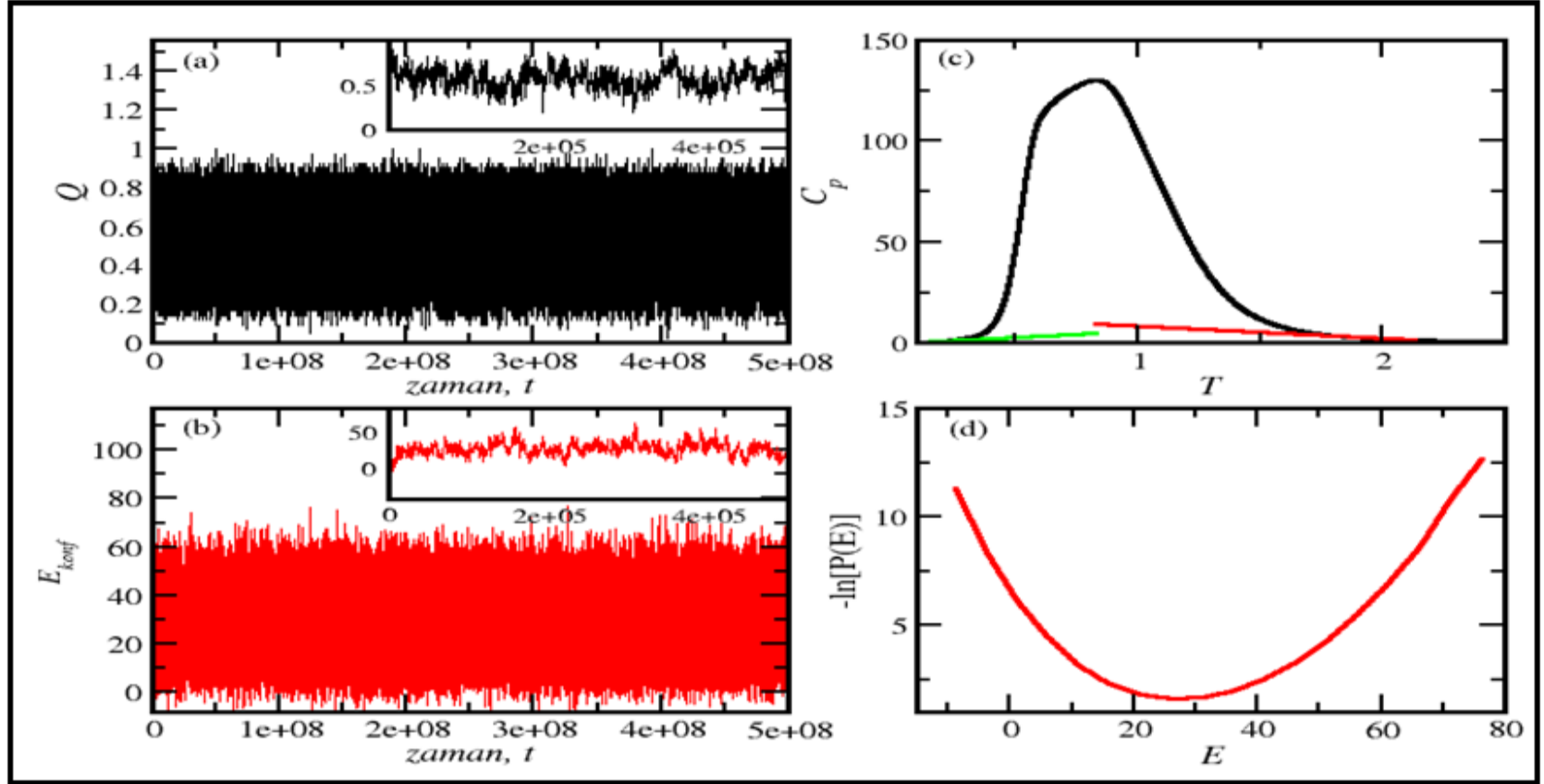


Şekil 4.3. 1BBL proteini için kısa erişimli homojen etkileşimlerin olduğu Gō modeli yaklaşımı

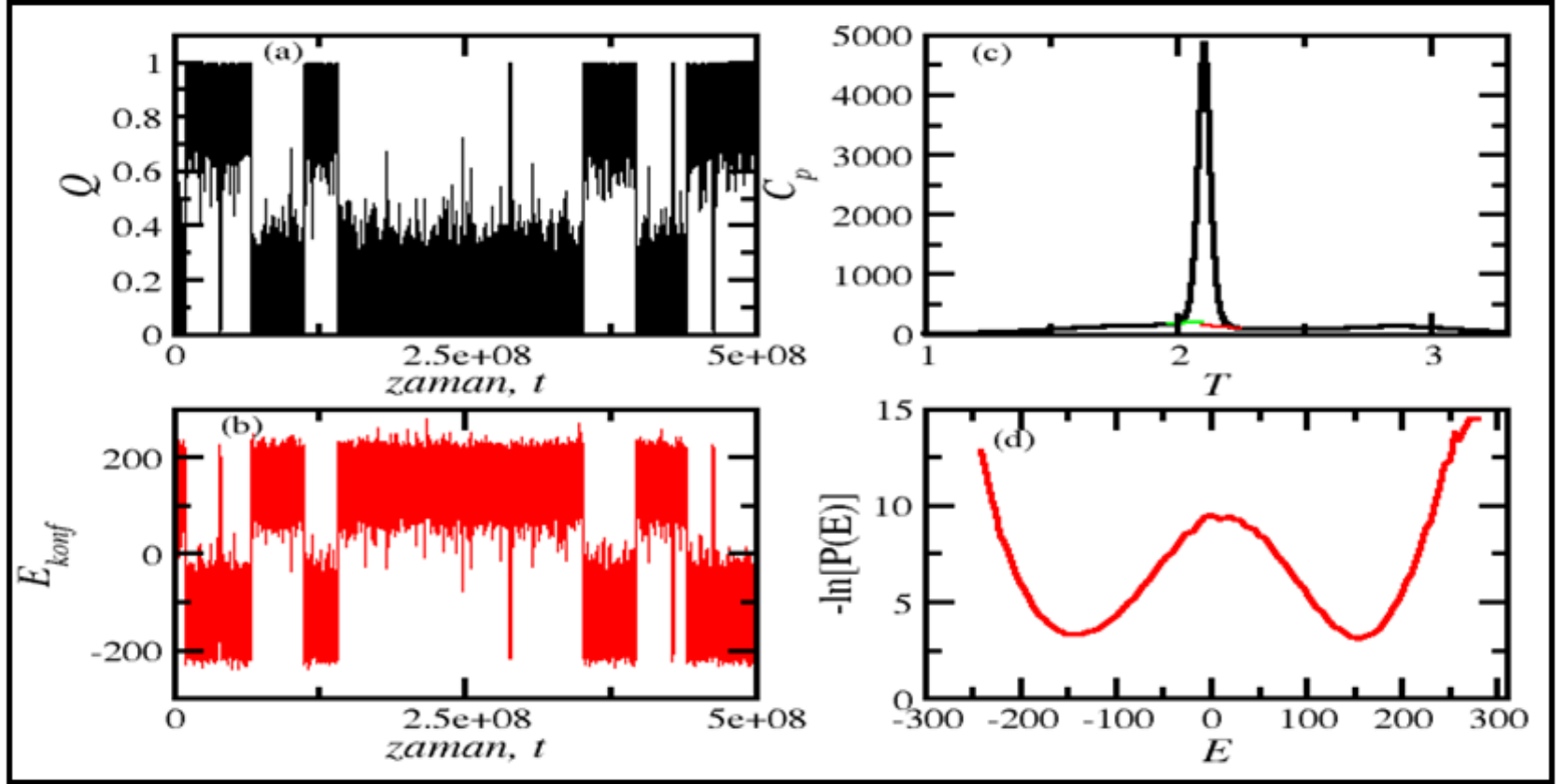


Şekil 4.4. 1RLQ proteini için homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli yaklaşımı

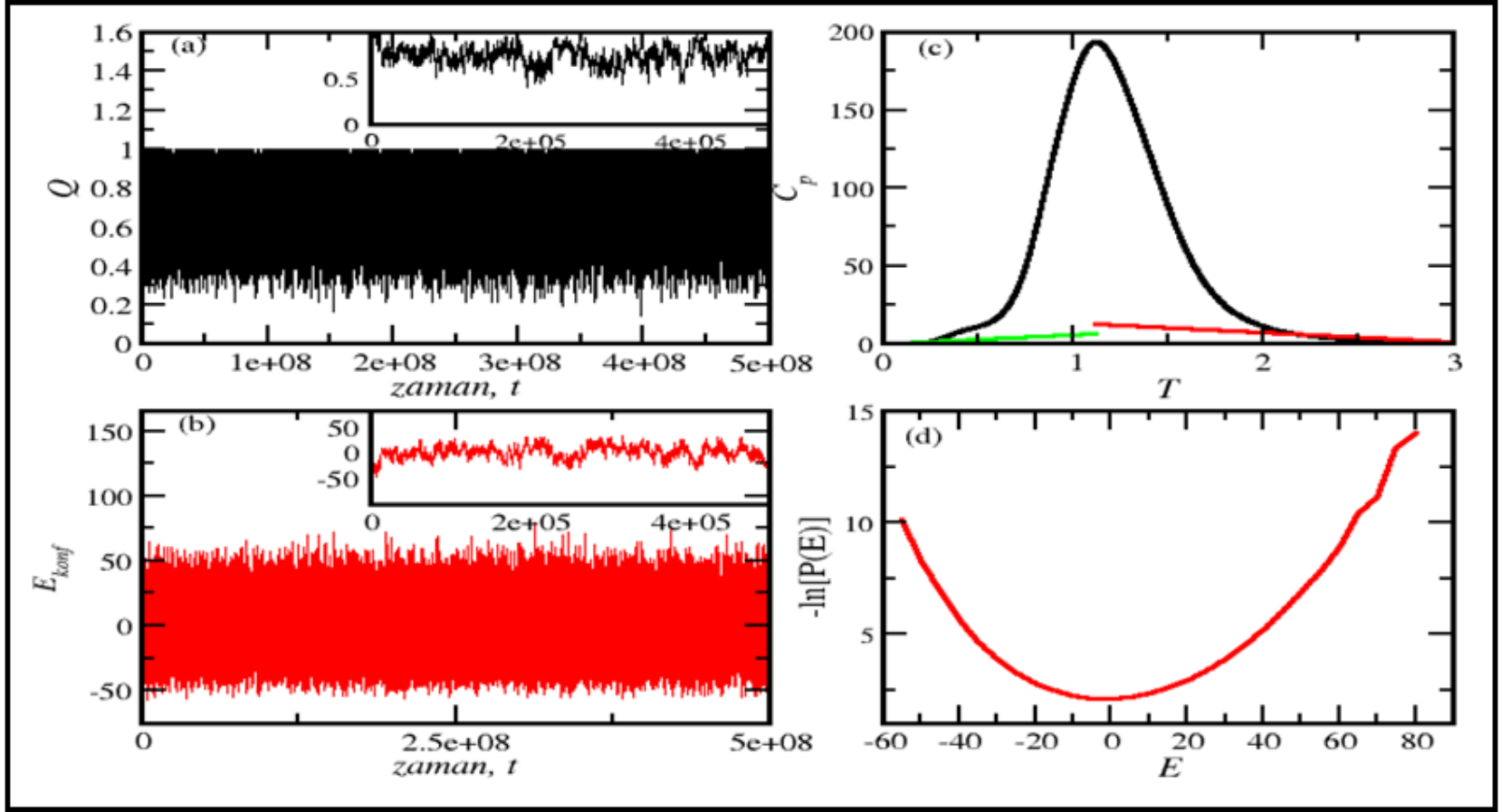




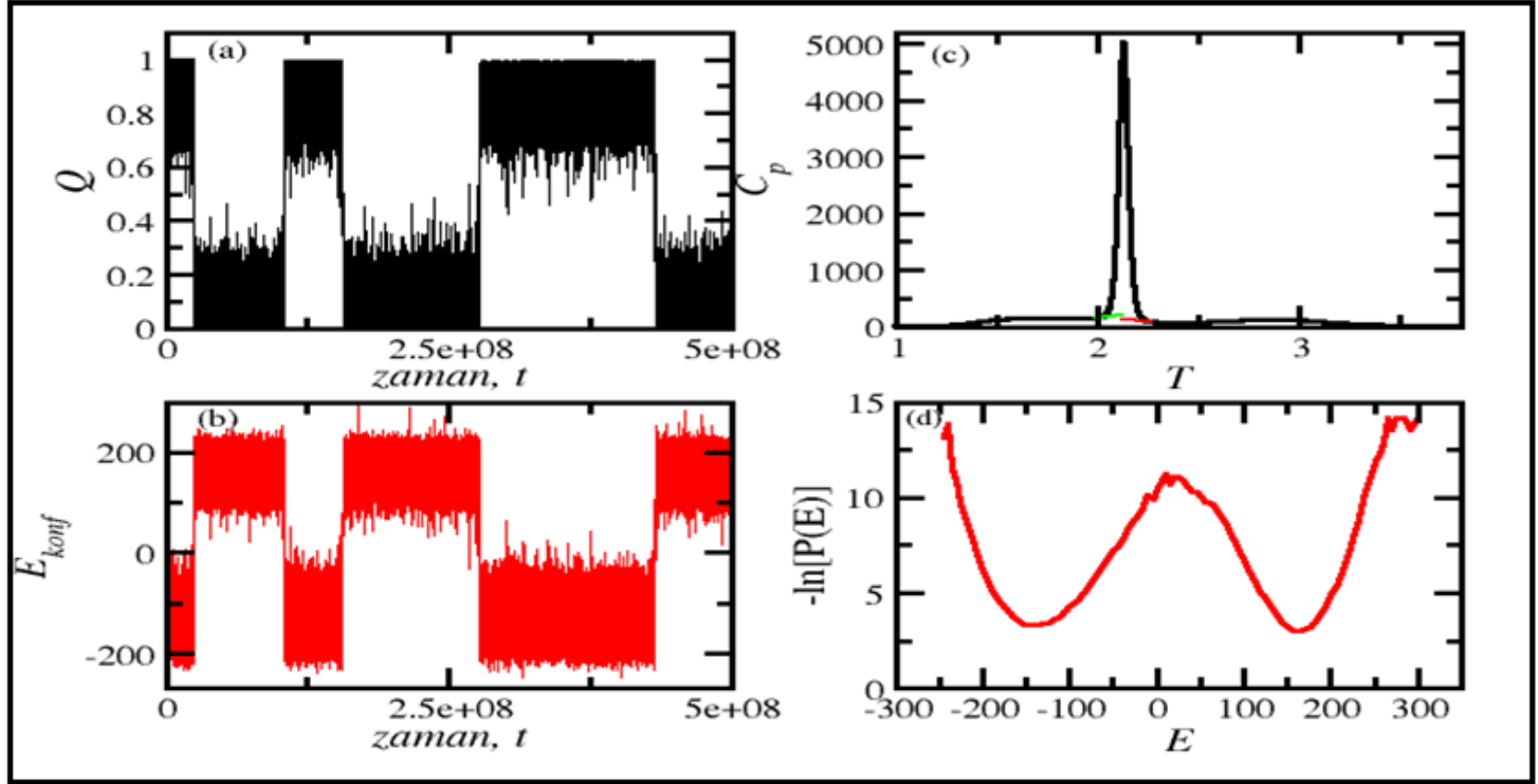
Şekil 4.5. 1BBL proteini için homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli yaklaşımı



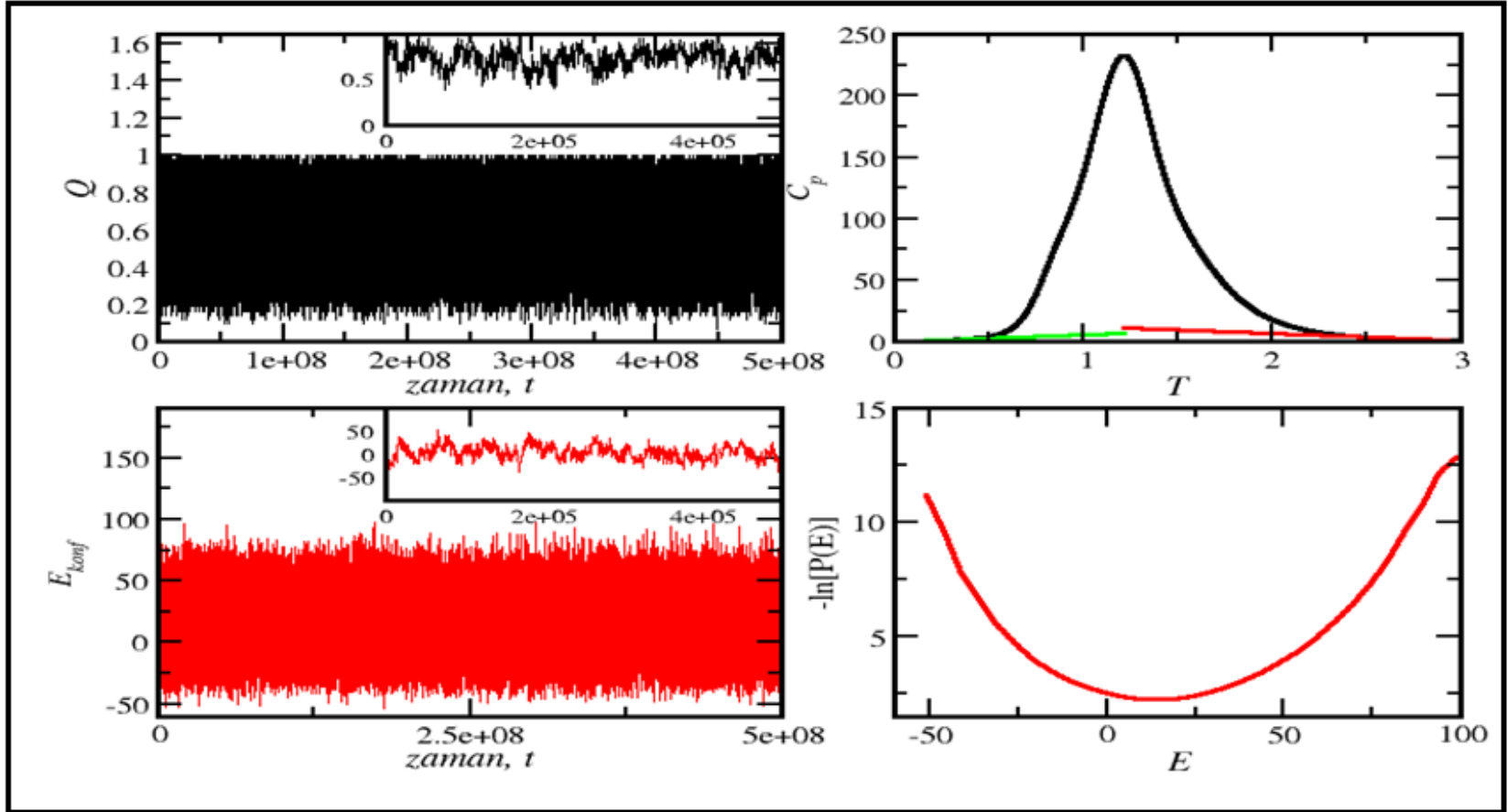
Şekil 4.6. 1RLQ proteini için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeli yaklaşımı



Şekil 4.7. 1BBL proteini için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeli yaklaşımı



Şekil 4.8. 1RLQ proteini için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli yaklaşımı



Şekil 4.9. 1BBL proteini için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli yaklaşımı

Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9, ile gösterilen grafiklerdeki model yaklaşımları için sırasıyla 1RLQ ve 1BBL proteini için elde edilen trajektörler, ısı kapasitesi eğrisi ve serbest enerji profilleri sunulmaktadır. Şekil 4.2, 4.4, 4.6, ve 4.8 ile gösterilen grafiklerde (a) ve (b) ile gösterilen farklı reaksiyon koordinatlarına göre elde edilen trajektörlerde katlanma ve açılma geçişleri net bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Ancak Şekil 4.3, 4.5, 4.7 ve 4.9 ile gösterilen grafiklerde ise; 1BBL proteini küçük ve çok hızlı bir şekilde açılma ve katlanma geçişleri göstermektedir. Trajektörlerde bu geçişlerin daha net gözlemlenebilmesi için zaman ölçeği küçültülerek (500 000) iç içe grafik olarak sunulmuştur. Bu şekilde çok hızlı katlanma ve açılma geçişlerinin olduğu 1BBL proteininin bariyersiz olarak adlandırılan termodinamik geçişlere sahip olduğu serbest enerji profillerinde görüldü. Aynı şekilde 1RLQ proteininin tüm model yaklaşımları için elde edilen serbest enerji profillerinde, katlı ve açık durumları birbirinden ayıran serbest enerji bariyeri göze çarpmaktadır. Bu bariyer 1RLQ proteininin iki durumlu geçişlere sahip olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.1’de bu iki protein için farklı model yaklaşımları için elde edilen veriler sunulmaktadır.

**Çizelge 4.1.** 1BBL ve 1RLQ proteini için hesaplanan termodinamiksel parametreler

PDB Kodu	Modeller	$N$	$N^{katlı\ kontak}$	$T_{sim}$	$T_{max}$	$E_{min}$	$E_{max}$	$\kappa$	$\kappa_s$
1BBL	Model (1)	37	42	0,59	0,587	-2	60	0,230	0,261
	Model (2)	37	42	0,83	0,83	-11	77	0,217	0,236
	Model (3)	37	42	1,12	1,12	-58	80	0,228	0,252
	Model (4)	37	42	1,22	1,216	-54	98	0,248	0,272
1RLQ	Model (1)	56	162	0,77	0,775	-55,85	119,6	0,547	1,00
	Model (2)	56	162	1,23	1,233	-92,79	167,03	0,478	0,989
	Model (3)	56	162	2,11	2,102	-243,05	279,52	0,574	1,00
	Model (4)	56	162	2,13	2,127	-247,44	301,77	0,554	1,37

Çizelge 4.1.'de model(1), model(2), model(3), model(4) ile gösterilen modeller sırasıyla; homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modeli, homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olmadığı durumda Gō modeli, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olduğu durumda Gō modelini temsil etmektedir. Bu çizelgede yer alan parametreleri tek tek ele alacak olursak;  $N$  amino asit sayısını,  $N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$  etkileşim sayısını (kontak sayısı),  $T_{\text{sim}}$  simülasyondan kullanılan sıcaklık değerini,  $T_{\text{max}}$  ısı kapasitesinin maksimum olduğu sıcaklık değerine karşılık gelirken farklı modellere göre enerjinin aldığı maksimum ve minimum enerji değerleri ise sırasıyla  $E_{\text{max}}$  ile  $E_{\text{min}}$  şeklinde ifade edilmektedir. Sınır çizgisi çıkarımı (Baseline) yapılmadan önceki  $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$  oranı değeri  $\kappa$ , sınır çizgisi çıkarımı (Baseline) yapıldıktan sonraki  $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$  oranı değeri  $\kappa_s$ , ile gösterilmektedir.

Çizelge 4.1'de 1RLQ proteininin  $\kappa_s$  değerine bakıldığı zaman iki durum davranışı sergilediği, 1BBL proteinin ise bu davranıştan çok uzak olduğu anlaşılmaktadır. Yine bu değerleri göz önüne alarak 1RLQ proteininin kooperatif bir davranış içinde bulunduğu kalorimetrik iki durum kriteri ( $\kappa_s = \Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}} \cong 1$ ) ile uyumlu olduğu görülmektedir. Isı kapasitesi eğrisi bu değerde olduğu zaman daha dik ve keskin bir hal almaktadır. 1BBL proteininin ise bu kriterden uzak olduğu ( $\kappa_s \ll 1$ ) anlaşılmaktadır. Isı kapasitesi kalorimetrik kriter değerinden uzaklaştığında daha yaygın bir hal almaktadır. Bu durum 1BBL proteininin tüm model yaklaşımlar için serbest enerji profillerinde gözlemlenen tek durumlu (bariyersiz) termodinamik geçişlerin doğası ile oldukça uyumludur. 1BBL proteini için bulunan sonuçlarla yapılan deneysel çalışmalarla gösterilen uyum sonuçlar ve öneriler bölümünde detaylandırılmıştır. Ayrıca yeni bir yaklaşım altında incelediğimiz amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerinin dahil edildiği heterojen etkileşimli model çalışmalarında da tek durumlu (bariyersiz) geçişleri yakalayabilmiş olmamız oldukça dikkat çekicidir. Aynı model yaklaşımı ile 1RLQ proteini için termodinamik olarak iki durum davranışı gözlemlenmiştir. Çizelge 4.1'e baktığımız zaman tek durumlu ve iki durumlu davranışlara neden teşkil edebilecek özellikler arasında 1BBL proteininin oldukça kısa bir zincir yapısına sahip olması ve tamamen alfa sarmallarının oluşturduğu bir topolojisinin olması birer etken olarak

sayılmaktadır. Aynı zamanda iki protein için elde edilen simülasyon sıcaklıklarının farklılığı da göze çarpmaktadır. Alfa sarmal yapılarda yerel etkileşimlerin sayısının fazla olması, proteinlerin daha kısa zamanda ve daha kolay bir şekilde katlanmasına izin vermekte olduğunu düşünmekteyiz. Ancak biliyoruz ki tek durumlu davranış gösteren proteinler her zaman alfa sarmallarından oluşmak zorunda değildir. Çalışmanın sonraki bölümlerinde bu davranışlar farklı protein ailerine ait proteinler için termodinamik olarak incelenmiştir.

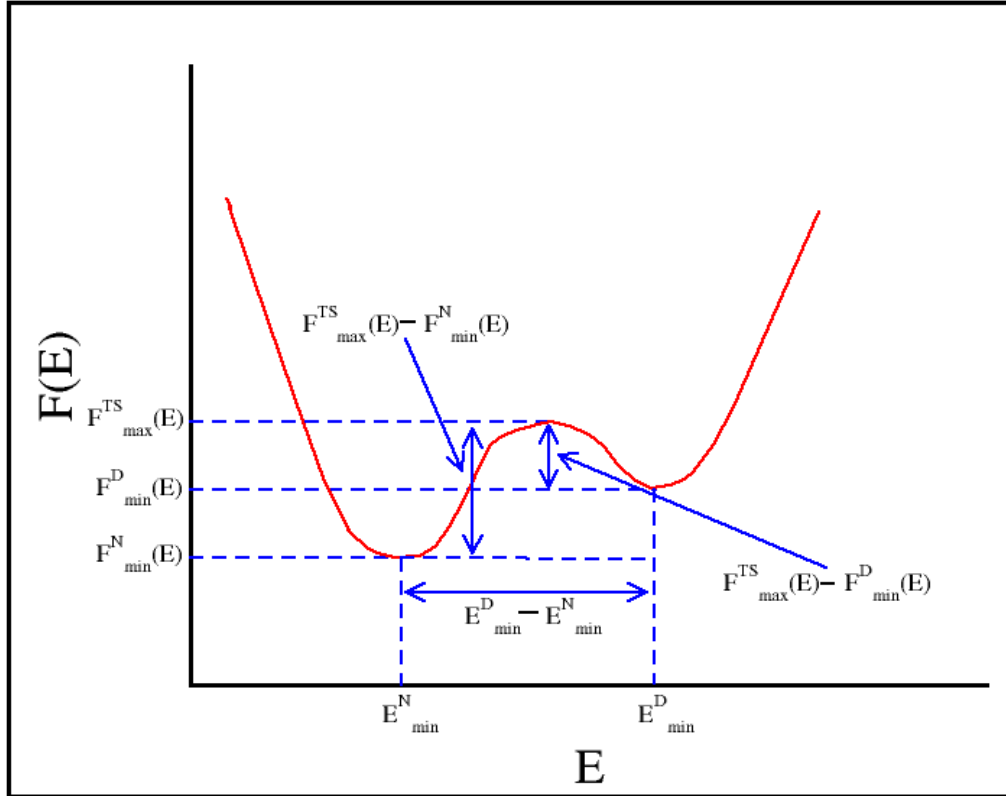
#### 4.2. Katlanmış Yapı Topolojisinin Rolü

Proteinlerin termodinamiksel davranışlarının katlanmış yapı topolojisini nasıl etkilediklerini anlayabilmek için farklı katlanmış yapı ailerine ait küçük tek bölgeli proteinleri inceledik. Bir önceki kesimde ele alınan aynı yaklaşım çerçevesinde analizlerimizi sürdürdük. Farklı modelleme yaklaşımları için termodinamik boyutta yapılan incelemelerden elde ettiğimiz bulguları Çizelge 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, ile gösterdik. Bu çizelgelerde bulunan parametreler sırasıyla; protein isimleri PDB (Protein Veri Bankası) kodu ile verilirken,  $N$ , amino asit sayısı yani zincir uzunluğu,  $N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$ , proteinin katlı yapısındaki kontak sayısı yani etkileşim sayısı,  $N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}/N$ , amino asit sayısı başına düşen etkileşim sayısı,  $N_{\text{yo}}/N$  amino asit sayısı başına düşen yerel olmayan etkileşimlerin sayısı,  $T_f$ , simülasyondan elde edilen geçiş sıcaklığı,  $E_{\text{min}}^D - E_{\text{min}}^N$ , açık durum topluluğu ile katlı durum topluluk minimumları arasındaki fark,  $E_{\text{katlı}}$ , proteinin katlanmış durumdaki enerjisi,  $E_{\text{katlı}}/N$  amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisi,  $E_{\text{katlı}}/N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$  etkileşim sayısı başına düşen katlı durum enerjisini göstermektedir.

Bu parametrelerden bazılarını serbest enerji profili üzerinde gösterirsek; Şekil 4.10'da termodinamik olarak iki durum geçişine sahip olan herhangi bir protein için serbest enerji profili gösterilmektedir. Kuramsal temeller bölümünde bahsedildiği gibi proteinlerde katlı ve açık konformasyonların herbiri iki ayrı topluluk olarak ele alınmaktadır. Katlanmış (N) ve açık (D) durum konformasyonları arasında geçişler



meydana gelirken; iki durumlu proteinlerde çok az da olsa geçiş durum (Transition State; TS) konformasyonlarından dolayı bir bariyer oluşur ve geçişlerin gerçekleşmesi için bu bariyerin aşılması gerekmektedir. Bu açıklamalara göre;



**Şekil 4.10.** Herhangi bir protein için serbest enerji profili

Reaksiyon koordinatı olarak seçilen  $E$ 'ye göre serbest enerji (4.1) ifadesi ile hesaplanmaktadır.

$$F(E) = -\ln P(E) \quad (4.1)$$

Burada  $P(E)$  ile  $E$  enerjisine sahip konformasyonların bulunma olasılığı gösterilmektedir.

Açık ve katlı durum toplulukları arasındaki fark  $E_{\min}^D - E_{\min}^N$  olarak tanımlanır. Bir proteinin katlanmış yapıdan açık yapıya geçiş yapabilmek için aşması gereken bariyer yüksekliği (4.2) ifadesi ile gösterilmektedir.

$$F_{\max}^{TS}(E) - F_{\min}^N(E) \quad (4.2)$$

Aynı proteinin açık yapıdan katlanmış yapıya geçiş yapabilmek için aşması gereken bariyer yüksekliği (4.3) ifadesi ile gösterilmektedir.

$$F_{\max}^{TS}(E) - F_{\min}^D(E) \quad (4.3)$$

Şekil 4.10 ile gösterilen serbest enerji profilindeki tanımlamalar kullanılarak çizelge 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’de yer verilen  $\Delta G^\ddagger$  bariyer yüksekliği (4.2) ve (4.3) ifadelerinden elde edilmektedir. Bariyer yüksekliğinin hesaplanması kooperatiflik ve termodinamiksel geçişlerin anlaşılmasında önemli bir yer tutar. Farklı protein aileleri 4 farklı etkileşim karakteristiğine sahip sahip modeller için elde edilen parametreler birbirlerinden oldukça farklı bilgiler içermektedirler.

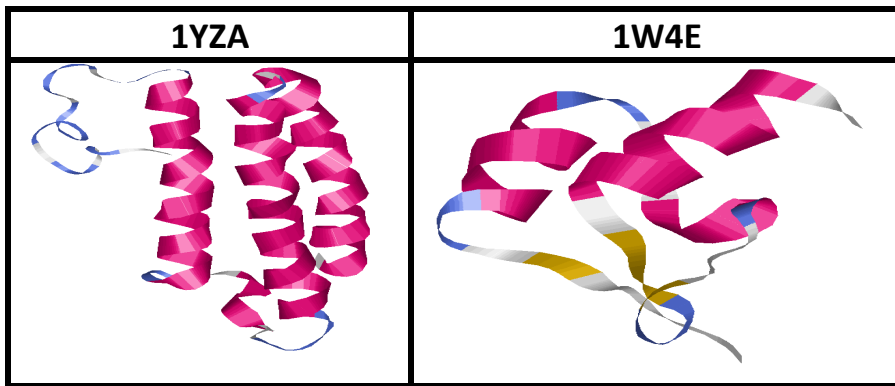
Tüm bu açıklamalara göre yine 4 farklı model yaklaşımı ve 3 farklı protein ailesi göz önüne alınarak elde edilen araştırma bulguları şu şekilde sıralanmaktadır.

#### 4.2.1. Homojen etkileşimli kısa erişimli Gö modeli

Çizelge 4.2. Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli kısa erişimli Gö modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi

HOMOJEN ETKİLEŞİMLİ KISA ERİŞİMLİ GÖ MODELİ										
TAMAMEN ALFA SARMAL YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
PDB KODU	$N$	$N_{kath}^{kontak}$	$\frac{N_{kath}^{kontak}}{N}$	$\frac{N_{yo}}{N}$	$T_f$	$\Delta G^\ddagger$	$E_{min}^D - E_{min}^N$	$E_{katlı}$	$\frac{E_{katlı}}{N}$	$\frac{E_{katlı}}{N_{kath}^{kontak}}$
2abd	86	163	1.89	1.12	0.604	0.23	35.00	-96.46	-1.12	-0.59
2bth	45	71	1.57	0.87	0.599	0.00	0.00	-42.01	-0.93	-0.59
1yza	106	144	1.35	0.41	0.477	0.00	0.00	-85.21	-0.80	-0.59
1w4e	45	118	2.62	1.47	0.792	1.99	54.00	-69.83	-1.55	-0.59
1ryk	69	127	1.84	1.01	0.622	0.22	32.00	-75.15	-1.09	-0.59
1enh	54	99	1.83	1.02	0.649	0.67	38.00	-58.58	-1.08	-0.59
1ayi	86	159	1.84	1.13	0.603	1.61	62.00	-94.09	-1.09	-0.59
1imq	86	245	2.84	1.72	0.793	1.93	108.00	-144.98	-1.68	-0.59
1lmb	80	156	1.95	1.08	0.605	1.20	50.00	-92.31	-1.15	-0.59
1idy	54	104	1.92	0.81	0.680	0.34	27.96	-61.54	-1.32	-0.59
1fex	59	137	2.32	1.10	0.712	0.77	46.04	-81.07	-1.37	-0.59
1ba5	53	120	2.26	1.09	0.736	0.35	40.00	-71.01	-1.34	-0.59
1w4j	51	119	2.33	1.22	0.771	0.05	46.00	-70.42	-1.38	-0.59
1ss1	60	91	1.51	0.75	0.569	0.06	18.00	-53.85	-0.89	-0.59
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1jo8	58	149	2.56	2.29	0.708	3.78	90.00	-88.17	-1.52	-0.59
1mjc	69	166	2.40	2.09	0.602	4.64	90.00	-98.23	-1.42	-0.59
1c9o	66	157	2.37	2.06	0.678	4.16	85.00	-92.90	-1.41	-0.59
1csp	67	160	2.37	2.09	0.678	4.74	90.00	-94.68	-1.41	-0.59
1g6p	66	159	2.40	2.05	0.664	2.25	90.00	-94.09	-1.43	-0.59
1e0l	37	71	1.91	1.46	0.736	0.25	25.00	-42.01	-1.13	-0.59
1shf	59	137	2.32	2.12	0.682	4.01	84.80	-81.07	-1.37	-0.59
1shg	57	142	2.49	2.23	0.703	5.44	85.00	-84.03	-1.47	-0.59
1rlq	56	162	2.89	2.59	0.775	4.76	100.00	-95.86	-1.71	-0.59
3ait	74	235	3.17	2.76	0.801	7.84	140.00	-139.06	-1.88	-0.59
1wit	93	252	2.70	2.43	0.621	3.09	135.00	-149.12	-1.60	-0.59
1e0m	37	76	2.05	1.46	0.727	0.35	30.00	-44.97	-1.22	-0.59
1k9q	40	85	2.12	1.68	0.732	0.53	35.00	-50.30	-1.26	-0.59
1pnj	86	226	2.62	2.33	0.958	1.93	80.00	-133.14	-1.58	-0.59
1ten	89	226	2.54	2.36	0.690	7.29	135.00	-133.74	-1.50	-0.59
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1o6x	81	148	1.82	1.37	0.636	5.83	105.00	-87.58	-1.08	-0.59
2ci2	64	142	2.12	1.80	0.656	2.79	75.00	-84.03	-1.31	-0.59
1pgb	56	121	2.16	1.68	0.663	2.08	55.11	-71.60	-1.28	-0.59
2ptl	62	134	2.16	1.76	0.644	2.97	65.00	-79.29	-1.28	-0.59
1iris	97	225	2.32	1.93	0.678	5.33	125.00	-133.14	-1.37	-0.59
1spr	103	279	2.71	2.13	0.729	2.00	140.00	-165.10	-1.60	-0.59
1bf4	63	145	2.30	1.75	0.690	0.38	50.00	-85.80	-1.36	-0.59
1ubq	76	178	2.34	1.83	0.679	4.95	95.00	-105.33	-1.38	-0.59
2acy	98	254	2.94	2.15	0.704	8.40	145	-150.30	-1.53	-0.59
1k0s	151	323	2.14	1.79	0.656	4.54	165	-191.14	-1.26	-0.59
1div	92	213	2.31	1.74	0.675	5.83	105.00	-126.04	-1.37	-0.59
1rfa	78	237	3.04	2.42	0.786	6.42	130.00	-140.24	-1.79	-0.59
1urn	96	219	2.28	1.77	0.674	6.66	115.00	-129.59	-1.35	-0.59
1poh	85	201	2.36	1.85	0.660	4.18	150.00	-118.94	-1.40	-0.59

Etkileşimlerin homojen olduğu kısa erişimli model yaklaşımında tamamen alfa sarmallarından oluşan protein aileleri için genelde düşük bariyer yüksekliği gözlemlendi. Ayrıca farklı zincir uzunluğuna sahip proteinler için bariyersiz (Downhill) davranış elde edildi. Burada en dikkat çekici özellik uzun bir zincire sahip olan 1yza proteini için bariyersiz davranış gözlemlenmesidir. Ayrıca 1yza proteini en düşük geçiş sıcaklığına ve amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisi en yüksek olan tamamen alfa yapıları proteindir. Şekil 4.11’de 1yza proteininin yapısına baktığımızda sarmalları birbirine bağlayan dönüş (turn) kısmı oldukça kısa olup mavi renk ile gösterilen uç kısmı ise katlanma ile çok fazla ilgisi olmayan rastgele zincir yapısından oluşmaktadır. Bariyersiz geçişlerin tanımlanmasında amino asit sayısının yanı sıra daha başka enerjetik faktörlerin ve topolojik detayların göz önüne alınması gerektiği anlaşılmaktadır. Ayrıca 1w4e proteininin ise iki durumlu davranış göstermesi oldukça dikkat çekicidir. Bu farklılıklar proteinlerin dönüş (turn) bölgelerinin uzun veya kısa olması veya yine bu bölgelerde beta yapılarının bulunuyor olması farklılıkları getirmektedir. Şekil 4.11’e baktığımız zaman 1w4e proteininin dönüş bölgelerinde sarı renklerle gösterilen beta plakalarının bulunduğu görülmektedir. Bu durum bariyer yüksekliğinin artmasına, dolayısıyla iki durum davranışına sebep olabilmektedir.



**Şekil 4.11.** 1YZA ve 1W4E proteinlerinin topolojik gösterimleri

Bariyer yüksekliklerine göre bu model için proteinleri sınıflandırabiliriz. Bu sınıflandırma, Liu and Gruebele (2008) tarafından tek ve iki durumlu termodinamik geçişleri tanımlamak için kullanılmıştır (Liu and Gruebele 2008). Bariyer

yüksekliklerine göre yapılan sınıflandırmada tamamen alfa sarmalları ile oluşan yapıların dışındaki proteinlerde de bariyersiz geçişler gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3’de bu sınıflandırmaya yer verilmiştir. Burada 1w4e, 2bth proteinleri çoğunlukla alfa proteinleri olarak sınıflandırılabilir. Çünkü bu proteinlerin dönüş bölgelerinde beta yapıları mevcuttur. Alfa yapısına sahip proteinler arasında 1w4e proteini amino asit sayısı başına düşen kontak sayısı ve amino asit sayısı başına düşen yerel olmayan kontak sayısı bakımından en yüksek değere sahiptir. 1lmb, 1imq ve 1ayi proteinleri ise sınıfındaki diğer proteinlere nazaran daha uzun dönüş bölgesine sahiptirler. Bu durum proteinlerin bariyer yüksekliklerine etki eden unsurlar arasında yerini alır. Tamamen beta yapısına sahip olan 1e0l, 1e0m ve 1k9q proteinleri yaklaşık olarak 40 amino asit sayısına ve diğer proteinlere göre daha az etkileşim sayısına sahiptirler. Ayrıca katlı durumda sahip oldukları enerji değerleri diğerlerine göre oldukça yüksektir. Aynı şekilde alfa+beta yapısında amino asit sayısı 63 olan 1bf4 proteini de bariyersiz bir geçiş göstermektedir.

**Çizelge 4.3.** Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli kısa erişimli G $\bar{o}$  modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması

	BARİYER YÜKSEKLİĞİ ( $\Delta G^\ddagger$ )		
	HOMOJEN ETKİLEŞİMLİ KISA ERİŞİMLİ G $\bar{o}$ MODELİ		
FARKLI BARİYER YÜKSEKLİKLERİ	$\Delta G^\ddagger \leq 1kT$ Bariyersiz (Downhill)	$1kT < \Delta G^\ddagger < 3kT$ Bariyersiz başlangıcı (incipient downhill)	$\Delta G^\ddagger > 3kT$ Bariyerli
TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	2abd, 2bth, 1yza, 1ryk, 1enh, 1idy, 1fex, 1ba5, 1w4j, 1ss1	1w4e, 1ayi, 1imq, 1lmb	Kritere uygun protein bu model için bulunmamaktadır.
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	1e0l, 1e0m, 1k9q	1g6p, 1pnj	1jo8, 1mjc, 1c9o, 1csp, 1shf, 1shg, 1rlq, 3ait, 1wit, 1ten
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	1bf4	2ci2, 1pgb, 1spr,	1o6x, 1ris, 1ubq, 2acy, 1kos, 1div, 1rfa, 1urn, 1poh

#### 4.2.2. Homojen etkileşimli uzun erişimli G $\alpha$ modeli

Çizelge 4.4 Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli uzun erişimli Go modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi

HOMOJEN ETKİLEŞİMLİ UZUN ERİŞİMLİ G $\alpha$ MODELİ										
TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
PDB KODU	$N$	$N_{\text{kata}}^{\text{kata}}$	$\frac{N_{\text{kata}}^{\text{kata}}}{N}$	$\frac{N_{\text{yo}}}{N}$	$T_f$	$\Delta G^\ddagger$	$E_{\text{min}}^D - E_{\text{min}}^N$	$E_{\text{kata}}$	$\frac{E_{\text{kata}}}{N}$	$\frac{E_{\text{kata}}}{N_{\text{kata}}^{\text{kata}}}$
2abd	86	163	1.89	1.12	0.938	0.09	55.00	-163.00	-1.89	-1
2bth	45	71	1.57	0.87	0.903	0.00	0.00	-71.00	-1.58	-1
1yza	106	144	1.35	0.41	0.726	0.00	0.00	-144.00	-1.36	-1
1w4e	45	118	2.62	1.47	1.219	1.09	74.00	-118.00	-2.62	-1
1ryk	69	127	1.84	1.01	0.945	0.10	48.00	-127.00	-1.84	-1
1enh	54	99	1.83	1.02	0.981	0.19	48.00	-99.00	-1.83	-1
1ayi	86	159	1.84	1.13	0.922	1.28	92.00	-159.00	-1.85	-1
1imq	86	245	2.84	1.72	1.229	1.62	154.00	-245.00	-2.85	-1
1hmb	80	156	1.95	1.08	0.928	0.96	82.00	-156.00	-1.95	-1
1idy	54	104	1.92	0.81	1.022	0.08	32.00	-104.00	-1.92	-1
1fex	59	137	2.32	1.10	1.084	0.35	60.00	-137.00	-2.32	-1
1ba5	53	120	2.26	1.09	1.113	0.05	48.00	-120.00	-2.26	-1
1w4j	51	119	2.33	1.22	1.92	0.57	60.00	-119.00	-2.33	-1
1ss1	60	91	1.51	0.75	0.868	0.07	30.00	-91.00	-1.52	-1
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1jo8	58	149	2.56	2.29	1.116	2.29	115.00	-149.00	-2.57	-1
1mjc	69	166	2.40	2.09	1.063	2.61	115.00	-166.00	-2.41	-1
1c9o	66	157	2.37	2.06	1.056	2.12	115.00	-157.00	-2.38	-1
1csp	67	160	2.37	2.09	1.066	2.40	115.00	-160.00	-2.38	-1
1g6p	66	159	2.40	2.05	1.042	2.08	120.00	-159.00	-2.41	-1
1e0l	37	71	1.91	1.46	1.129	0.00	0.00	-71.00	-1.92	-1
1fnf <sub>3</sub>	90	268	2.97	2.76	1.237	4.41	207.00	-268.00	-2.97	-1
1fnf <sub>4</sub>	94	263	2.79	2.63	1.207	3.94	201.00	-263.00	-2.79	-1
1shf	59	137	2.32	2.12	1.082	2.20	110.00	-137.00	-2.32	-1
1shg	57	142	2.49	2.23	1.115	3.03	110.00	-142.00	-2.49	-1
1rlq	56	162	2.89	2.59	1.233	2.81	130.00	-162.00	-2.89	-1
3ait	74	235	3.17	2.76	1.288	4.97	190.00	-235.00	-3.17	-1
1wit	93	252	2.70	2.43	1.038	3.06	195.00	-252.00	-2.71	-1
1e0m	37	76	2.05	1.46	1.109	0.00	0.00	-76.00	-2.05	-1
1k9q	40	85	2.12	1.68	1.138	0.00	0.00	-85.00	-2.13	-1
1pnj	86	226	2.62	2.33	1.506	0.00	0.00	-225.00	-2.68	-1
1ten	89	226	2.54	2.36	1.089	2.99	160.00	-226.00	-2.54	-1
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1o6x	81	148	1.82	1.37	0.996	3.29	145.00	-148.00	-1.83	-1
2ci2	64	142	2.12	1.80	1.028	1.76	105.00	-142.00	-2.22	-1
1pgb	56	121	2.16	1.68	1.016	0.70	70.00	-121.00	-2.16	-1
2ptl	62	134	2.16	1.76	1.004	1.18	85.00	-134.00	-2.16	-1
1iris	97	225	2.32	1.93	1.073	1.28	154.51	-225.00	-2.32	-1
1spr	103	279	2.71	2.13	1.137	1.17	175.00	-279.00	-2.70	-1
1bf4	63	145	2.30	1.75	1.049	0.61	40.00	-145.00	-2.30	-1
1ubq	76	178	2.34	1.83	1.062	2.89	135.00	-178.00	-2.34	-1
2acy	98	254	2.94	2.15	1.125	3.83	200.00	-254.00	-2.59	-1
1e65	128	337	2.63	2.31	1.131	6.80	280.00	-337.00	-2.63	-1
1k0s	151	323	2.14	1.79	1.025	2.97	215.00	-323.00	-2.14	-1
1fkb	107	285	2.66	2.24	1.118	3.98	210.00	-285.00	-2.66	-1
1n88	96	286	2.98	2.31	1.289	4.28	195.00	-286.00	-2.98	-1
1div	92	213	2.31	1.74	1.053	3.29	145.00	-213.00	-2.31	-1
1rfa	78	237	3.04	2.42	1.249	4.20	170.00	-237.00	-3.03	-1
1urn	96	219	2.28	1.77	1.065	4.06	160.00	-219.00	-2.28	-1
2qjl	99	239	2.41	1.81	1.054	3.99	175.00	-239.00	-2.41	-1
1poh	85	201	2.36	1.85	1.045	2.46	150.00	-201.00	-2.36	-1

Amino asitler arasındaki etkileşimlerin bir örnek olarak alındığı Şekil 3.1’de gösterildiği gibi Lenard-Jones potansiyelinin uzun erişimli olduğu durumda tamamen alfa sarmallarından oluşan en uzun zincir uzunluğuna sahip olan 1yza proteininin termodinamik olarak bariyersiz geçiş durumunu koruduğu anlaşılmaktadır. Yine bir önceki modelde gösterildiği gibi 1w4e proteininin iki durumlu davranış göstermekte olduğu ancak bariyer yüksekliğinde azalma olduğu görülmektedir. Bu durum amino asitler arasındaki uzun erişimli etkileşmelerin dikkate alınmasının bir etkisidir. Çünkü tamamen beta yapısına sahip olan ve bir önceki model yaklaşımında bariyersiz geçişler gösteren 1e0l, 1e0m ve 1k9q proteinlerinin bu model itibarıyla tamamen bariyersiz geçişlere sahip olduğu anlaşılmıştır. 1pgb proteini de  $0.7kT$  bariyer yüksekliği ile farklılık göstermiş olup yapısal olarak bir alfa sarmal ve dönüş bölgelerinde beta yapılarından oluşan çoğunlukla beta yapılı bir proteindir. Çizelge 4.5’de bir önceki model yaklaşımında da uygulandığı gibi bariyer yüksekliklerine göre sınıflandırılmaya gidilmiştir. Burada tamamen beta ve alfa+beta protein aileleri için bariyer yüksekliğinde azalmalar göze çarpmaktadır. Homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeli katlı ve açık durum arasındaki serbest enerji bariyer yüksekliğini azaltan yönde bir etki göstermiştir.

**Çizelge 4.5.** Tüm protein aileleri için homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması

	BARIYER YÜKSEKLİĞİ ( $\Delta G^\ddagger$ )		
	HOMOJEN ETKİLEŞİMLİ UZUN ERİŞİMLİ Gō MODELİ		
FARKLI BARIYER YÜKSEKLİKLERİ	$\Delta G^\ddagger \leq 1kT$ Bariyersiz (Downhill)	$1kT < \Delta G^\ddagger < 3kT$ Bariyersiz başlangıcı (incipient downhill)	$\Delta G^\ddagger > 3kT$ Bariyerli
TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	2abd, 2bth, 1yza, 1ryk, 1enh, 1lmb, 1idy, 1fex, 1ba5, 1w4j, 1ss1	1w4e, 1ayi, 1imq,	Kritere uygun protein bu model için bulunmamaktadır.
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	1e0l, 1e0m, 1k9q, 1pnj	1g6p, 1jo8, 1mjc, 1rlq, 1c9o, 1csp, 1shf, 1ten	1f09, 1f10, 1shg, 3ait, 1wit,
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	1bf4, 1pgb	2ci2, 2ptl, 1ris, 1spr, 1ubq, 1kos, 1poh	1o6x, 2acy, 1e65, 1fkb, 1n88, 1div, 1rfa, 1urn, 2qjl

#### 4.2.3. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı G $\bar{O}$ modeli

Çizelge 4.6. Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Go modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi

HETEROJEN ETKİLEŞİMLİ KISA ERİŞİMLİ İTİCİ ETKİLEŞİMLERİN OLMADIĞI G $\bar{O}$ MODELİ										
TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
PDB KODU	N	$N_{\text{katlı}}^{\text{kontak}}$	$\frac{N_{\text{katlı}}^{\text{kontak}}}{N}$	$\frac{N_{\text{yo}}}{N}$	$T_f$	$\Delta G^\ddagger$	$E_{\text{min}}^D - E_{\text{min}}^N$	$E_{\text{katlı}}$	$\frac{E_{\text{katlı}}}{N}$	$\frac{E_{\text{katlı}}}{N_{\text{katlı}}^{\text{kontak}}}$
2abd	86	163	1.89	1.12	1.375	2.57	220.00	-310.80	-3.61	-1.91
2bth	45	71	1.57	0.87	1.484	0.29	76.00	-157.72	-3.50	-2.22
1yza	106	144	1.35	0.41	1.110	0.02	6.00	-252.65	-2.38	-1.75
1w4e	45	118	2.62	1.47	1.99	3.78	192.00	-251.73	-5.59	-2.13
1ryk	69	127	1.84	1.01	1.416	0.84	112.00	-241.57	-3.50	-1.90
1enh	54	99	1.83	1.02	1.574	0.12	64.00	-217.89	-4.04	-2.20
1ayi	86	159	1.84	1.13	1.564	0.81	178.00	-362.48	-4.21	-2.28
1imq	86	245	2.84	1.72	2.094	0.47	174.00	-540.05	-6.28	-2.20
1lmb	80	156	1.95	1.08	1.582	0.98	178.00	-365.99	-4.57	-2.35
1idy	54	104	1.92	0.81	1.698	0.13	82.00	-219.40	-4.06	-2.11
1fex	59	137	2.32	1.10	1.711	0.98	152.00	-280.50	-4.75	-2.05
1ba5	53	120	2.26	1.09	1.794	1.87	156.00	-248.82	-4.69	-2.07
1w4j	51	119	2.33	1.22	1.851	2.25	160.00	-238.09	-4.67	-2.00
1ss1	60	91	1.51	0.75	1.322	0.00	6.00	-192.87	-3.21	-2.12
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1jo8	58	149	2.56	2.29	1.827	1.78	240.00	-333.30	-5.75	-2.24
1mjc	69	166	2.40	2.09	1.703	3.25	240.00	-355.86	-5.16	-2.14
1e9o	66	157	2.37	2.06	1.716	4.72	245.00	-345.93	-5.24	-2.20
1csp	67	160	2.37	2.09	1.747	3.24	240.00	-356.11	-5.32	-2.23
1g6p	66	159	2.40	2.05	1.626	4.08	250.00	-330.55	-5.01	-2.08
1e0l	37	71	1.91	1.46	1.514	0.58	75.00	-122.13	-3.30	-1.72
1fnf <sub>3</sub>	90	268	2.97	2.76	1.943	6.24	420.00	-555.78	-6.18	-2.07
1fnf <sub>4</sub>	94	263	2.79	2.63	1.883	5.02	375.00	-541.32	-5.76	-2.06
1shf	59	137	2.32	2.12	1.796	3.33	245.00	-309.54	-5.25	-2.26
1shg	57	142	2.49	2.23	1.881	3.84	265.00	-325.25	-5.71	-2.29
1rlq	56	162	2.89	2.59	2.102	6.34	295.00	-368.02	-6.57	-2.27
3ait	74	235	3.17	2.76	1.829	7.08	350.00	-437.62	-5.91	-1.86
1wit	93	252	2.70	2.43	1.629	3.75	350.00	-516.98	-5.56	-2.05
1e0m	37	76	2.05	1.46	1.436	0.60	75.00	-123.10	-3.33	-1.62
1k9q	40	85	2.12	1.68	1.716	0.38	80.00	-167.58	-4.19	-1.97
1pnj	86	226	2.62	2.33	2.186	0.15	90.00	-402.44	-4.68	-1.78
1ten	89	226	2.54	2.36	1.671	3.38	330.00	-459.33	-5.16	-2.03
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1o6x	81	148	1.82	1.37	1.591	5.60	340.00	-324.76	-4.01	-2.19
2ci2	64	142	2.12	1.80	1.644	1.82	185.00	-312.47	-4.88	-2.20
1pgb	56	121	2.16	1.68	1.596	1.10	135.00	-244.95	-4.37	-2.02
2ptl	62	134	2.16	1.76	1.599	2.38	215.00	-285.96	-4.61	-2.13
1ris	97	225	2.32	1.93	1.695	1.46	265.00	-492.45	-5.08	-2.19
1bf4	63	145	2.30	1.75	1.740	0.54	180.00	-304.56	-4.83	-2.10
1ubq	76	178	2.34	1.83	1.809	3.25	275.00	-412.01	-5.42	-2.31
2acy	98	254	2.94	2.15	1.776	6.71	435.00	-541.70	-5.53	-2.13
1e65	128	337	2.63	2.31	1.860	6.91	555.00	-751.36	-5.87	-2.23
1k0s	151	323	2.14	1.79	1.887	3.11	380.00	-791.54	-5.24	-2.45
1fkb	107	285	2.66	2.24	1.826	3.52	350.00	-611.61	-5.72	-2.15
1n88	96	286	2.98	2.31	2.09	8.45	429.56	-597.98	-6.23	-2.09
1div	92	213	2.31	1.74	1.787	5.60	340.00	-484.62	-5.27	-2.28
1rfa	78	237	3.04	2.42	2.161	8.60	425.00	-549.19	-7.04	-2.32
1urn	96	219	2.28	1.77	1.837	2.61	305.00	-510.25	-5.32	-2.33
2qjl	99	239	2.41	1.81	1.815	6.18	415.00	-564.57	-5.70	-2.36
1poh	85	201	2.36	1.85	1.640	5.61	335.00	-434.15	-5.11	-2.16



Çizelge 4.6’da yeni bir yaklaşımla amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerinin dahil edildiği bu modellemede artık heterojen etkileşimler dikkate alınmaktadır. Böylece daha realistik bir yaklaşım içinde modelleme yapılarak proteinlerin kristal yapı bilgilerinden elde edilen istatistiksel potansiyel değerleri kullanılmaktadır. Bu modelde katlı (native) olmayan itici etkileşimler dinamiğe dahil edilmemiştir. Bu modelleme için tüm protein ailelerinde genel olarak geçiş sıcaklıklarında bir artma gözlemlenmiştir. Çünkü amino asit çiftleri arasındaki etkileşimlerin büyüklükleri değişim göstermiştir. Daha fiziksel olan bu yaklaşım için protein ailelerinde katlı durum enerjilerinde ve amino asit başına düşen katlı durum enerjisi homojen etkileşimli modele göre azalmalar meydana gelmiştir. Bu durum amino asitler arasındaki etkileşimlerin büyüklüğünün değişmesinden kaynaklanmaktadır.

**Çizelge 4.7.** Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olmadığı Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması

	<b>BARİYER YÜKSEKLİĞİ (<math>\Delta G^\ddagger</math>)</b>		
	<b>HETEROJEN ETKİLEŞİMLİ KISA ERİŞİMLİ İTİCİ ETKİLEŞİMLERİN OLMADIĞI GÖ MODELİ</b>		
<b>FARKLI BARİYER YÜKSEKLİKLERİ</b>	$\Delta G^\ddagger \leq 1kT$ <b>Bariyersiz (Downhill)</b>	$1kT < \Delta G^\ddagger < 3kT$ <b>Bariyersiz başlangıcı (incipient downhill)</b>	$\Delta G^\ddagger > 3kT$ <b>Bariyerli</b>
<b>TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER</b>	2bth, 1yza, 1ryk, 1enh, 1ayi, 1idy, 1imq, 1lmb, 1fex, 1ss1	2abd, 1ba5, 1w4j	1w4e
<b>TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER</b>	1e0l, 1e0m, 1k9q, 1pnj	1jo8	1mjc, 1c9o, 1csp, 1g6p, 1f09, 1f10, 1shf, 1shg, 1rlq, 3ait, 1wit, 1ten
<b>ALFA+BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER</b>	1bf4	2ci2, 1pgb, 1spr, 2ptl, 1ris, 1urn,	1o6x, 1ubq, 2acy, 1e65, 1fkb, 1n88, 1kos, 1div, 1rfa, 1poh, 2qjl

Çizelge 4.7’de bariyer yüksekliği için tüm protein aileleri göz önüne alınarak sınıflandırma yapılmıştır. Tamamen alfa sarmallarında oluşan protein ailesinden olan 1yza proteini için bariyersiz geçiş sürmekte 1w4e proteini için ise bariyer yüksekliği daha da artmıştır. Homojen etkileşimli Gō modellerinde  $\Delta G^\ddagger > 3kT$  kriteri için bu protein ailesine ait herhangi bir protein bulunmazken amino asitler arasındaki etkileşimlerin büyüklüklerinin değiştii heterojen etkileşimli model yaklaşımında 1w4e proteini bu şarta uymaktadır. Bu durum daha kooperatif bir davranış olarak yorumlanmaktadır. Alfa yapısına ait proteinlerden 2abd, 1ba5 ve 1w4j proteinlerinin homojen etkileşimli modellerde bariyersiz davranış gösterirken bu model yaklaşımında bariyer gözlemlenmiştir. Bu durum değişimi model farklılığından kaynaklanmaktadır. Yani amino asitler arasındaki etkileşimlerin büyüklüğü için göz önüne alınan değerler farklılaşmıştır. Tamamen beta ve alfa+beta yapısına sahip olan proteinler için daha önceki iki model yaklaşımında geçerli olan bariyersiz geçiş ve buna yakın davranışlar geçerliliğini sürdürmektedir. Sadece alfa+beta yapısına sahip olan 1pgb proteini için serbest enerjisi için geçerli olan bariyer yüksekliği bu model yaklaşımı itibariyle artma göstermiştir.

#### 4.2.4. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli

Çizelge 4.8. Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Go modeline göre elde edilen parametrelerin gösterilmesi

HETEROJEN ETKİLEŞİMLİ KISA ERİŞİMLİ İTİCİ ETKİLEŞİMLERİN OLDUĞU GÖ MODELİ										
TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
PDB KODU	$N$	$N_{\text{kontak}}^{\text{kath}}$	$\frac{N_{\text{kontak}}^{\text{kath}}}{N}$	$\frac{N_{\text{yo}}}{N}$	$T_f$	$\Delta G^\ddagger$	$E_{\text{min}}^D - E_{\text{min}}^N$	$E_{\text{kath}}$	$\frac{E_{\text{kath}}}{N}$	$\frac{E_{\text{kath}}}{N_{\text{kontak}}^{\text{kath}}}$
2abd	86	163	1.89	1.12	1.403	4.58	235.00	-310.80	-3.61	-1.91
2bth	45	71	1.57	0.87	1.516	0.95	100.00	-157.72	-3.50	-2.22
1yza	106	144	1.35	0.41	1.119	0.22	64.00	-252.65	-2.38	-1.75
1w4e	45	118	2.62	1.47	2.019	4.27	194.00	-251.73	-5.59	-2.13
1ryk	69	127	1.84	1.01	1.458	1.17	134.00	-241.57	-3.50	-1.90
1enh	54	99	1.83	1.02	1.637	0.22	100.00	-217.89	-4.04	-2.20
1ayi	86	159	1.84	1.13	1.593	0.75	176.00	-362.48	-4.21	-2.28
1imq	86	245	2.84	1.72	2.107	0.67	176.00	-540.05	-6.28	-2.20
1lmb	80	156	1.95	1.08	1.608	1.50	216.00	-365.99	-4.57	-2.35
1idy	54	104	1.92	0.81	1.733	0.27	94.00	-219.40	-4.06	-2.11
1fex	59	137	2.32	1.10	1.737	1.49	168.00	-280.50	-4.75	-2.05
1ba5	53	120	2.26	1.09	1.818	2.25	160.00	-248.82	-4.69	-2.07
1w4j	51	119	2.33	1.22	1.873	2.98	168.00	-238.09	-4.67	-2.00
1ss1	60	91	1.51	0.75	1.337	0.00	15.18	-192.87	-3.21	-2.12
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1jo8	58	149	2.56	2.29	1.836	0.84	129.52	-333.30	-5.75	-2.24
1mjc	69	166	2.40	2.09	1.702	4.25	255.00	-355.86	-5.16	-2.14
1c9o	66	157	2.37	2.06	1.684	6.31	255.00	-345.93	-5.24	-2.20
1csp	67	160	2.37	2.09	1.730	3.70	245.00	-356.11	-5.32	-2.23
1g6p	66	159	2.40	2.05	1.624	4.06	260.00	-330.55	-5.01	-2.08
1e0l	37	71	1.91	1.46	1.509	0.98	90.00	-122.13	-3.30	-1.72
1fnf <sub>3</sub>	90	268	2.97	2.76	1.929	8.34	435.00	-555.78	-6.18	-2.07
1fnf <sub>4</sub>	94	263	2.79	2.63	1.878	6.42	405.00	-541.32	-5.76	-2.06
1shf	59	137	2.32	2.12	1.806	4.87	250.00	-309.54	-5.25	-2.26
1shg	57	142	2.49	2.23	1.891	8.23	305.00	-325.25	-5.71	-2.29
1rlq	56	162	2.89	2.59	2.127	7.86	355.00	-368.02	-6.57	-2.27
3ait	74	235	3.17	2.76	1.845	5.07	375.00	-437.62	-5.91	-1.86
1wit	93	252	2.70	2.43	1.612	0.93	80.00	-516.98	-5.56	-2.05
1e0m	37	76	2.05	1.46	1.445	0.77	95.00	-123.10	-3.33	-1.62
1k9q	40	85	2.12	1.68	1.726	0.00	0.00	-167.58	-4.19	-1.97
1ten	89	226	2.54	2.36	1.667	5.31	360.00	-459.33	-5.16	-2.03
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP OLAN PROTEİNLER										
1o6x	81	148	1.82	1.37	1.609	2.03	225.00	-324.76	-4.01	-2.19
2ci2	64	142	2.12	1.80	1.674	2.19	195.00	-312.47	-4.88	-2.20
1pgb	56	121	2.16	1.68	1.595	2.64	175.00	-244.95	-4.37	-2.02
2ptl	62	134	2.16	1.76	1.613	4.26	235.00	-285.96	-4.61	-2.13
1iris	97	225	2.32	1.93	1.715	2.82	350.00	-492.45	-5.08	-2.19
1spr	103	279	2.71	2.13	1.922	3.89	445.00	-615.72	-5.98	-2.21
1bf4	63	145	2.30	1.75	1.746	1.83	220.00	-304.56	-4.83	-2.10
1ubq	76	178	2.34	1.83	1.825	5.04	300.00	-412.01	-5.42	-2.31
1k0s	151	323	2.14	1.79	1.877	3.68	420.00	-791.54	-5.24	-2.45
1fkb	107	285	2.66	2.24	1.828	6.46	400.00	-611.61	-5.72	-2.15
1div	92	213	2.31	1.74	1.825	8.04	365.00	-484.62	-5.27	-2.28
1urn	96	219	2.28	1.77	1.842	4.15	345.00	-510.25	-5.32	-2.33
2qjl	99	239	2.41	1.81	1.841	8.52	430.00	-564.57	-5.70	-2.36
1poh	85	201	2.36	1.85	1.671	7.78	355.00	-434.15	-5.11	-2.16

Çizelge 4.8’de heterojen etkileşimli Gō modeline katlı (native) olmayan itici etkileşimlerin eklenmesi ile yüklü ve polar amino asitler arası etkileşimlerin konformasyonlar üzerine olan etkileri üzerinde duruldu. İtici etkileşimler dahil edildiği için tüm protein ailelerinde geçiş sıcaklıklarında artış meydana gelmiştir. Katlı yapıya ulaşmak diğer model yaklaşımlarına nazaran daha zor gerçekleşmektedir. Ayrıca yolak sayısında azalma gözlemlenmiştir. Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi bariyer yükseklikleri sınıflandırmasında  $\Delta G^\ddagger > 3kT$  grubunda alfa+beta yapılarından oluşan proteinlerde artış görülmüş bariyersiz davranışa bu ailede rastlanmamıştır. Tamamen alfa sarmal yapılı 1yza proteini ise bariyersiz geçişlerini korumaktadır. 1w4e proteini ise daha kooperatif bir davranış dahilinde iki durumlu geçişler devam etmektedir. Aynı zamanda tamamen alfa protein ailesinde bulunan 1ryk, 1lmb, 1fex proteinlerinin bariyer yüksekliklerinde artma görüldü. Serbest enerji bariyer yüksekliği 2abd proteini için  $3kT$  değerinin üzerine çıkmıştır. Tamamen beta yapısına sahip olan proteinlerde  $1kT < \Delta G^\ddagger < 3kT$  kriterine uygun protein bulunmamaktadır. 1jo8 proteinin ise bariyer yüksekliği azalmıştır.

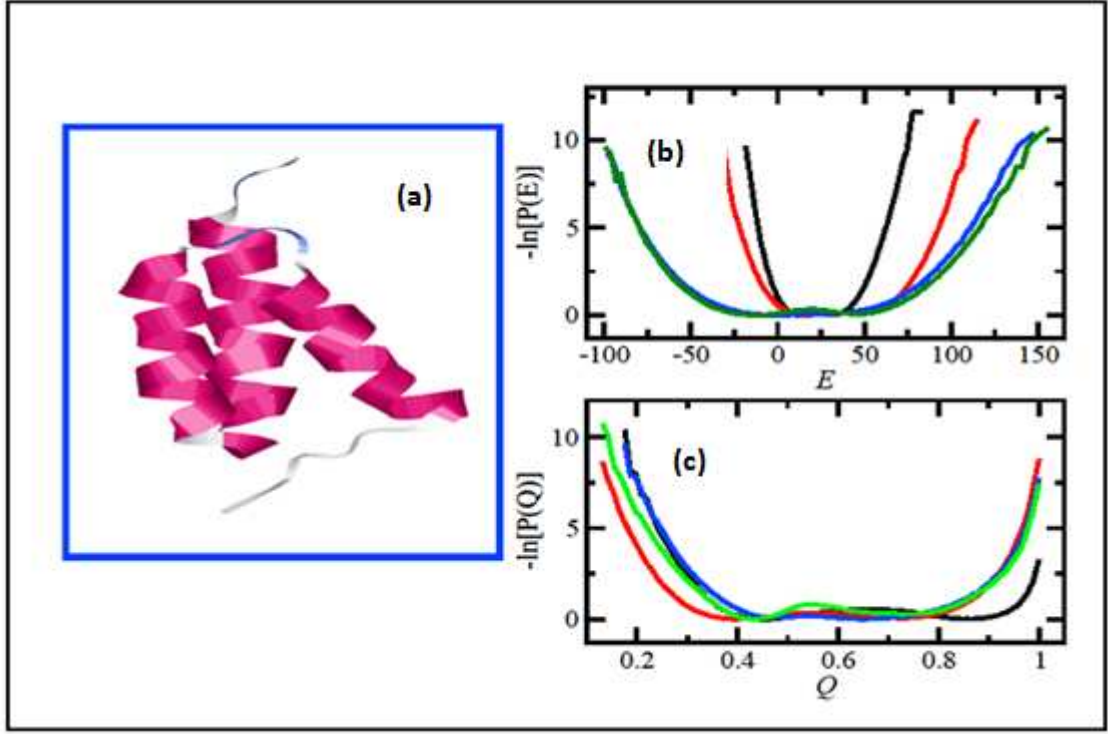
**Çizelge 4.9.** Tüm protein aileleri için heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeline göre elde edilen bariyer yüksekliklerinin sınıflandırılması

	BARİYER YÜKSEKLİĞİ ( $\Delta G^\ddagger$ )		
	HETEROJEN ETKİLEŞİMLİ KISA ERİŞİMLİ İTİCİ ETKİLEŞİMLERİN OLDUĞU GÖ MODELİ		
FARKLI BARİYER YÜKSEKLİKLERİ	$\Delta G^\ddagger \leq 1kT$ Bariyersiz (Downhill)	$1kT < \Delta G^\ddagger < 3kT$ Bariyersiz başlangıcı (incipient downhill)	$\Delta G^\ddagger > 3kT$ Bariyerli
TAMAMEN ALFA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	2bth, 1yza, 1enh, 1ayi, 1idy, 1imq, 1ss1	1ba5, 1w4j, 1ryk, 1lmb, 1fex,	2abd, 1w4e
TAMAMEN BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	1jo8, 1e0l, 1e0m, 1k9q, 1wit	Kritere uygun protein bu model için bulunmamaktadır.	1mjc, 1c9o, 1csp, 1g6p, 1f09, 1f10, 1shf, 1shg, 1rlq, 3ait, 1ten
ALFA+BETA YAPISINA SAHİP PROTEİNLER	Kritere uygun protein bu model için bulunmamaktadır.	1o6x, 2ci2, 1bf4, 1pgb, 1ris,	2ptl, 1ubq, 2acy, 1e65, 1fkb, 1n88, 1kos, 1spr, 1div, 1rfa, 1poh, 1urn, 2qjl

### 4.3. Model Proteinlerin Serbest Enerji Analizi

Bu bölümde incelenen tüm proteinler için protein termodinamiğine etkisi olabilecek topolojik parametrelerin enerjetik değerleri Çizelge 4.2, 4.4, 4.6 ve 4.8 ile gösterilmiştir. Şimdi bu protein ailelerinden seçilen iki protein için serbest enerji profilleri reaksiyon koordinatı olarak seçilen  $E$  ve  $Q$  için elde edilmiştir. Bu bölüm dahilindeki tüm şekillerde (a) ile proteinin katlanma yapısı, (b) ile reaksiyon koordinatının  $E$  olarak seçildiği serbest enerji profili, (c) ile reaksiyon koordinatının  $Q$  olarak seçildiği serbest enerji profili gösterilmektedir. Ayrıca (b) ve (c)'de yer verilen serbest enerji profillerinde siyah renk homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modelini, kırmızı renk homojen etkileşimli uzun erişimli Gō modelini, mavi renk, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olmadığı durumda Gō modelini, yeşil renk ise, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olmadığı durumda Gō modelini temsil etmektedir. Burada seçilen proteinler tüm model yaklaşımları için sürekli yüksek veya düşük bariyer yüksekliğine sahiptirler. Böyle bir inceleme ile proteinin topolojik yapısının bariyer yüksekliği ile olan ilgisi ve farklı model yaklaşımlarının bariyer yüksekliklerine etkisi incelenmiş olacaktır.

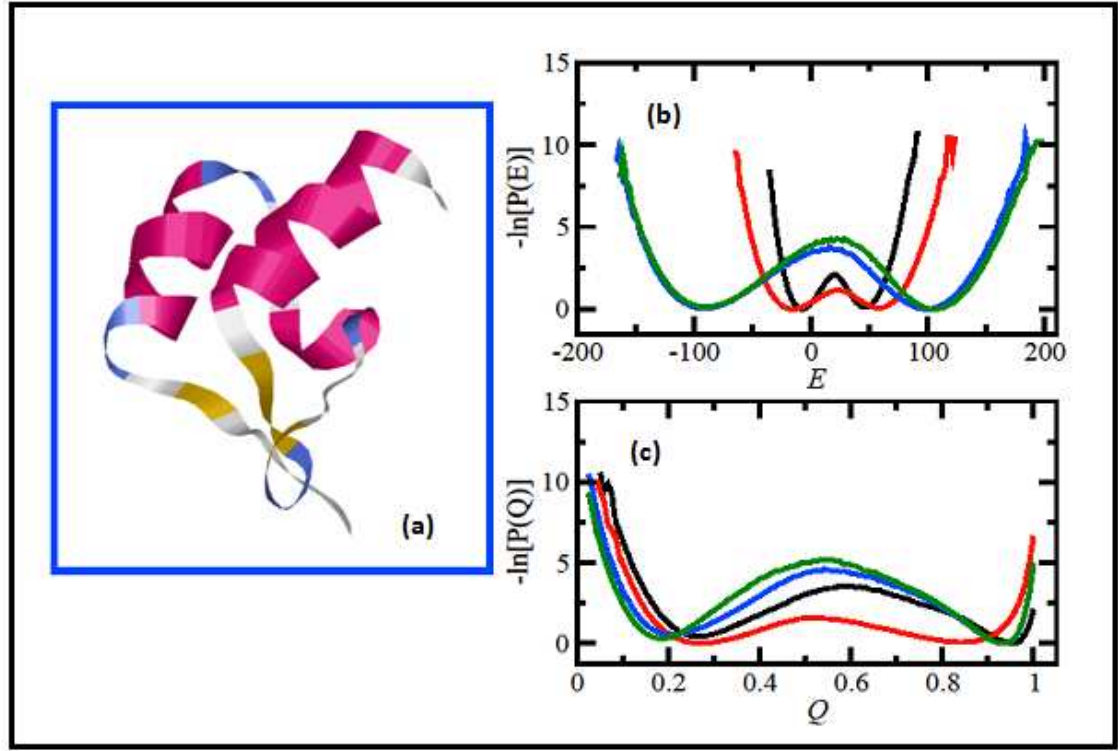
#### 4.3.1. Tamamen alfa yapısına sahip olan proteinler



**Şekil 4.12.** 1SS1 proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri

1ss1 (Staphylococcal protein) proteini küçük tek bölgesi amino asit sayısı 60 olan tamamen alfa sarmallarından oluşan bir protein olup; immün sistemde görev almaktadır. Homojen etkileşimli Gō modelinin uzun ve kısa erişimleri için oldukça düşük bariyer yüksekliği gösterirken, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olduğu ve olmadığı durumların dahil edildiği model yaklaşımlarında tamamen bariyersiz geçişler göstermektedirler. Şekil 4.3.1'de (c) ile gösterilen serbest enerji profilinde açık ve katlı durum konformasyonları arasındaki bariyer yüksekliği aynı şekilde (b) ile gösterilen serbest enerji profiline nazaran daha yüksek olarak gözlemlense de burada katlı (native) benzerlik parametresi olan  $Q$  kullanıldığı zaman konformasyonların çok farklı enerji değerlerine sahip olduğu ve özellikle geçiş bölgelerinde enerji çeşitliliğinin artmasıyla konformasyon popülasyonu artmaktadır.

Serbest enerji profilinde çoklu durumlar oluşmaktadır. Bu bölüm dahilinde gösterilen tüm  $Q$ 'ya bağlı serbest enerji profillerinde bu gözlemlere rastlanmıştır.

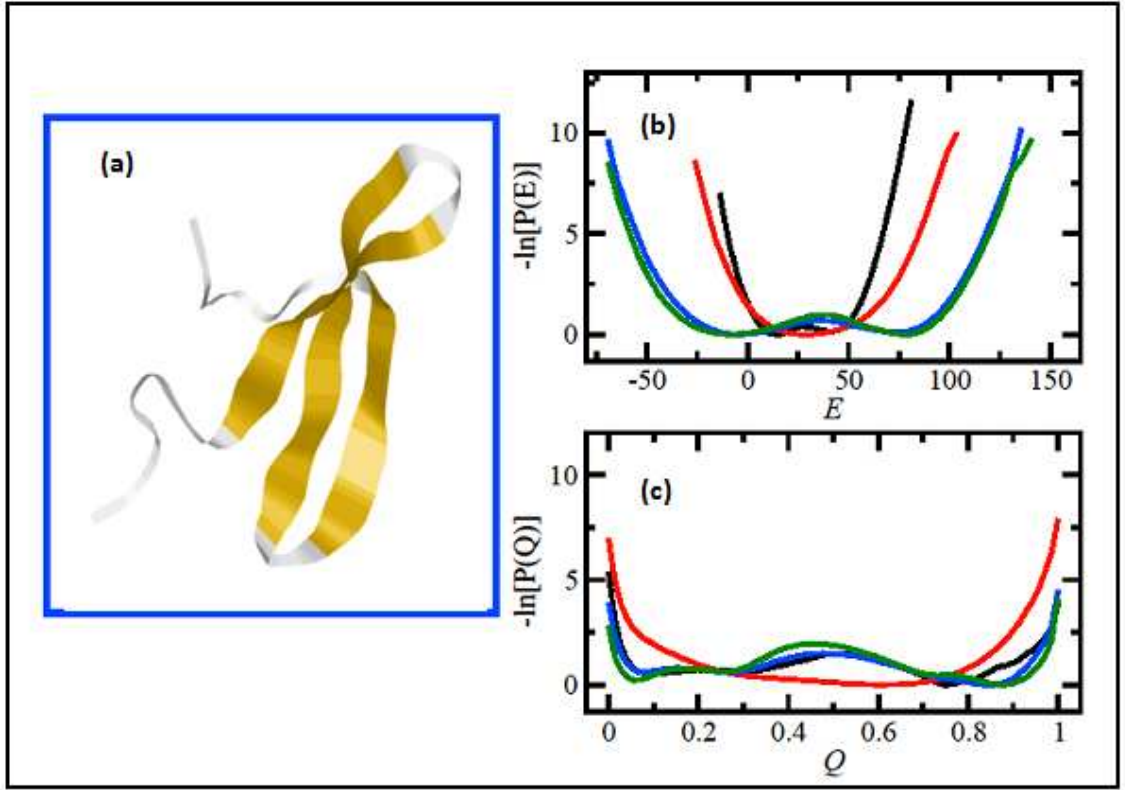


**Şekil 4.13.** 1W4E proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri

1w4e (Peripheral Subunit Binding Domain) proteini de tamamen alfa sarmallardan oluşan 45 amino asitlik zincir uzunluğuna sahip olan proteindir. Bu proteini diğerlerinden farklı kılan özelliği ise, göz önüne aldığımız tüm model yaklaşımlarında termodinamik olarak iki durum davranışı sergilemesi yani oldukça yüksek bariyer yüksekliklerine sahip olmasıdır. Bu durum proteinin topolojisi göz önüne alındığında (a) ile gösterilen 3 boyuttaki gösterimde sarı renkli dönüş (turn) kısımlarının beta yapılarından oluştuğu yani tamamen alfa sarmallardan oluşan yapılara göre daha zor katlandığı Çizelge 4.2, 4.4, 4.6 ve 4.8'de gösterilen geçiş sıcaklıklarının yüksek olmasındanda anlaşılabilir. Geçiş sıcaklığı arttıkça zaman proteinin daha tıkkız (compact) bir yapıya daha hızlı ulaştığını yani daha zor açıldığını biliyoruz. Dolayısıyla dönüş bölgesinde bulunan beta levhaları bu tıkkız yapının oluşum sürecini etkilemektedir.

Ayrıca diğer enerjetik parametreler gözönüne alındığında homojen etkileşimli modellerde amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisi en düşük olan protein olarak karşımıza çıkarken heterojen etkileşimli modellerde bu parametre için en düşük ikinci değer olmaktadır. Amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisi ayırt edici bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır.

#### 4.3.2. Tamamen beta yapısına sahip olan proteinler

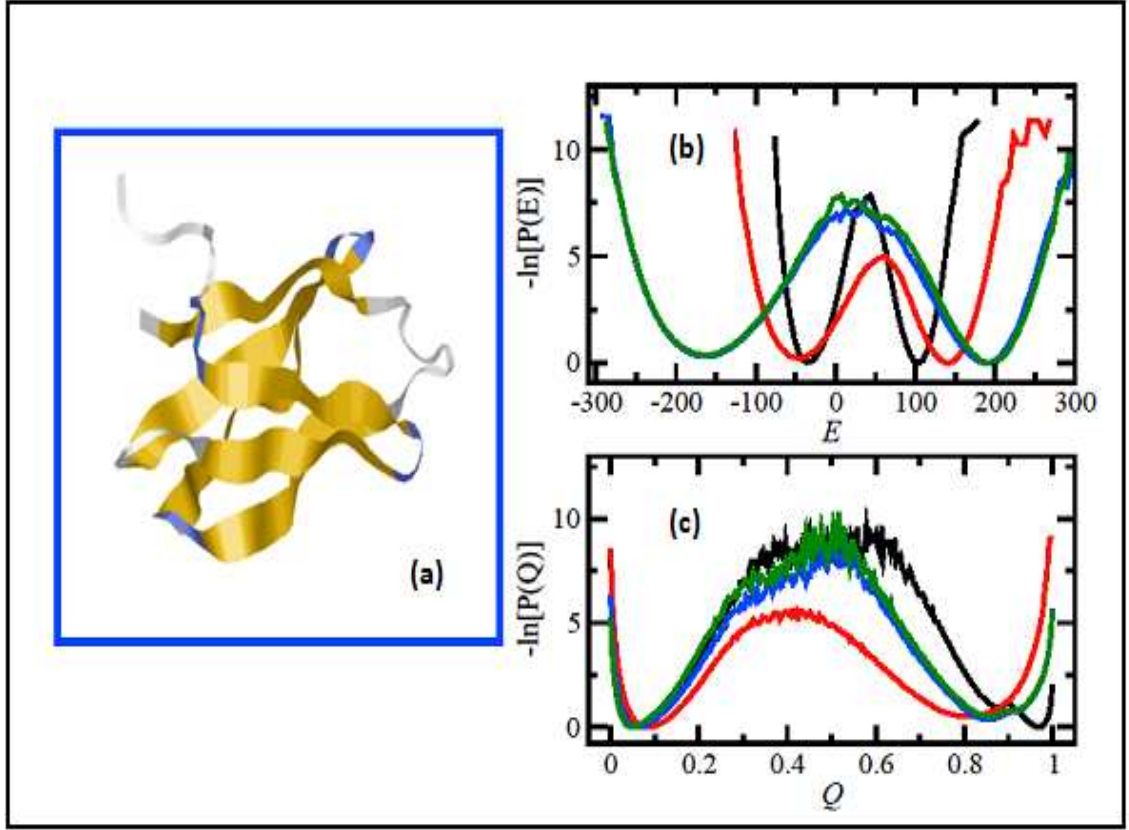


**Şekil 4.14** 1E0L proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri

1e0l (fbp28WW Domain) proteini tamamen beta yapısına sahip olmakla beraber tüm model yaklaşımlarında oldukça düşük bariyer yüksekliklerine sahiptir. Tek durumlu geçişler göstermektedir. (a) ile gösterilen topolojik yapısına baktığımız zaman dönüş kısımları oldukça kısa ve uç kısımlarında ise rastgele zincir yapısıyla karşılaşılmaktadır. Bu durum proteinin daha kolay açılıp katlanmasını dolayısıyla daha



düşük bariyer yüksekliklerine karşılık gelmektedir. Aynı zamanda bu protein 37 amino asit sayısına sahip oldukça kısa zincirli bir proteindir. Burada zincir uzunluğunun kısa oluşu, katlanmış yapı topolojisinden daha önemli bir rol oynamaktadır.



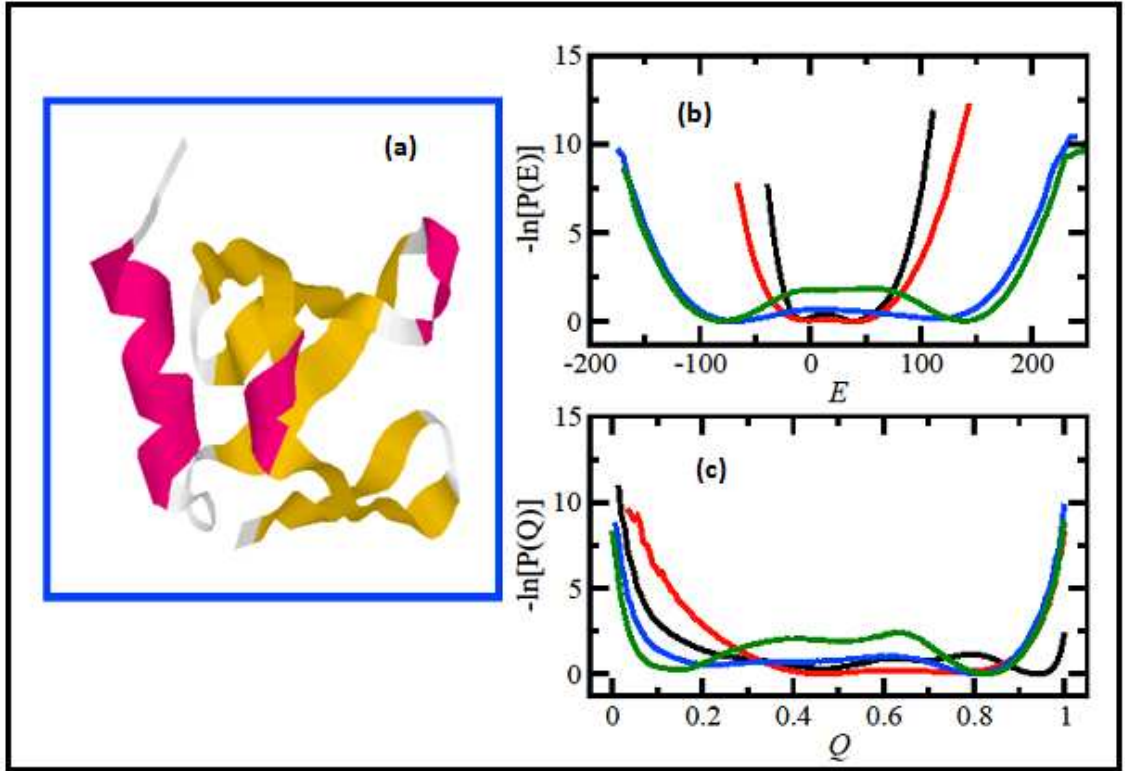
**Şekil 4.15.** 3AIT proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri

3AIT proteini tamamen beta yapılı 74 amino asit sayısına sahip olan tek bölge bir proteindir. 4 farklı model yaklaşımı için oldukça yüksek bariyer yüksekliklerine sahip olup (c) ile gösterilen  $Q$ 'ya bağlı serbest enerji profilinde geçiş durum bölgesinde aynı  $Q$  parametresine karşılık gelen konformasyonel enerjide oldukça yüksek enerji çeşitliliği oluşmaktadır. Ayrıca (c) grafiğinde geçiş bölgesinde oluşan pürüzlü yüzeyler Simülasyon zaman adımı ve katlanma ve açılma geçişlerinin sayısı ile ilgilidir.

Bu protein aynı aileden olan 1e0l proteinine göre daha kooperatif bir davranış göstermektedir. Bu durum kalorimetrik kriter değerlerinden anlaşılabilir gibi bariyer

yüksekliğiden de anlaşılabilir. Bariyer yüksekliğinin artması kooperatif davranışın artmasının bir ölçüsüdür.

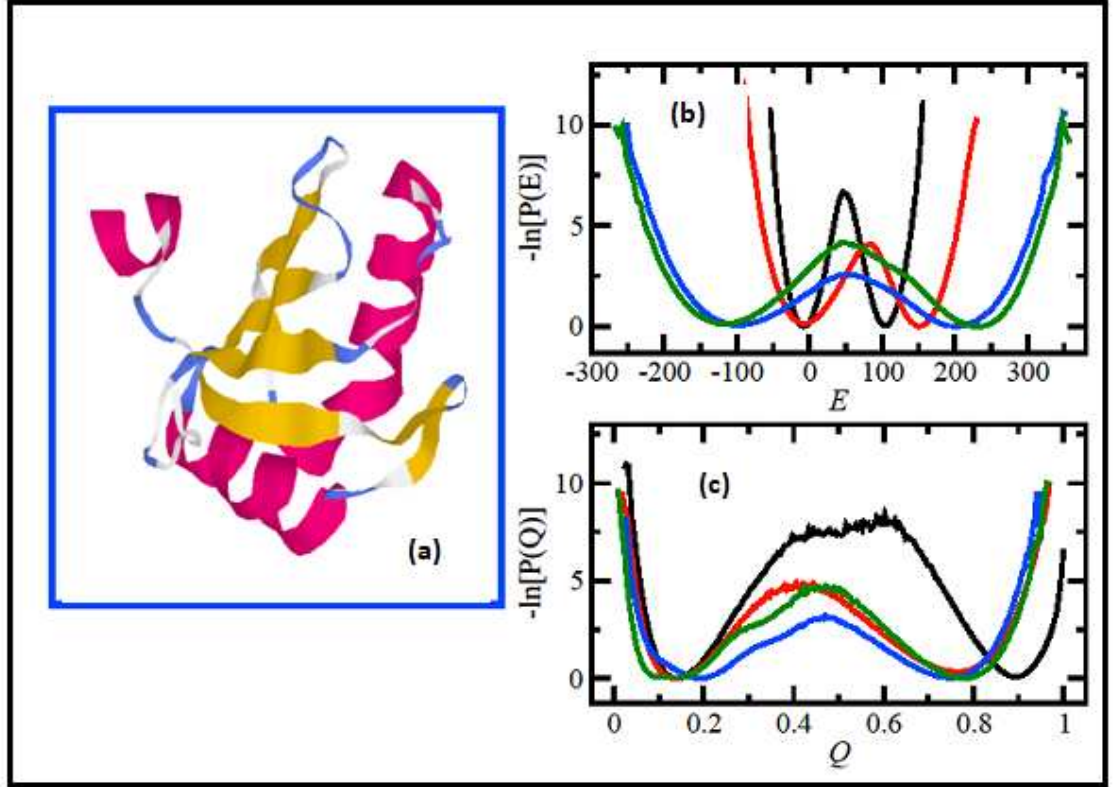
#### 4.3.3. Alfa + beta yapısına sahip olan proteinler



**Şekil 4.16.** 1BF4 proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri

Şekil 4.16'da (a) ile gösterildiği gibi bu protein alfa sarmal ve beta yapılarından meydana gelmektedir. Amino asit sayısı 63, etkileşim sayısı ise 145 olup bu aileye mensup diğer proteinlere göre kısa zincir uzunluğuna sahiptir. Ancak beta yapılarını birbirine bağlayan dönüş bölgelerinin kısa ve alfa sarmallarından oluşması ve uç kısmında da alfa sarmaldan oluşan bir yapıda olması katlanma ve açılma sırasında proteinin davranışını etkilemektedir. Bu durum proteinin daha kolay açılıp

katlanabilmesine sebep olmaktadır. Proteinlerin dönüş bölgelerinin sahip olduğu yapısal özellikler katlanma topolojisini belirleyen faktörler arasındadır. 1bf4 proteininin zincir uzunluğuda aynı aileye mensup diğer proteinlere nazaran daha kısadır.

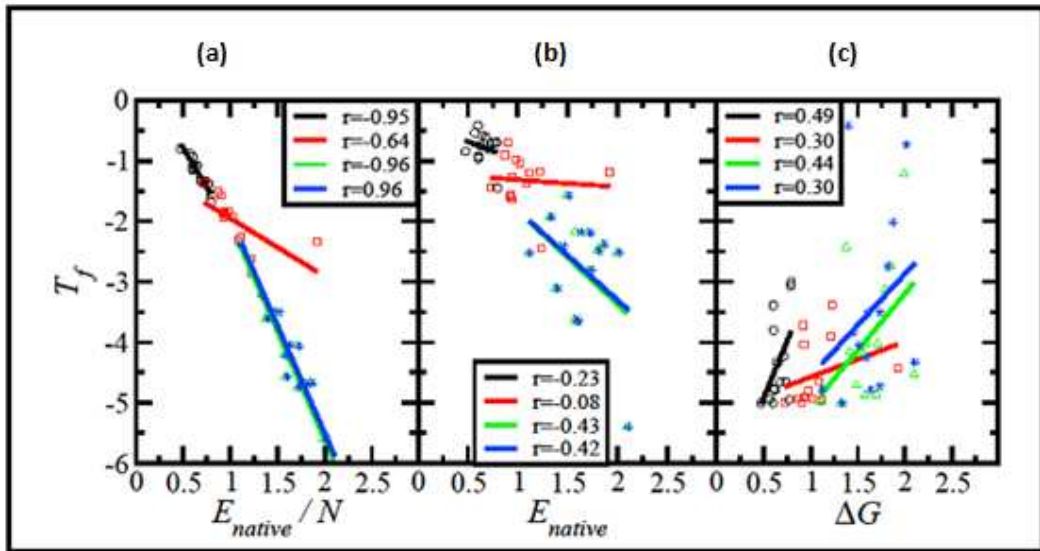


**Şekil 4.17.** 1URN proteini için topolojik gösterim ve serbest enerji profilleri

Amino asit sayısı 96 etkileşim sayısı 219 olan 1urn proteini dönüş bölgelerinde beta yapılarından oluşmaktadır. Amino asit sayısı başına düşen yerel olmayan kontak sayısı 1,74 ve geçiş sıcaklığında 1,842 ile oldukça yüksek değer aralığındadır. Bu değerler proteinin oldukça tıkHz bir yapıya sahip olduğunu gösterir. Alfa+beta yapısında olan proteinler genellikle termodinamik olarak yüksek bariyer ve iki durumlu geçişler göstermektedirler. Şekil 4.17'de (b) ile gösterilen serbest enerji profillerinde homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modelinde yaklaşık olarak  $6 kT$  civarında oldukça yüksek bir bariyer gözlemlenmiştir.

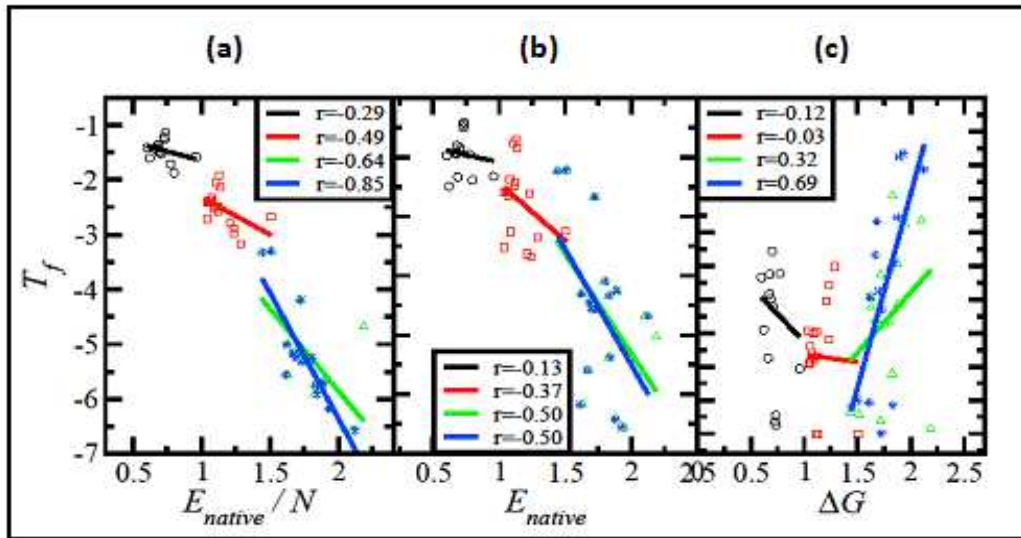
#### 4.4. Geçiş sıcaklığını ve bariyer yüksekliğini etkileyen faktörler

Proteinlerin açılma ve katlanma simülasyonlarını incelerken göz önüne alınması gereken ilk parametre geçiş sıcaklığıdır. Geçiş sıcaklığı değerinde sistemin ısı alışverişi maksimumdur. Dolayısıyla bu sıcaklıkta katlanma ve açılma oranları yaklaşık olarak birbirine eşittir. Geçiş sıcaklığı proteinlerin kooperatif davranışlarından, kristal yapısının tıkkızlığına kadar uzanan birçok konu hakkında bize bilgi vermektedir. Bu bölümde geçiş sıcaklığını etkileyen faktörleri belirlemek için 4 farklı model yaklaşımında 3 ayrı protein ailesine ait olan proteinleri göz önüne alarak geçiş sıcaklığının ( $T_f$ ) amino asit sayısı başına düşen katlı (native) durum enerjisi ( $E_{native}/N$ ) ile korelasyonu (a) grafiği ile, katlı (native) durum enerjisi (b) grafiği ile, bariyer yüksekliği ( $\Delta G$ ) (c) grafiği ile gösterilmektedir. Grafiklerin tümünde siyah renk homojen etkileşimli kısa erişimli Go modelini, kırmızı renk homojen etkileşimli uzun erişimli Go modelini, yeşil renk, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olmadığı durumda Go modelini, mavi renk ise, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşmelerin olduğu durumda Go modelini temsil etmektedir.



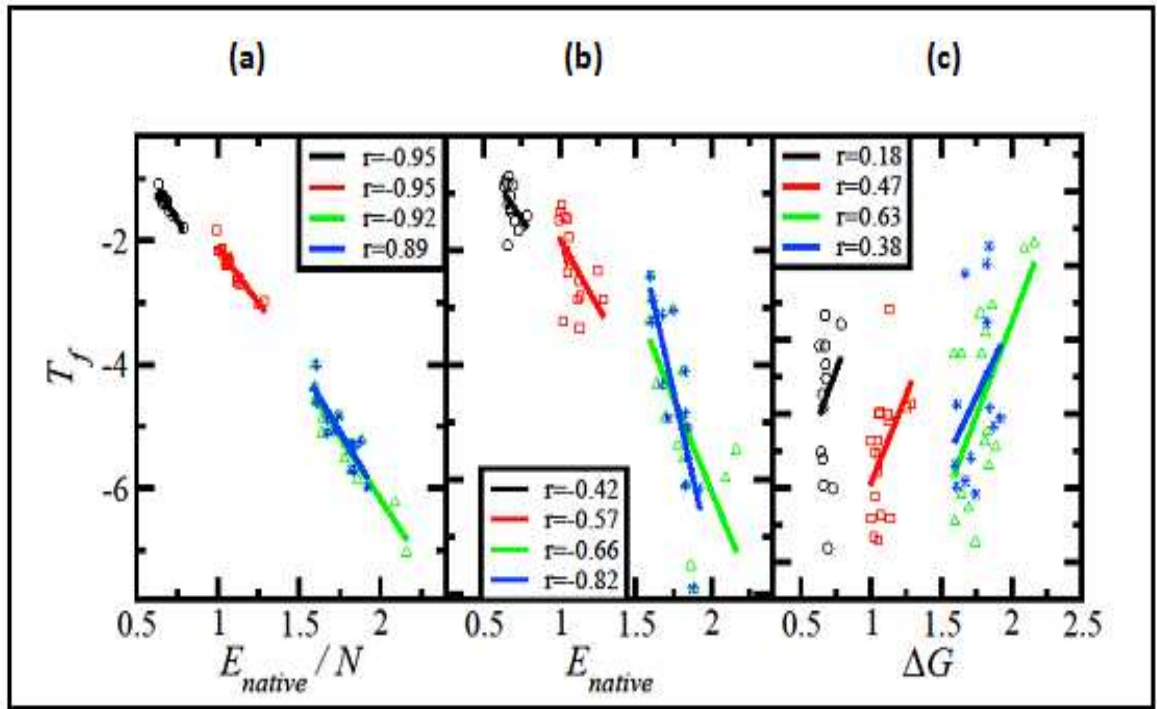
**Şekil 4.18.** Tamamen alfa proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları

Şekil 4.18 ile tamamen alfa sarmallarından oluşan protein aileleri için geçiş sıcaklığının çeşitli parametrelere göre değişimleri gösterilmektedir. Geçiş sıcaklığı bu aileye ait proteinler için farklı 4 modelde amino asit başına düşen katlı durum enerjisi ile oldukça yüksek korelasyon vermektedir. Korelasyon katsayısı ( $r$ ) homojen etkileşimli modellerde 0,95 civarında değerlere sahiptir. Bu durum geçiş sıcaklığının amino asit başına düşen katlı durum enerjisinin miktarı ile orantılı olarak değiştiğini bize göstermektedir. Sadece katlı durum enerjisine bakıldığı zaman ise homojen etkileşimli modellerin bu enerji değişimi ile hiç bir ilgisi olmadığı heterojen etkileşimlerde ise diğerlerine nazaran biraz daha yüksek olduğu görülür. Tamamen alfa sarmallardan oluşan proteinler göz önüne alındığı zaman katlı durum enerjisinin geçiş sıcaklığının belirlenmesinde etkin olmadığı anlaşılmıştır. Aynı şekilde geçiş sıcaklığının bariyer yüksekliği ile olan uyumu incelendiğinde geçiş sıcaklığının bariyer yüksekliğini etkileyebilecek bir ölçüde olmadığı ilk 3 model yaklaşımı ile görülmektedir. Ancak itici etkileşimlerin olduğu heterojen etkileşimli modelde korelasyon katsayısı  $r = 0.69$  değerini almaktadır. İtici etkileşimlerin varlığı tüm protein aileleri için geçiş sıcaklığını artıran bir etki yapmaktadır. Aynı zamanda bu model yaklaşımı için termodinamik geçişler sırasında gözlemlenen bariyer yüksekliklerinde artış mevcuttur.



**Şekil 4.19.** Tamamen beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları

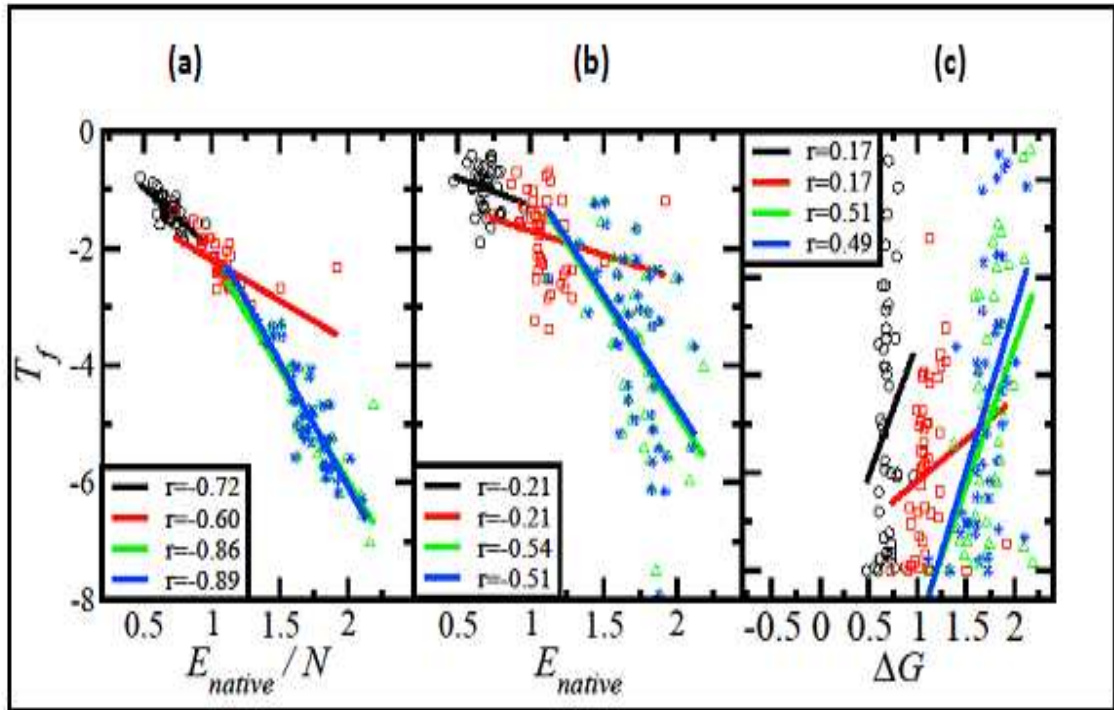
Şekil 4.19 ile tamamen beta yapıları göz önüne alındığı zaman ise; amino asit başına düşen katlı durum enerjisinin geçiş sıcaklığı ile yalnızca heterojen etkileşimli itici etkileşmelerin olduğu model için yüksek korelasyon verdiği görülmektedir. Yine aynı model için geçiş sıcaklığının katlı durum enerjisi ile bariyer yüksekliği ile olan korelasyonlarının tamamen alfa sarmal yapıdaki proteinlere göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu durum tamamen beta yapıları için itici etkileşmelerin varlığının dikkat çekici olduğunu göstermektedir. Farklı protein ailelerinde aynı parametrelerin karşılaştırılması yapısal özelliklerden dolayı farklı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.



**Şekil 4.20.** Alfa+beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları

Şekil 4.20 ile tamamen alfa+beta yapısında olan proteinlerin geçiş sıcaklığı ile amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjilerinin korelasyonlarına bakıldığında tamamen alfa sarmal yapılarda olduğu gibi tüm modeller için oldukça yüksek bir korelasyon elde edilmiştir. Alfa+beta ailesinde bulunan alfa sarmal yapılarının amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisinden etkilenmekte olduğu gerçeğini göstermektedir. Aynı

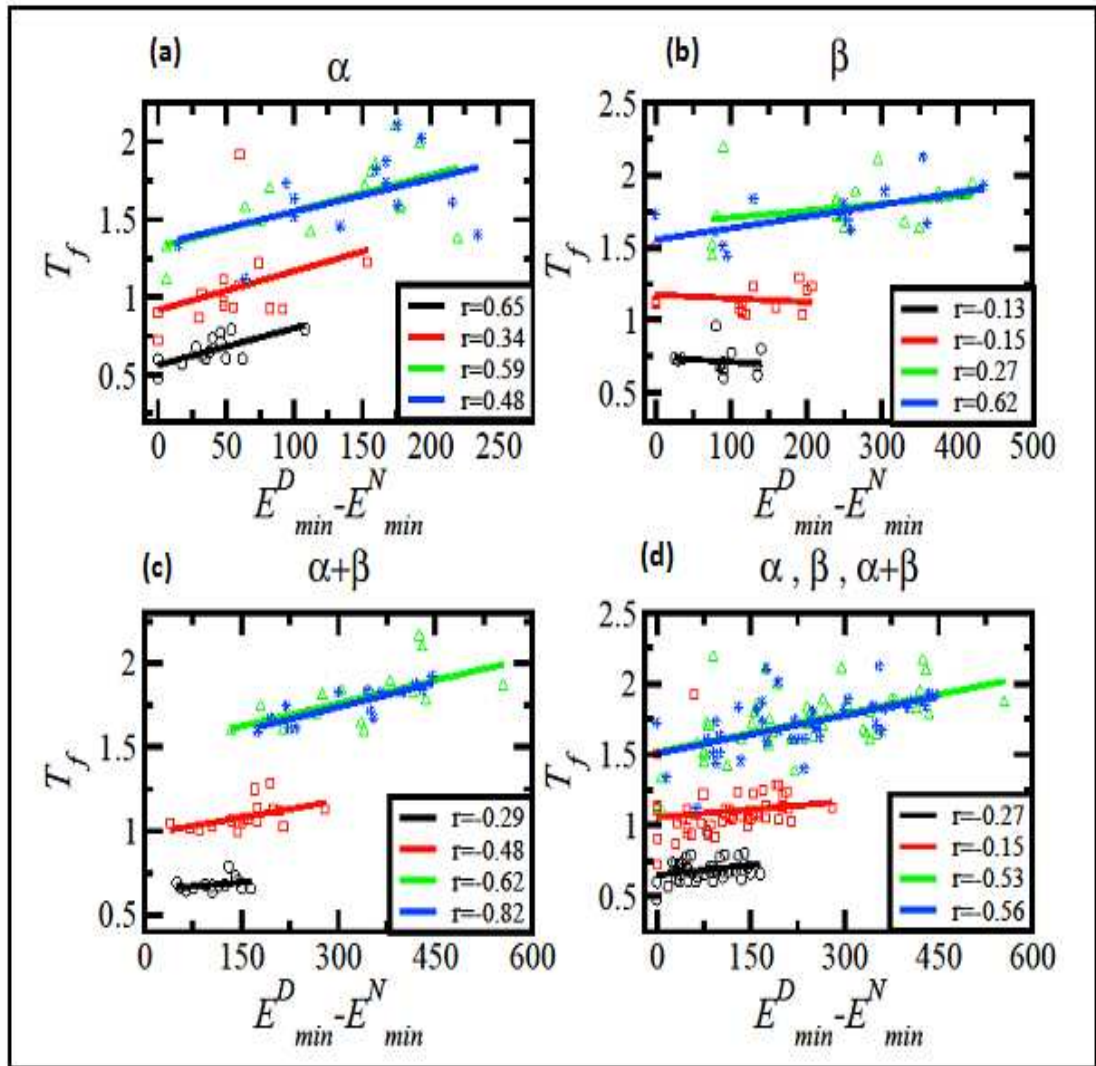
yaklaşım ile geçiş sıcaklığı ile katlı durum enerjisinin korelasyonuna baktığımızda heterojen etkileşimli itici etkileşimlerin olduğu model için oldukça yüksektir. Bariyer yüksekliği bu protein ailesi için de homojen etkileşimli model yaklaşımlarında geçiş sıcaklığını belirleyen bir etken olarak gözükmemektedir. Amino asitler arası etkileşimlerin gerçek değerlerinin göz önüne alındığı heterojen etkileşimli itici etkileşimlerin olmadığı modelde ise  $r \cong 0.60$  civarında olan bir korelasyon katsayısı değeri ile karşılaşmaktadır.



**Şekil 4.21.** Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için geçiş sıcaklığını etkileyen parametrelerin birbirleri ile olan korelasyonları

Aynı yaklaşımları proteinlerin tamamının birarada bulunduğu Şekil 4.21 için yaparsak; geçiş sıcaklığı amino asit başına düşen katlı durum enerjisi ile korelasyon katsayısının ( $r$ ) 0.7 ila 0.9 aralığında değiştiği görülür. Genel bir yaklaşımla bu parametrenin geçiş sıcaklığını belirlemede bir etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Katlı durum enerjisi ise yalnızca heterojen etkileşimli model yaklaşımları için diğer modellere göre geçiş sıcaklığının belirlenmesinde biraz daha etkindir. Bariyer yüksekliğinin ise geçiş

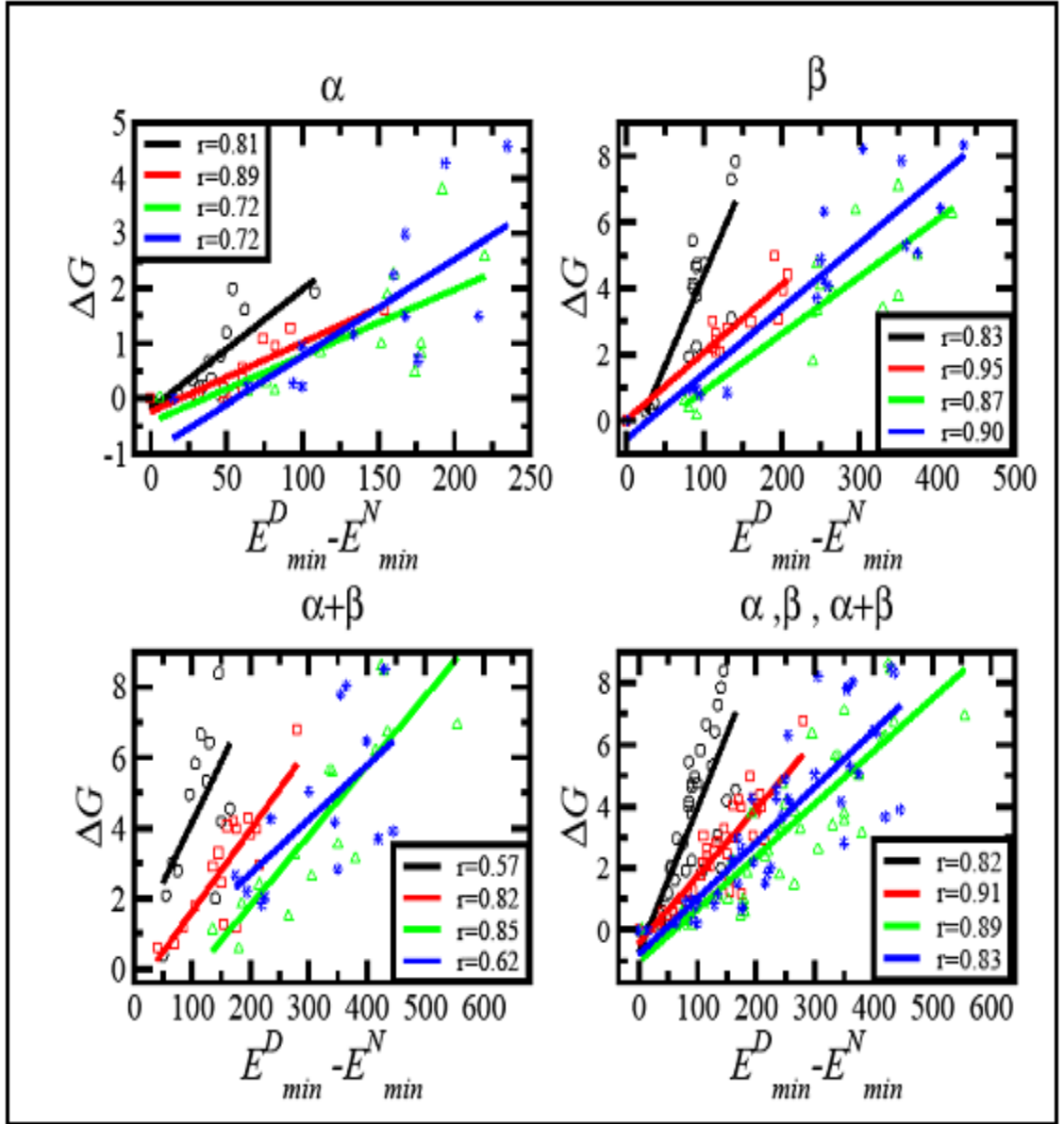
sıcaklığının tayininde önemli bir etkisinin olmadığı ancak yine de heterojen etkileşimli model yaklaşımlarını içeren modellerde daha yüksek korelasyon verdiği görülmektedir. Bu durum yeni bir yaklaşım dahilinde ortaya çıkardığımız amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerinin dahil edildiği bu tarz modellerin daha da geliştirildiği takdirde birçok niceliğin belirlenmesinde önemli olacağı kanısındayız.



**Şekil 4.22.** Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için geçiş sıcaklığı ile açık ve katlı durumun enerji minimumları arasındaki korelasyonlar



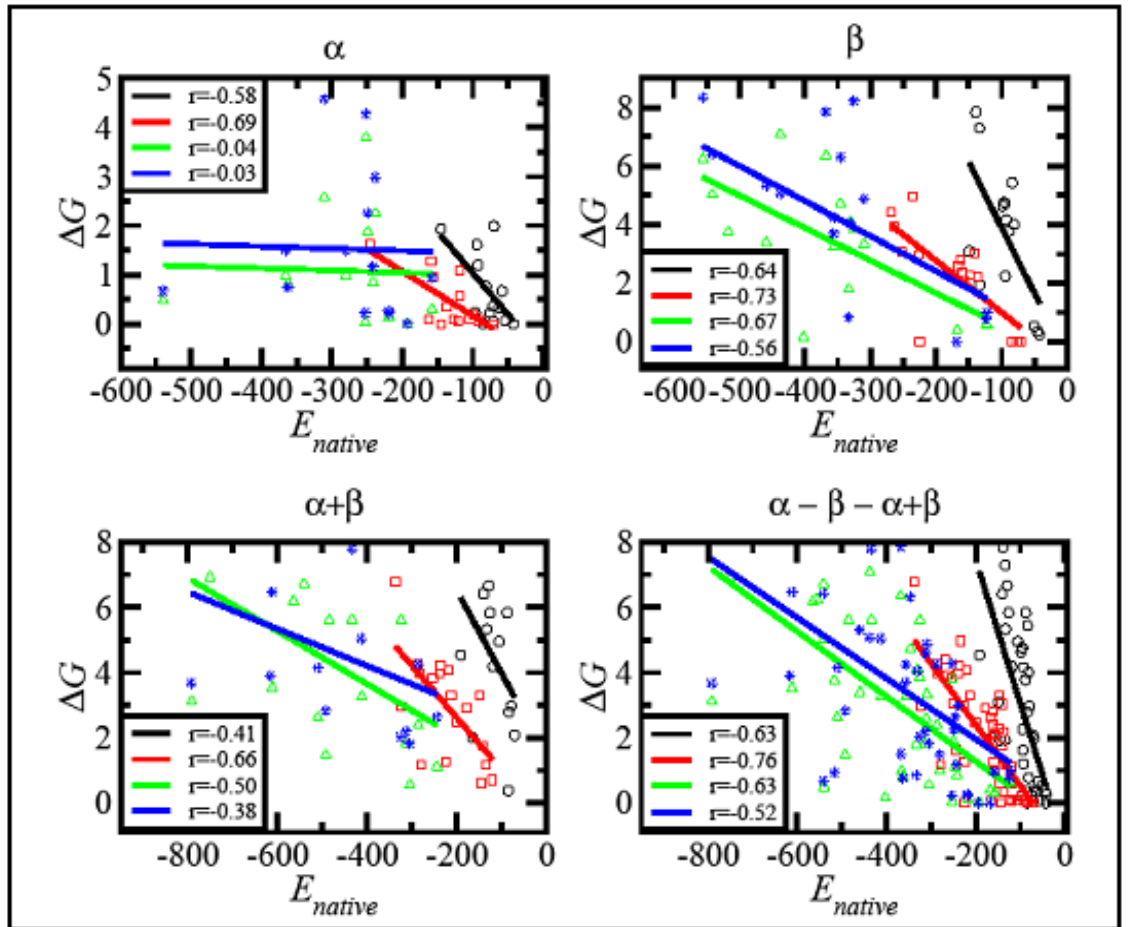
Geçiş sıcaklığı ile Şekil 4.10'da açık ve katlı durum toplulukları arasındaki fark  $E_{min}^D - E_{min}^N$  olarak tanımlanan bariyer genişliği tüm model yaklaşımları ve protein aileleri dikkate alınarak incelendiğinde Şekil 4.22. ile verilen grafikler elde edilmiştir. Alfa yapılı proteinlerde en yüksek korelasyon ( $r=0.65$ ) homojen etkileşimli Gō modeli için elde edilirken, tüm protein yapıları arasında en yüksek korelasyon alfa +beta yapılı proteinler için gözlemlenmiştir. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli için korelasyon katsayısı ( $r=0.82$ ) olarak bulunmuştur. İtici etkileşimlerin varlığında alfa ve alfa+beta protein ailelerinde geçiş sıcaklıkları artmaktadır. Açılma ve katlanma geçişleri itici etkileşimlerin varlığından etkilenmektedirler. Dolayısıyla katlı ve açık konformasyon minimumlarına karşılık gelen enerji farkının geçiş sıcaklığını belirlemede bir ktiter olarak göz önüne alınabilir. Heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu Gō modeli için bu şekilde elde edilen bulgulara dayanarak alfa sarmal yapılarının topolojileri gereği daha kolay açılıp katlanmalar gösterdiği anlaşılır. Tamamen beta yapıları ise daha zor açılıp katlanma özelliklerine sahiptirler. Daha genel yaklaşımlar içinde bulunabilmemiz için her iki yapının birarada olduğu protein ailesini dikkate almalı herbir yapının özelliğini ve enerjetik faktörlerin etkilerini, katlanma topolojisine etki eden parametrelerin neler olduğuna bu yapıdaki proteinlerin incelenmesi ile elde edebiliriz.



**Şekil 4.23.** Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için bariyer yüksekliği ile açık ve katlı durumun enerji minimumları arasındaki farkın korelasyonu

Şekil 4.23'de bariyer yüksekliği ile açık ve katlı durumun enerji minimumları arasındaki farkın (serbest enerji bariyer genişliği) korelasyonuna bakılmıştır. Bariyer genişliğinin ve bariyer yüksekliğinin serbest enerji profilindeki yeri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Termodinamik geçişlerin bariyerli ve bariyersiz olarak sınıflandırılması bariyer yüksekliğine göre yapılmaktadır. Bütün model yaklaşımlar göz önüne alındığı

zaman korelasyon katsayısı ( $r$ ) yaklaşık olarak 0.7 ve yukarıdaki değerlerde değişim göstermektedir. Bu değerler oldukça yüksek korelasyon anlamına gelirken, alfa+beta protein ailesinde homojen etkileşimli kısa erişimli Gō modelinde korelasyonun azaldığı ( $r=0.57$ ) göze çarpmaktadır. Bu durum protein ailesinin yapısal özelliğinden ve etkileşimlerin kısa erişimli olmasından kaynaklanmaktadır.

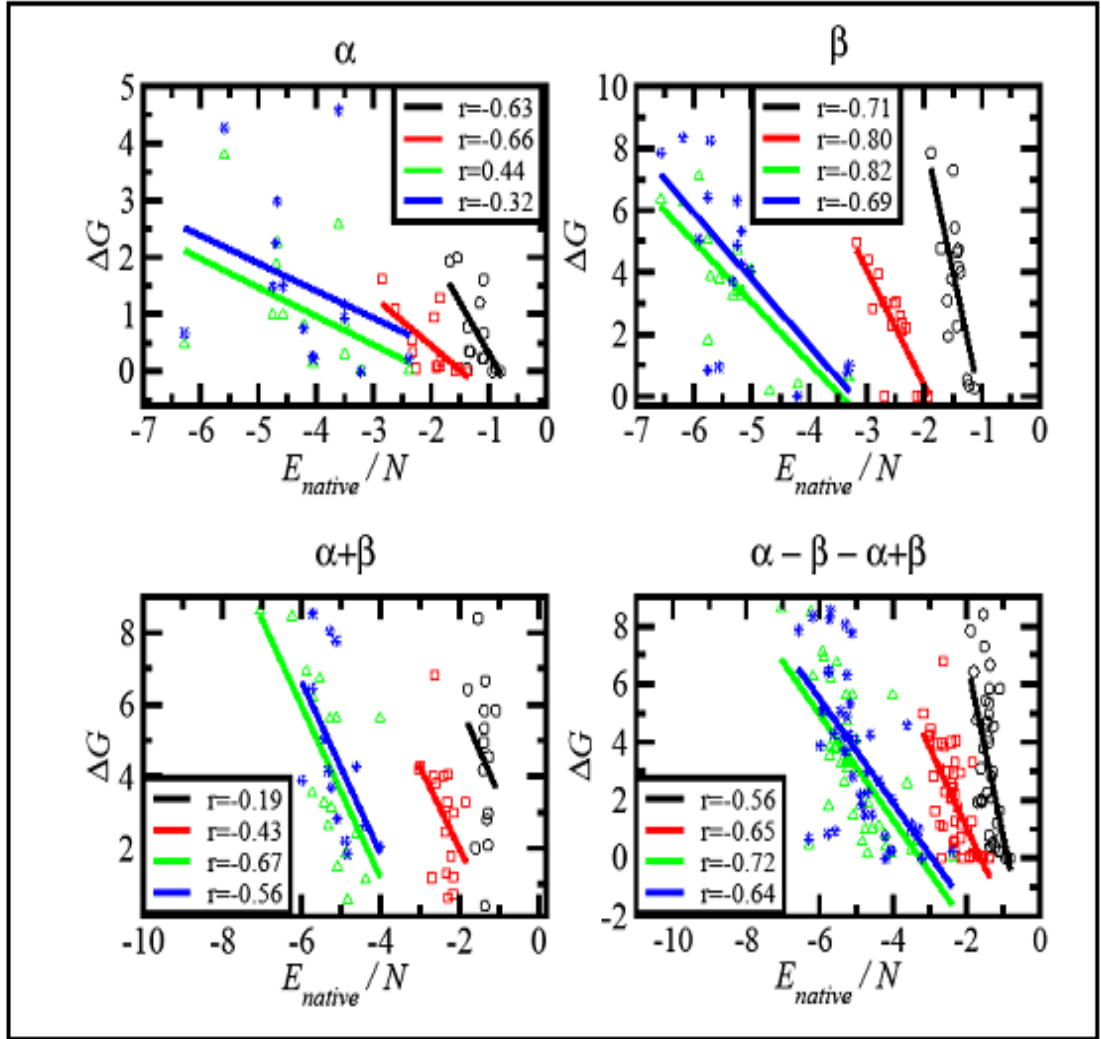


**Şekil 4.24.** Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için bariyer yüksekliği ile katlı durum enerjisi arasındaki korelasyon

Şekil 4.24'de tamamen alfa protein ailesinde homojen etkileşimlerin olduğu uzun erişimli modelde korelasyon katsayısı ( $r$ ) diğer modellere göre daha yüksektir. Bu durum uzun erişimli etkileşimlerin protein modellemesinde etkin olduğunu gösterirken,

heterojen etkileşimli Gō modeli için ileride yapılacak olan çalışmalarda uzun erişimli etkileşimlerin önemi araştırılacaktır. Alfa protein ailesinde katlı durum enerjisi heterojen etkileşimli model yaklaşımları için bariyer yüksekliğini belirleyen bir etken olmadığı anlaşılmıştır.

Tamamen beta yapılı protein ailelerinde ise; en yüksek korelasyon yine homojen etkileşimlerin olduğu uzun erişimli model yaklaşımı için sağlanırken ( $r = 0.73$ ) en düşük korelasyon ise heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu model için gözlemlenmiştir. ( $r = 0.56$ ) Tamamen beta protein ailesinin katlanma sırasında göstermiş olduğu davranışlar yani yapısal özellikleri katlı durum için sahip oldukları enerjiyi etkilerken katlı durum ile açık durum arasında termodinamik geçişler sırasında meydana gelen bariyer için oldukça belirleyicidir. Alfa+beta protein ailesi için korelasyon katsayıları incelendiği zaman yine en yüksek değere ( $r = 0.66$ ) homojen etkileşimlerin olduğu uzun erişimli model yaklaşımı için ulaşılmaktadır. Tamamen beta yapılarında olduğu gibi çok yüksek korelasyon değerleri elde edilmese de katlı durum enerjisi proteinin katlanma topolojisine ve proteinin ait olduğu aile yapısına göre değişim göstermektedir. Katlı durum enerjisi tamamen beta yapısına sahip genellikle iki durumlu davranış gösteren proteinlerde bariyer yüksekliğini belirleyen bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır.



**Şekil 4.25.** Tamamen alfa, tamamen beta ve alfa+beta proteinleri için bariyer yüksekliği ile amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerji değeri arasındaki korelasyon

Şekil 4.25’de tüm model yaklaşımları için bariyer yüksekliği ile amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisinin korelasyonu incelendi. Tamamen beta yapısına sahip olan proteinler için tüm modeller için yüksek korelasyon değerlerine ( $r \cong 0.70$ ) rastlanmıştır. Tamamen alfa yapısına sahip olan proteinler için ise yine en düşük korelasyon değerlerine heterojen etkileşimlerin etkin olduğu model yaklaşımlarında rastlanmıştır.

Bariyer yüksekliği proteinlerin topolojik yapısı ile yakından bir ilişkisi olduğu amino asit başına düşen katlı durum enerjisine bakılarak görülebilir. Genel olarak bariyer yüksekliği proteinlerin yapısal özelliklerine, kullanılan modellerin içeriğine göre değişim göstermektedir. Model yaklaşımları içinde olmayan heterojen etkileşimli itici etkileşmelerin olduğu ve olmadığı uzun erişimli Gō modeli için farklı enerji ölçeklemeleri göz önüne alınarak incelemeler yapılmalıdır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada temel amacımız, biyolojik bir molekül olan proteinleri moleküler dinamik simülasyon metodunu kullanarak basitleştirilmiş protein modelleri yardımıyla kooperatif ve kooperatif olmayan davranışları termodinamiksel olarak incelemektir. Tüm bunları gerçekleştirirken deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlarla etkileşim içinde bulunulmaktadır. Bu bağlamda tercih edilen topolojik olarak küçük tek bölgele proteinler incelenmiştir. Kalorimetrik iki durum kriterini göz önüne aldığımızda genellikle tamamen beta ve alfa+beta yapısına sahip olan proteinlerin daha yüksek kooperatif davranış göstererek, termodinamik geçişlerde açık ve katlı konformasyonlar arasında bir serbest enerji bariyerinin olduğu ve iki durumlu davranışa sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca tamamen alfa yapısına sahip olan proteinlerin ise bu durumun tersine genellikle kalorimetrik deneysel iki durum kriterinden saparak kooperatif olmayan davranışlar sergileyerek termodinamik olarak bariyersiz geçiş göstermişlerdir. Bu karşılaştırmaları ilk olarak bölüm 4.1’de gösterildiği gibi çalışma boyunca ele almış olduğumuz homojen ve heterojen etkileşimlerin ayrı ayrı incelendiği 4 ayrı model yaklaşımına göre tamamen alfa yapılarından oluşan kısa zincir uzunluğuna sahip olan 1BBL proteininin, tamamen beta yapılarından meydana gelen daha uzun zincir uzunluğuna sahip olan 1RLQ proteinine göre daha az kooperatif davranış ve daha düşük bariyer yüksekliği gösterdiği yapılan termodinamik analizler sonucunda belirlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda 1BBL (*Escherichia coli*) proteininin bariyersiz davranış gösterdiğini desteklemektedir (Garcia-Mira *et al.* 2002). Ayrıca deneysel olarak yapılan çalışmaların bir çoğunda PSBD (Peripheral Subunit-Binding Domain) ailesine sahip olan yaklaşık 40 amino asitlik proteinlerin bariyersiz katlanmasına odaklanmıştır. (Ferguson *et al.* 2004) ve (Huang *et al.* 2007) Aynı şekilde beta yapılarından oluşan *Escherichia coli* CspA proteininin iki durum davranışı ve katlanma özelliklerine göre kararlılığı Reid *et al.* (1998) tarafından yapılan çalışmada ortaya çıkarılmıştır. Böylece farklı protein yapılarına ve ailelerine sahip yaklaşık 50 protein üzerinden yaptığımız detaylı incelemeler tamamen alfa proteinlerinin genellikle üzerinde çalıştığımız dört model için tek durumlu katlanma gösterdiklerini ancak bazı istisnai durumların ortaya

çıkıldığını gözler önüne sermektedir. Örneğin PDB Kodu 1w4e ve 2bth olan iki protein topolojik olarak neredeyse birbirlerinin aynısı olmalarına rağmen 1w4e tüm model yaklaşımları için iki durum davranışı sergilemektedir. 2bth ise homojen etkileşimli kısa ve uzun erişimli Go modelleri için bariyersiz yani tek durumlu davranış gösterirken, heterojen etkileşimli kısa erişimli itici etkileşimlerin olduğu ve olmadığı durumda bariyer yüksekliği diğer modellere göre artmaktadır. Yine de bariyer yüksekliği  $1kT$ 'den küçük olarak bulunmuştur. Tamamen alfa proteinleri için elde edilen diğer farklı sonuç ise; PDB Kodu 1YZA olan 106 amino asit sayısına sahip proteinde 4 farklı model için termodinamik geçişler bariyersiz olarak gözlemlenmiş olup tamamen alfa yapısında olan proteinler arasında amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisi en büyük olandır. Tamamen alfa yapısına sahip olan proteinlerin kristal yapısı incelendiği zaman sarmal yapılardan oluştukları için yerel etkileşimlerin çok olması hızlı bir katlanmaya sebebiyet vererek bariyer yüksekliğini azaltmaktadır. Bariyer yükseklikleri açısından yaptığımız sınıflandırmada Liu *et al.* (2007) ve Liu and Gruebele (2008) yılında yapmış oldukları 35 WW bölgesi (domain) proteinler için deneysel çalışmada göz önüne alınan kriterleri kullanıldı. Buna göre;

- $\Delta G^\ddagger \leq 1kT$  ise; bariyersiz geçişler
- $1kT < \Delta G^\ddagger < 3kT$  ise; bariyersiz geçişlerin başlangıcı
- $\Delta G^\ddagger \geq 3kT$  ise; bariyerli geçişler

Olarak sınıflandırılabilir. Bu kriterler için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5, 4.7 ve 4.9'da gösterilmektedir. Tamamen alfa yapısına sahip olan proteinlerin yerel etkileşimlerinin sayısı yerel olmayan etkileşimlerinin sayısından daha fazla olması katlanmayı hızlandırarak bariyersiz geçişlere sebebiyet verebilmektedir. Ayrıca dönüş (turn) bölgelerinin uzun veya kısa olması, sarmal yapılarında Prolin ile glisin amino asitlerinin bulunması, yan zincir bölgelerinin yük durumu gibi çeşitli yapısal ve topolojik farklılıklar alfa yapıları için sadece bir ölçüde belirleyici olmaktadır.



Burada dikkat çekici bir sonuç olarak tamamen alfa proteinleri dışındaki proteinlerin bazılarında da bariyersiz geçişler gözlemlenmiştir. Bu durum bariyersiz geçişlerin, proteinlerin zincir uzunluğu gibi topolojik özelliklerle enerjetik, entropik faktörlerinde bu süreçte önemli bir rolü olduğu gerçeğine bizi götürmektedir. Bu anlamda açık ve katlı durum populasyonları arasında hasıl olan bariyerin yüksekliğine etki eden faktörleri tüm protein aileleri için ayrı ayrı incelenmeye çalıştık. Geçiş sıcaklığının bariyer yüksekliğine hiç bir katkısının olmadığı, amino asit sayısı başına düşen katlı durum enerjisinin ise geçiş sıcaklığı için belirleyici bir kriter olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca tamamen beta yapısından meydana gelen proteinler için katlı durumdaki konformasyonel enerji ve amino asit sayısı başına düşen konformasyonel enerji değerleri bariyer yüksekliği oldukça yüksek korelasyonlar vermektedirler. Bariyer yüksekliğinde ortaya çıkan değişimler aynı zamanda kooperatif davranışlar için de önem arz etmektedir. Bariyer yüksekliğinin azaldığı durumda yani tek durumlu termodinamik geçişlerde daha az kooperatif davranış gözlemlenmektedir. Bu durum kalorimetrik iki durum kriteri kullanılarak doğrulanmaktadır.

Bu çalışma boyunca kullanmış olduğumuz modelleme yaklaşımları arasında en dikkat çekici olan heterojen etkileşimli modellemedir. Çünkü bu model ile amino asitlerin fizikokimyasal özellikleri katlanma dinamiklerine dahil edilmektedir. Böylece amino asitler arasındaki etkileşimler daha gerçekçi bir hal kazanmaktadır. Bu yaklaşım ile daha önceden sıklıkla tercih edilen homojen etkileşimli Go modelleri ile elde edilen termodinamik sonuçlar ile uyum gözlemlenmiştir.

Ayrıca protein dizaynı çalışmaları ve mutasyonel etkilerin protein dinamiklerine olan katkılarının anlaşılması açısından önem arz etmektedir. Ancak heterojen etkileşimli kısa erişimli ve itici etkileşimlerin dahil edildiği modelleme ile yapılan termodinamik analizlerde genel olarak tüm protein aileri için açık ve katlı durum populasyonlarını birbirinden ayıran serbest enerji bariyerinde bir yükselme söz konusudur.

Protein katlanmasını tam olarak modelleyebileceğimiz etkileşim potansiyellerinin geliştirilmesi açısından yapılan bu 4 farklı modelleme ve elde edilen veriler bu anlamda

büyük önem taşımaktadır. Etkileşimlerin uzun veya kısa olmasında katlanma dinamiğine olan katkısı göz ardı edilmemelidir. Hatta uzun erişimli heterojen etkileşimli model yaklaşımlarına göre proteinlerin davranışları belirli bir ölçekleme yapılarak incelenmelidir. Elde edilen veriler arasındaki çeşitlilik ve protein ailelerine göre yakalanmaya çalışılan uyum proteinlerin doğal yapısının karmaşıklığı, çevresel faktörlerin etkisi, farklı enerjetik yaklaşımların karakteristikleri göz önüne alındığı zaman hem çok detaylı hem de protein bazında spesifik bir gözlem yapılmış olmaktadır. Bu çalışma içerisinde geliştirilen heterojen etkileşimli model çerçevesinde protein katlanması ana başlığı altında mutasyonların protein dinamiğine olan etkileri ve protein evriminin incelenebilmesi için temel yaklaşım oluşturmaktadır.

**KAYNAKLAR**

- Alder, B., J. and Wainwright, T., E., 1957. Phase transition for a hard sphere system. *Journal of Chemical Physics*, 27, 1208-1209.
- Anfinsen, C. B, 1973. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, 181(4096), 223-230.
- Anson, M. L. and Mirsky, A.E. ,1931. Protein coagulation and its reversal. The Rockefeller University Press.
- Arrondo, J. L. and Alonso, A. , 2006. *Advanced Techniques in Biophysics*. Springer-Verlag, 280 p, Berlin.
- Badasyan, A., Liu, Z., Chan, H. S., 2008. Probing possible downhill folding: Native contact topology likely places a significant constraint on the folding cooperativity of proteins with ~ 40 residues. *Journal of Molecular Biology*, 384(2), 512-530.
- Blaber, M., 2009. DSC: Data Analysis. Biomedical Sciences College of Medicine Florida State University, <http://mikeblaber.org/methods/DSCintro.ppt> (28.06.2009).
- Bryngelson, D. J. , Onuchic, J. H. , Socci, N. D. , Wolynes, P. G. , 1994. Funnels pathways and energy landscape of protein folding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 21 (3), 167-195.
- Bunagan, M., Yang, X., Saven, G. and Gai, F., 2006. Ultrafast Folding of a Computationally Designed Trp-Cage Mutant: Trp<sup>2</sup>-Cage. *The Journal of Chemical Chemistry*, 110(8), 3759-3763.
- Chan, H. S., Kaya, H. and Shimizu, S., 2002. Computational methods for protein folding: Scaling a hierarchy of complexities. *Current Topics in Computational of molecular Biology*, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA 403-447.
- Cho, S., Levy, Y. and Wolynes, P., 2006. P versus Q: Structural reaction coordinates capture protein folding on smooth landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 586-591.
- Clementi, C. , Nymeyer, H. , and Onuchic, J. H. , 2000. Topological and Energetic Factors: What Determines the Structural Details of the Transition State Ensemble and "En-route" Intermediates for Protein Folding? An Investigation for Small Globular Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 298, 937-953.
- Cooper, A., 1999. Thermodynamics of Protein Folding and Stability. *Protein: A Comprehensive Treatise*, 2, 217-270.
- Dill, K. A. and Chan, H. S. , 1997. From Levintal to pathways to funnels. *Nature structure Biology*, 4, 10-19.
- Eaton, W. , 1999. Searching for "downhill scenarios" in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5897-5899.
- Ferguson, N., Schartau, N., Sharpe, P., Sato, T., Fersht, A., 2004. One-state Downhill versus Conventional protein Folding. *Journal of Molecular Biology*, 344, 295-301.
- Fersht, A.R., Matouschek, A., Serrano, L., 1992. The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 224(3), 771-782.

- Fersht, A., 2000. Transition state structure as a unifying basis in protein- folding mechanism: Contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (4), 1525-1529.
- Garcia-Mira, M. , Sadqi, M. , Fischer, N. , Sanchez-Ruiz J. and Munoz, V. , 2002. Experimental Identification of Downhill folding. *Science*, 298, 2191-2195.
- Gibson, J.B., Goland, A.N., Milgram, M. and Vineyard, G. H., 1960. Dynamics of Radiation Damage. *Physical Review* 120(4), 1229-1253.
- Gō, N., 1983. Theroretical Studies of Protein Folding. *Annual Review of Biophysics and Bioenginneering*, 12, 183-210.
- <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (2.06.2009).
- Huang, F., Sato, S., Sharpe, T., Ying, L., Fersht, A., 2007. Distinguishing between cooperative and unimodal downhill protein folding. 104 (1), 123-127.
- Jackson, S. E. and Fersht, A. R. , 1991. Folding of chymotrypsin 2.1. Evidence for a two state transition. *Biochemistry*, 30 (43), 10428-1435.
- Jackson. S. E.. Moracci. M.. elMasry. N.. Johnson. C. M. And Fersht. A. R. 1993. Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2. *Biochemistry*. **32** (42). 11259–11269.
- Jackson, S. E. , 1998. How do small single-domains proteins fold ? . *Folding&Design*, 3 (4), 81-91.
- Kaya, H. and Chan, H. S. , 2000. Polymer Principles of Protein Calorimetric Two-State Cooperativity. *Proteins: Structure, Functions and Genetics*, 40, 637-661.
- Kaya, H. and Chan, H. S. , 2003. Solvation effects and driving forces for protein thermodynamics and kinetic cooperativity:How adequete is Native-centric Topological Modeling? *Journal of Molecular Biology*, 326, 911-931.
- Kaya, H. and Chan, H. S. , 2004. Cooperativity principles in protein folding. *Methods in Enzymology*. 380, 350-379.Kaya, H., 2009. Tübitak Araştırma projesi Geliştirme Raporu. Erzurum
- Karplus, M. and Kuriyan, J. , 2005. Molecular Dynamics and Protein Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 6689-6685.
- Kendrew, J., 1962. The three dimensional structure of a protein molecule *Sci Am.*205 96-110 1961.
- Knott. M.. Kaya. H. and Chan. H. S.. 2004. Energetics of Protein Thermodynamic Cooperativity: Contributions of Local and Nonlocal Interactions. *Polymer*. 54. 623-632.
- Kubelka, J. , Hofrichter, J. and Eaton, A. W. , 2004. The protein folding ‘speed limit’. *Current Opinion in Structural Biology*. 14, 76-88.
- Levinthal, C. 1968. Are there pathways for protein folding ?. *Extrait du Journal de Chimie Physique*, 65, 1-44.

- Li, H., Tang, C., and Wingreen, N., S., 1997. Nature of driving force for protein folding: A result from analyzing the statistical potential. *Physical Review Letters*, 79(4), 765-768.
- Liu, F., Du, D., Fuller, A., Davoren, J., Wipf, P., Kelly, W. And Gruebele, M., 2007. An experimental survey of the transition between two-state and downhill protein folding scenarios. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (7), 2369-2374.
- Liu, F. and Gruebele, M. , 2007. Tuning  $\lambda_{6-85}$  Towards Downhill Folding at its Melting Temperature. *Journal of Molecular Biology*, 370, 574-584.
- Liu, F., and Gruebele, M. 2008. Downhill dynamics and the molecular rate of protein folding. *Chemical Physics Letters*. 461, 1-8.
- Matouschek, A. , Kellis, J. ,T. , Serrano, L. , Fersht, A. , 1989. Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. *Nature*, 340, 122-126.
- Miyazawa, S. and Jernigan, R.L., 1985. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: Quasi-Chemical approximation. *Macromolecules*, 18, 534-552.
- Miyazawa, S. and Jernigan, R.L., 1996. Residue- residue potentials with a favorable contact pair term and an unfavorable high packing density term, for simulation and threading. *Journal of Molecular Biology*, 256(3), 623-644.
- Munoz, V. 2008. *Protein Folding, Misfolding and Aggregation*. RSC Publishing. 272p, Cambridge.
- Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V., 2004. *Harper Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri, 928, Türkiye.
- Murzin, A., G., Brenner, S., E., Hubbard, T., and Chothia C., 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, 247, 536-540.
- Nienhaus, G. U. ,2005. *Protein-Ligand Interactions Methods and applications*. Humana Press, 568 p, Germany.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., 2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, 711, Ankara.
- Pande, V. S. , Rokhsar, D. S. , 1998. Is the Molten globule a third phase of proteins?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 1490-1494.
- Pande, V., 2005. *Protein Folding: Detailed Models*. Springer, 320p, Netherlands.
- Petsko, G.A. and Ringe, D., 2004. *Protein Structure and Function*. New Science Press, 195, Sunderland.
- Prabhu, V. And Sharp, K. 2005. Heat Capacity in Proteins. *Annual Reviews Physical Chemistry*.56, 521-548.
- Petsko, G. A and Ringe, D. 1999-2004 *Protein and Function* New Science Press.
- Rahman, A. 1964. Correlation in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Physical Review*, 136(2A), A405-A411

- Reid, K., L., Rodriguez, H., M., Hillier, B., J., Gregoret, L., M., 1998. Stability and folding properties of a model beta-sheet protein, Escherichia coli Cspa. *Protein Science* 7 (2) 470-479.
- Sadqi, M. , Fushman, D. , Munoz, V. , 2006. Atom-by-atom analysis of global downhill protein folding. *Nature*, 442, 317-321.
- Shirley, B. A. , 1995. *Protein Stability and Folding Theory and Practice*. Humana Press, 377 p, Germany.
- Smith, C., Marks, A., Lieberman, M., 2007. *Mark's Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins, 976, Philadelphia.
- Thomasson, W.A., 1996. *Unraveling the Mystery of Protein Folding*. Federation of American Societies for Experimental Biology, <http://opa.faseb.org/pages/Publications/breakthroughs.htm> (26.06.2009).
- Veitshans, T., Klimov, D. and Thirumalai, D., 1996. Protein folding kinetics: timescales, pathways and energy landscapes in terms of sequence-dependent properties. *Folding & Design*, 2. 1-22.
- Zhang, J. Wenfei, L. Wang, J., Qin, M. and Wang, W., 2008. All atom replica exchange molecular simulation of protein 1BBL. *Proteins*, 72, 1038-1047.
- Zhou, Y. , Hall, C. K. ,and Karplus, M. , 1999. The calorimetric criterion for a two-state process revisited. *Protein Science*, 8, 1064-1074.
- Zuo, G., Wang, J., Wang, W., 2006. Folding with Downhill Behavior and Low Cooperativity of Proteins. *Proteins*, 63(1), 165-173.
- Zielenkiewicz, W. and Margas, E. , 2002. *Theory of Calorimetry*. Kluwer Academic Publication, 188 p, USA.
- Whitford, D. 2005. *Proteins: Structure and Function* Wiley-Liss. 528p, USA.
- Weikl, T. R., 1997. Transition states in protein folding kinetics: Modeling  $\phi$ - values of small  $\beta$ -sheet proteins. *Biophysical Journal*, 94, 929-937.
- Weikl, T. R., 2007. Protein folding. *Polymers and Proteins*, <http://www.mpikg-golm.mpg.de/th/work/report06/tw1.pdf> (05.06.2009)

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Erzurum'da doğan Mevşen PİRİMOĞLU ilk, orta, lise eğitimini Erzurum'da tamamladı. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünden mezun oldu. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Fizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya başladı.