

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TETRAMERİK HEXCOİL-ALA DEMETİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK
SİMÜLASYON YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

FİZİK ANABİLİMDALI

DOKTORA TEZİ

HAKAN ALICI

OCAK 2018

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TETRAMERİK HEXCOİL-ALA DEMETİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK
SİMÜLASYON YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

FİZİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Hakan ALICI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Kadir DEMİR

ZONGULDAK

Ocak 2018

KABUL:

Hakan ALICI tarafından hazırlanan ‘‘Tetramerik HexCoil-Ala Demetinin Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi İle İncelenmesi’’ başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 29/01/2018

Danışman: Doç. Dr. Kadir DEMİR

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü



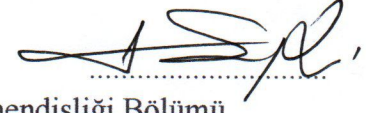
Üye: Prof. Dr. M. Halûk GÜVEN

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü



Üye: Prof. Dr. Fatih YAŞAR

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fizik Mühendisliği Bölümü



Üye: Doç. Dr. Mehmet DİLAVER

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fizik Mühendisliği Bölümü



Üye: Yrd. Doç. Dr. Meral ERYÜREK

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

20.02/2018



Doç. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”



Hakan ALICI

ÖZET

Doktora Tezi

TETRAMERİK HEXCOİL-ALA DEMETİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Hakan ALICI

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kadir DEMİR

Ocak 2018, 121 sayfa

Proteinler hücre ve canlı organizmalarda kararlılık, hareketlilik, kataliz, tanıma, patojen temizleme, sinyal verme, sıralama ve şekil verme gibi birçok biyolojik olaylardan sorumlu makromoleküllerdir. Proteinlerin bu çok farklı biyolojik fonksiyonları, onların konformasyonel yapılarına ve katlanma mekanizmalarına oldukça bağlıdır. Doğada var olmayan yeni biyolojik fonksiyonları elde etmek amacıyla yapılan protein tasarımı çalışmalarına son zamanlarda büyük ilgi duyulmaktadır. Bu noktada, Grigoryan ve arkadaşları tarafından de novo peptid olarak tasarlanan HexCoil-Ala zinciri, hücre zarında ilaç tasarımı, ilaç taşınması, biouyumluluk, hedefleme, doğum ve adsorpsiyon tedavileri gibi alanlarda yüksek kullanım potansiyeline sahip olduğundan, büyük bir ilgi görmektedir. Bunun yanında HexCoil-Ala, tasarım mühendisliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve yüksek derecede organize edilmiş makromolekülleri üretmek ve geliştirmek için de kullanılmaktadır.

Proteinlerin konformasyonel yapılarının çeşitli deneysel tekniklerle ortaya konulabilmesine karşın, bazı yapıların çeşitli nedenlerle deneysel olarak çözülememesi veya bazı çok özel etkileşimlerin deneylerle izlenememesi sebebiyle, moleküler modelleme yöntemleri bu yapıları veya etkileşimleri ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Bu bağlamda moleküler dinamik (MD)

ÖZET (devam ediyor)

simülasyonu protein konformasyonu ve kararlılığının ayrıntılarını anlamak için en çok tercih edilen simülasyon tekniklerinden biridir.

Bu tez çalışmasında, kapalı çözücü içerisinde bulunan HexCoil-Ala zincirlerinin tetramerik bir formunun konformasyonel kararlılığına, hidrofobikliğine ve kendiliğinden toplanma özelliklerine sıcaklığın etkisi, MD simülasyon tekniği ile sistematik olarak incelenmiştir. Elde edilen MD verilerinin analizleri sonucunda, her bir zincirdeki merkezi aminoasitlerin terminal bölgelerindeki aminoasitlere kıyasla yüksek oranda heliks ikincil yapılarına sahip oldukları gözlenmiştir. Bu durumun, terminal bölgelerindeki aminoasitlerin iç bölgelerdekine göre daha fazla suya maruz kalmasıyla ortaya çıktığı düşünülmüştür. Anti-paralel olarak yerleştirilmiş tetramerik HexCoil-Ala zincirleri arasında oluşan Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey mesafeleri kullanarak hesaplanan serbest enerji yüzeylerine bakıldığında, monomerlerin kendiliğinden bir araya gelerek oluşturdukları dördü demet şeklindeki toplanmaların oldukça kararlı olduğu görülmüştür. Bunun yanında çözelti ortamında tetramerik HexCoil-Ala demeti için MD yöntemiyle elde edilmiş bu ortalama ara yüzey mesafe değerlerinin, 350 K sıcaklığa kadar, deneysel kristal yapı için elde edilmiş değerlere çok yakın olduğu da ortaya konmuştur. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, sistemimizin tetramerik demet formunun korunmasında, Leu-Zipper ara yüzeylerindeki E8-R25 aminoasitleri arasında oluşan zincirler-arası “doğrudan tuz köprüsü” nün önemli bir rol oynadığı da açıktır. Sonuç olarak simülasyon sonuçlarımız, tetramerik HexCoil-Ala demeti şeklindeki sistemimizin yüksek termal dayanıklılığa sahip olduğunu ve 400 K sıcaklığa kadar bu tetramerik demet bütünlüğünü ve zincirlerin sahip olduğu ikincil yapı özelliklerini genelde koruduğunu göstermiştir. Deneysel gözlemlerle iyi uyum sergileyen sonuçlarımız, bu tip yapıların araştırılmasında MD simülasyon tekniğinin başarılı ve kullanışlı bir teknik olduğunu teyit etmiştir.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Dinamik, simülasyon, HexCoil-Ala, kendiliğinden toplanma, kararlılık, hidrofobite, protein, peptid, serbest enerji, tuz köprüsü.

Bilim Kodu: 404.01.01.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF TETRAMERIC HEXCOIL-ALA BUNDLE BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION METHOD

Hakan ALICI

**Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Physics**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Kadir DEMİR

January 2018, 121 pages

In cells and living organisms, proteins are responsible for stability, mobility, catalysis, recognition, pathogen clearing, signalling, ordering and shaping. These biological functions of proteins depend on their conformational shapes and folding mechanisms. Recently, there is a growing interest in the design of protein to find out novel functionalities unavailable in nature. Grigoryan et al. designed a de novo peptide, known as HexCoil-Ala. Owing to potential capacity of HexCoil-Ala for drug design, transporting, biocompatibility, targeting, delivery and adsorption treatments in membrane, there has been an increasing interest recently. Further, HexCoil-Ala has a significant influence on design engineering and can also be used for developing highly ordered macromolecular assemblies.

Although conformational structures of proteins can be demonstrated by various experimental techniques, molecular modelling and simulations can be used to reveal these structures or interactions, since some structures cannot be experimentally solved for a variety of reasons, or some very specific interactions cannot be observed with experiments. In this context, molecular

ABSTRACT (continued)

dynamics (MD) simulation is one of the most preferred simulation techniques to understand the details of protein conformation and stability.

In this thesis study, the effect of temperature on conformational stability, hydrophobicity and self-assembly properties of tetrameric HexCoil-Ala in explicit solvent was systematically examined through MD simulations. As a result of these analyses, it was observed that central residues of each monomer have highly helical percentages in comparison with the termini residues. Because, the interaction between termini residues and water molecules has an effect on stability in terminal region of monomers. When free energy landscapes of tetrameric HexCoil-Ala bundle were calculated by using the distance between Leu-Zipper and Ala-Coil interface, it was seen that the self-assembly of monomers were very strong. What's more, the average values obtained from them were very close to the native case up to 350 K. In addition, the inter-chain "direct salt bridge" forming between the residues E8-R25 in Leu-Zipper interfaces of our system plays a significant role for keeping tetramer structure. Finally, our simulation results show that our tetrameric HexCoil-Ala bundle has high thermal robustness and mostly keeps its integrity and secondary structures propensities up to 400 K. Our results are mostly in good agreement with the results of experimental observations, confirm that MD simulation technique is a successful and useful technique in the investigation of such structures.

Keywords: Molecular Dynamics, simulation, HexCoil-Ala, self-assembly, stability, hydrophobicity, protein, peptide, free energy, salt bridge.

Science Code: 404.01.01.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi çalışmaları süresince benden her türlü ilgi, bilgi birikimini teşvik ve hoşgörüsünü esirgemeyen, her zaman açık fikirliliği ve pozitif düşüncelerle beni cesaretlendiren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Kadir DEMİR' e (BEÜ) şükranlarımı sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince göstermiş oldukları her türlü yapıcı ve yönlendirici önerileri ve ilgileri için tez izleme komitesi ve jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. M. Halûk GÜVEN' e (BEÜ) ve Prof. Dr. Fatih YAŞAR' a (HÜ) teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz eşim Arş. Gör. Dr. Eda ALICI' ya ve hiç farkında olmasa da en büyük motivasyon kaynağım olan gözümüzün nuru kızımız Ece'ye desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi, manevi her konuda bana destek olan aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya 2015-22794455-03' nolu Altyapı Projesi ile maddi kaynak sağlayan Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
BÖLÜM 2 PROTEİNLER	5
2.1. GİRİŞ	5
2.2 AMİNOASİTLER.....	6
2.3 PROTEİNLERİN İŞLEV VE FONKSİYONLARI	10
2.4 PROTEİN YAPILARI, PROTEİN YAPILARINDAKİ BAĞLAR VE PROTEİNLERİN KATLANMA MEKANİZMALARI	11
2.5 PROTEİN YAPILARININ BELİRLENMESİ	18
2.6 PROTEİNLERİN KARARLILIĞI VE DENATÜRASYONU	20
2.7 PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ.....	21

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3 MOLEKÜLER MODELLEME VE KUVVET ALANLARI	25
3.1 GİRİŞ	25
3.2 MOLEKÜLER MODELLEME	25
3.3. KUVVET ALANLARI	28
3.4. ÇÖZÜCÜ MODELLERİ	32
BÖLÜM 4 SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ	35
4.1 GİRİŞ	35
4.2 SİMÜLASYON.....	36
4.3 SİMÜLASYON TEKNİKLERİ.....	37
4.3.1 Monte Carlo Yöntemi (MC).....	38
4.3.2 Moleküler Dinamik Yöntemi (MD)	42
4.3.2.1 Moleküler Dinamik Yönteminde İstatistiksel Kümeler	44
4.3.2.2 Moleküler Dinamik Yönteminde İntegrasyon Algoritmaları.....	47
4.3.2.3 Enerji Minimizasyonu	52
4.3.2.3.1 Steepest Descent Algoritması.....	52
4.3.2.3.2 Conjugate Gradient Algoritması	53
4.3.2.3.3 Benzetişimli Tavlama (Simulated Annealing) Algoritması	53
4.3.2.4 Moleküler Dinamikte Sıcaklık ve Basınç Kontrolü	55
4.3.2.4.1 Hız ölçeklendirme metodu	55
4.3.2.4.2 Berendsen sıcaklık çiftlenimi	56
4.3.2.4.3 Andersen sıcaklık çiftlenimi.....	57
4.3.2.4.4 Nose-Hoover sıcaklık çiftlenimi	58
4.3.2.4.5 Berendsen basınç çiftlenimi	59

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.3.2.4.6 Parinello-Rahman basınç çiftlenimi	60
4.3.2.5 Moleküler Dinamik Tekniğinde Sınır Koşulları	60
4.3.2.6 Sınırlandırma Algoritmaları	62
BÖLÜM 5 SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI.....	65
5.1 GİRİŞ	65
5.2 MD SİMÜLASYONLARI.....	68
5.2.1 Metot	68
5.2.2 Simülasyon Detayları	69
5.2.3 Sonuç ve Analizler	71
BÖLÜM 6 SONUÇ.....	107
KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ	121



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Standart bir aminoasidin şematik yapısı.	6
Şekil 2.2 Aminoasitlerin zwitterion durumuna dönüşümü.....	8
Şekil 2.3 Standart aminoasitlerin sınıflandırılması ve sahip oldukları radikal grupları.	9
Şekil 2.4 Peptid bağının oluşumu.....	12
Şekil 2.5 Peptid bağlarının dönüş açıları.....	13
Şekil 2.6 Bir polipeptid zincirinin üçüncül yapısında bulunan bağlar.	15
Şekil 2.7 Protein yapılarının şematik gösterimi.	17
Şekil 3.1 Potansiyel enerji fonksiyonunda terimlere karşılık gelen etkileşimler.	29
Şekil 3.2 Lennard-Jones potansiyeli.....	31
Şekil 4.1 MC simülasyonda atomların konumlarının değiştirilerek yeni konfigürasyonların elde edilmesinin şematik gösterimi.	39
Şekil 4.2 MC yönteminin akış şeması.	41
Şekil 4.3 Periyodik sınır koşullarının uygulanması.	61
Şekil 5.1 Tetramerik HexCoil-Ala' nın sarılmış-sarmal motifi ve Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyleri.	67
Şekil 5.2 HexCoil Ala' nın anti-paralel a) dimerik birim (3SOR)' nin ve b) tetramerik formunun yandan ve üstten görünüşü.....	68
Şekil 5.3 RMSD değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.....	72
Şekil 5.4 MD simülasyonları boyunca 300 K sıcaklıktaki DSSP analizi.....	75
Şekil 5.5 MD simülasyonları boyunca 315 K sıcaklıktaki DSSP analizi.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.6 MD simülasyonları boyunca 335 K sıcaklıktaki DSSP analizi.....	77
Şekil 5.7 MD simülasyonları boyunca 350 K sıcaklıktaki DSSP analizi.....	78
Şekil 5.8 MD simülasyonları boyunca 400 K sıcaklıktaki DSSP analizi.....	79
Şekil 5.9 MD simülasyonları boyunca 500 K sıcaklıktaki DSSP analizi.....	80
Şekil 5.10 300 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.	82
Şekil 5.11 315 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.	82
Şekil 5.12 335 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.	83
Şekil 5.13 350 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.	83
Şekil 5.14 400 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.	84
Şekil 5.15 500 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.	84
Şekil 5.16 MD simülasyonları boyunca R_g değerlerindeki değişimler.	85
Şekil 5.17 MD simülasyonları boyunca kontak halindeki atomların sayısı.	87
Şekil 5.18 Farklı sıcaklıklarda tetramerik sistemin en çok rastlanan yapılarının a) üstten görünüşü b) yandan görünüşü c) 500 K daki her zincir için konfigürasyonu.	89
Şekil 5.19 HexCoil Ala'nın Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyleri.	91
Şekil 5.20 300 K'de tetramerik HexCoil-Ala'nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.21 315 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.	94
Şekil 5.22 335 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.	95
Şekil 5.23 350 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.	95
Şekil 5.24 400 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.	96
Şekil 5.25 HexCoil-Ala’nın her bir aminoasitininin ilgilenilen sıcaklıklar için simülasyonlar boyunca RMSF değerlerinin ortama değişimleri.	98
Şekil 5.26 HexCoil-Ala’nın her bir aminoasitininin ilgilenilen sıcaklıklar için simülasyonlar boyunca SASA değerlerinin ortama değişimleri.	99
Şekil 5.27 HexCoil-Ala’nın tetramer formunun bazı sıcaklıklar için içerindeki su moleküllerinin sayısının simülasyonlar boyunca değişimi.	100
Şekil 5.28 Tetramerin içerisndeki su moleküllerinin bazı sıcaklıklar için üstten ve yandan görsel temsilleri.	101
Şekil 5.29 Tetramerik HexCoil-Ala’nın a)Ana zincir atomlarının ve b) Yan zincir atomlarının kendi aralarında yaptığı hidrojen bağ sayısı.	102
Şekil 5.30 Tetramerik HexCoil-Ala’ nın A ve B zincirleri arasındaki tuz köprüsü etkileşimlerinin görsel temsili.	103
Şekil 5.31 E15-K16 aminoasitleri arasındaki ortalama zincir-içi tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.....	105

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.32 E2-K29 aminoasitleri arasındaki ortalama zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.....	105
Şekil 5.33 E4-R25 aminoasitleri arasındaki ortalama zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.....	106
Şekil 5.34 E8-R25 aminoasitleri arasındaki ortalama zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.....	106



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Aminoasitlerin kısaltmaları.....	7
Çizelge 5.1 HexCoil-Ala' nın aminoasit diziliminin tek harfli kodlaması ve yedili tekrarları.	66
Çizelge 5.1. İkincil yapı içeriklerinin ortalama popülasyonları.	73
Çizelge 5.2 Tetramerik yapının her bir zincirinin ortalama uçtan uca uzunlukları.....	87
Çizelge 5.3 Tetramerik HexCoil-Ala demeti için elde edilen ortalama değerlerin özeti.	90
Çizelge 5.4 HexCoil Ala nın çok zincirli farklı yapıları için Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyler arası uzaklıklar.....	92



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

K : Kelvin derece

A° : Angström

nm : Nanometre

ns : Nanosaniye

R_g : Jirasyon yarıçapı

KISALTMALAR

MC : Monte carlo

MD : Moleküler dinamik

MM : Moleküler mekanik

QM : Kuantum mekaniksel

EM : Enerji minimizasyonu

SA : Benzetişimli tavlama

DNA : Deoksiribo nükleik asit

RNA : Ribo nükleik asit

PDB : Protein veri bankası

SCOP : Proteinlerin yapısal sınıflandırılması veri bankası

CD : Dairesel dikroizm spektroskopisi

NMR : Nükleer manyetik rezonans

UV : Ultraviyole

DSC : Diferansiyel tarama kalorimetresi

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

BOES : Born-Oppenheimer enerji yüzeyleri

DFT : Yoğunluk fonksiyonları teorisi

DSC : Diferansiyel tarama kalorimetresi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

AUC : Analitik ultrasantrifügasyon

SWCNT: Tek duvarlı karbon nanotüp

RMSD : Kare ortalama karekök yer değiştirme

RMSF : Kare ortalama karekök dalgalanma

SASA : Çözeltiye maruz kalan yüzey alanı



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tüm canlı organizmalarda dört temel makro molekül bulunmaktadır. Bunlardan biri olan proteinler, canlı yaşamı için birçok hayati aktiviteden sorumludurlar. Genetik bilimindeki hızlı gelişmelere paralel olarak, proteinlerin yapı ve aktivitelerinin incelenmesi de günümüzde oldukça ilgi çeken bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bilindiği üzere proteinler aminoasitlerin zincirler halinde uç uca eklenmesiyle oluşan biyolojik polimerlerdir. Bu biyolojik polimerler özellikle hücreler ve canlı organizmalarda kararlılık, hareket, kataliz, tanıma, patojen temizleme, depolama ve bilgi alış verişi gibi birçok biyolojik aktiviteden sorumludurlar. Proteinlerin bu biyolojik fonksiyon ve aktiviteleri, her birinin sahip olduğu kendine has konformasyonel (kararlı üç boyutlu) yapılarına ve katlanma mekanizmalarına bağlıdır. Proteinler organizma ve hücre içerisinde genellikle statik olarak kalmayıp dinamik haldedirler ve bahsedilen fonksiyon ve işlevlerini yerine getirmek için konformasyon değişikliklerine gidebilirler. Bu konformasyonel değişim esnasında proteinlerin yanlış katlanması veya topaklanması söz konusu olabilir. Bu durum, başta Alzheimer ve Parkinson hastalıkları olmak üzere birçok hastalığın meydana gelmesine neden olmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı proteinlerin kararlı üç boyutlu yapılarının ve termodinamiksel davranışlarının anlaşılması özellikle sağlık ve ilaç endüstrisi alanlarında çok önemli gelişmeler sağlamaktadır.

Biyolojik yapıların gelişen teknoloji ile birlikte endüstriyel alanlarda da kullanılmaya başlanması, bu yapıların bilgisayar yazılım ve yöntemleri kullanılarak tasarlanıp sentetik olarak üretilmesini de gerektirmiştir. Bir proteinin bilgisayar yazılımları ile tasarlanması aşamasında, konformasyonel yapısı ve aminoasit dizilimi iki şekilde belirlenebilmektedir. Ya doğada önceden var olan bir yapıya modifikasyon yapılmakta (mutasyon) ya da de novo tasarım denilen bir yöntemle yapının aminoasitleri, sıfırdan istenilen amaç ve işleve uygun seçilerek tasarım gerçekleştirilmektedir. Bilgisayar esaslı bu tasarımlarda, biyolojik fonksiyon ve işlevlerin

kolaylıkla manipüle edilebilmesi sayesinde, konformasyonel kararlılık, iyi katlanmış ikincil yapılar ve topaklanma gibi özellikler bakımından doğal proteinlere göre daha avantajlı sentetik proteinler elde edilebilmektedir. Tüm bu özelliklerinden dolayı son yıllarda biyoteknoloji, nanometaryaller ve ilaç keşiflerinde sentetik yapıların kullanıldığı önemli uygulamalar olmuştur (Correia et al. 2010; King et al. 2012; Miklos et al. 2012; Pirogova and Istivan 2013; Siegel et al. 2010; Sievers et al. 2011). Ayrıca sentetik proteinlere bu özelliklerin kazandırılması onlara yüksek termal ve kimyasal dayanıklılık sağlamaktadır.

Proteinler, üç boyutlu yapısını kontrol eden zayıf etkileşimlerin doğası nedeniyle çok hassas moleküllerdir. Bir proteinin doğal hali proteinin en kararlı konformasyonu olarak tanımlanır. Bu doğal hal sıcaklık, pH, hidrofobik yüzeylerin varlığı, metal iyonlarının varlığı, organik çözücüler, deterjanlar ve mekanik karıştırma gibi faktörlerle bozulabilir. Bu faktörlere bağlı olarak proteinin ikincil, üçüncül veya dördüncül yapılarında ortaya çıkan değişimlere, proteinin denatürasyonu denilmektedir. Denatürasyon ile bir protein doğal yapısından farklı, rastgele veya yanlış katlanmış başka bir forma dönüşerek sahip olduğu doğal biyolojik etkinliğini kaybedebilmektedir. Bundan dolayı, doğal ya da sentetik proteinlerin kararlı üç boyutlu yapılarının ve termodinamik özelliklerinin belirlenmesi, hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi, tedavi süreçlerinde yararlı olabilecek ilaçların tasarlanması, gıda güvenliği ve teknolojisi, endüstriyel ve nanoteknolojik malzeme üretimi gibi disiplinler arası çalışmalarda çok önemli bir yer tutmaktadır.

Proteinlerin, termodinamik özellikleri ve kararlı yapılarının belirlenmesinde, öncelikle X-ışınları, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Dairesel Dikroizm spektroskopisi (CD) gibi deneysel yöntemlere başvurulur. Ancak bu spektral yöntemlerin çalışma prensipleri sebebiyle, uygulamada karşılaşılan bazı zorluklar vardır. Örneğin, bir proteinin dinamik davranışının incelenmesinde ya da katlanma mekanizmasının anlaşılmasında yeterli bilgi bu deneysel yöntemlerden elde edilemeyebilir veya sentezlenen herhangi bir proteinin kristalleştirilememesi ya da yaşam ömrünün kısa olması sebebiyle bu deneysel yöntemler kullanılamayabilir. Bunun yanında çözelti, pH ve sıcaklık gibi farklı parametrelerin protein yapılarına etkileri deneysel yöntemlerdeki uygulama kısıtlılıkları sebebiyle incelenemeyebilir. Unutulmamalıdır ki; deneysel anlamda farklı gözlem teknikleri ile çoğu proteinin sahip olduğu aminoasit dizilimi elde edilmiş olsa bile, henüz bunların üç boyutlu yapıları ve biyolojik

etkinlikleri tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu sebeplerden ötürü, bu türden sistemlerin anlaşılması için kuramsal yöntemlere de başvurulması kaçınılmazdır. Ancak, protein yapılarının oldukça yüksek esnekliğe sahip olması, kuramsal hesaplamalarda anormal sayıda serbestlik derecesi içermesine neden olmaktadır. Bundan dolayı bu tür sistemlerin kuramsal açıdan anlaşılması ve çözümlenmesi oldukça zordur. Yeni matematiksel yaklaşım ve metotlarla bu sistemler kuramsal açıdan izah edilmeye çalışılsa da, günümüzde en önemli bilgilerin simülasyon çalışmaları ile elde edileceği bilinmektedir (Hansmann and Okamoto 1993; Hao and Scheraga 1994). Bu nedendir ki son otuz yıldır proteinlerin düşük enerjili konformasyonları simülasyon teknikleri ile örneklenmeye çalışılmaktadır (Baysal and Meirovitch 1999; Meirovitch and Meirovitch 1997).

Fiziksel bir sistemin bilgisayar ortamındaki simülasyonu, onun en basit modelidir. Simülasyon çalışmalarında bir sistemin modeli kurulurken karşılaşılan en büyük problem, sistemin termodinamik özelliklerini ve çok hızlı oluşabilen atomik etkileşimleri tam doğrulukla karşılayan uygun bir potansiyel enerji fonksiyonunun ya da kuvvet alanının (force field) belirlenmesidir. Literatürde, proteinlerin termodinamik yapılarını, katlanma özelliklerini ve kararlılıklarını araştırmak için geliştirilmiş birçok kuvvet alanı olmakla birlikte, en çok bilinen ve kullanılanları AMBER (Cornell et al. 1995), CHARMM (MacKerell et al. 1998), GROMOS (van Gunsteren et al. 1996) ve ECEPP (Sippl et al. 1984) olarak adlandırılan kuvvet alanlarıdır.

Bu kuvvet alanlarını tanımlayan fonksiyonlardaki parametreler, küçük moleküllerin deneysel verilerinden ve kuantum kimyasal hesaplamaların uyumundan elde edilmişlerdir. Ancak proteinlerin biyolojik olarak aktif oldukları doğal ortamlarındaki kararlılık, katlanma ve termodinamik özelliklerinin anlaşılabilmesinin yolu, bu proteinlerin doğal ortamlarının mümkün olduğunca gerçekçi ve olası tüm fiziksel etkileşmelerin göz önüne alınarak betimlenebilmesine bağlıdır. Proteinler fizyolojik ortamlarda genellikle çözelti içerisinde olduklarından dolayı, çözeltinin etkisi dikkate alınması gereken diğer bir husustur. Bundan dolayı bir protein sisteminin toplam enerjisi, proteinin konformasyonel enerjisine ek olarak çözelti etkisinden oluşmaktadır.

Bu tez çalışmasında, literatürde hesaplamalı tasarım kullanılarak dizayn edilmiş bir de novo peptid olan Hex-Coil Ala' nın, anti-paralel şekilde karşılıklı olarak sıralanmış tetramerik (dört zincirli) formunun konformasyonel kararlılığının Moleküler Dinamik (MD) simülasyon yöntemiyle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tezin ikinci bölümünde, kuramsal temeller başlığı altında öncelikle proteinlerin yapı ve işlevleri hakkında genel bilgiler verilerek protein yapı tayininde kullanılan başlıca deneysel yöntemlerden bahsedilmiştir. Daha sonra ise bir proteinin kararlılığını etkileyen ve dentürasyonuna sebep olan faktörler anlatılmıştır. En son ise protein mühendisliğinin tarihsel gelişimi ve tekniklerinden bahsedilmiştir. Üçüncü bölümde ise moleküler modelleme ve kuvvet alanları başlığı altında, moleküler modellemenin biyomoleküllerin yapılarının anlaşılmasındaki yeri ve önemi üzerinde durulmuştur. Bunun yanı sıra aynı bölümde, moleküler modellemede kullanılan etkileşim terimleri ve kuvvet alanları açıklanmış ve son olarak molekül-çözelti etkileşiminin önemi sebebiyle modellemede kullanılan su modellerinden bahsedilmiştir. Dördüncü bölümde, simülasyon kavramı ve simülasyon tekniklerinden söz edilmiş olup bu simülasyon tekniklerinin birbirlerine göre farklılıkları ortaya konulmuştur. Ayrıca, bu bölümde MD tekniğinin temellerini oluşturan istatistik fizikteki küme kavramları, kullanılan integrasyon algoritmaları, sıcaklık ve basınç kontrol algoritmaları, moleküler dinamikte sınır koşulları ve bazı sınırlandırma algoritmaları gibi konulara değinilmiştir. Beşinci bölümde, bu tez çalışmasında elde edilen MD simülasyon sonuçları verilerek tetramerik yapının kararlılığını belirleyen etkileşimler ve bu kararlılığa sıcaklığın etkisi ortaya konulmuş ve sonuçlar literatürdeki deneysel ve simülasyon sonuçları ile kıyaslanmıştır. Son bölümde ise elde edilen MD simülasyon sonuçları değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 2

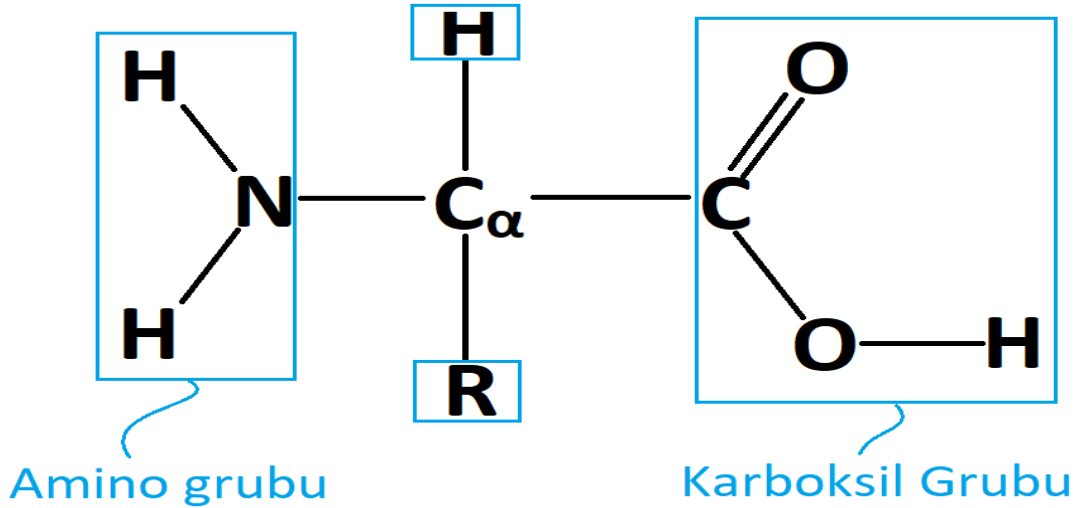
PROTEİNLER

2.1. GİRİŞ

Canlıların işlevlerini yerine getirmelerinde oldukça büyük öneme sahip olan biyomoleküllerin genel yapısında en sık rastlanan atomlar karbon, hidrojen, azot ve oksijendir. Söz konusu bu atomları diğerlerinden ayıran en temel özellik ise kolayca etkileşime girebiliyor olmalarıdır. Kalıcı niteliği de bulunan bu etkileşimler sonucunda biyomoleküller meydana gelmektedir. Özellikle karbon, azot ve oksijen atomları, kalıcılığı daha da rijit kılan çift kovalent bağ kurma özelliğine sahiptirler. Bunlardan karbon atomları birbirleri ile uzun zincirler oluşturacak şekilde değişik açılarda birleşme gerçekleştirerek, biyomoleküller için alternatif iskelet yapıları oluşturabilirler. Biyomoleküllerin iskeletini oluşturan karbon bileşiklerinin farklı boş durumdaki pozisyonlarına hidrojen, oksijen ve sülfür atomları bağlanabilir ve bu sayede çok çeşitli alternatifleri bulunan biyomoleküler oluşumlar sağlanabilir. Karbon atomlarının oluşturduğu iskelet yapılar, canlıları oluşturan hücrenin temel öğelerini oluştururlar ki böylesi yapılar makromoleküller olarak adlandırılırlar. Makromoleküller hücreyi oluşturan en temel kalıcı öğelerdir ve nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar ve proteinler olarak dört temel yapıda gruplandırılırlar. Bunlardan nükleik asitler, hücreye ait genetik bilgilerin bir sonraki nesle aktarılmasından sorumludurlar. Karbonhidratlar ve lipitler ise canlı sistemin işlevliğinin sağlanmasında, gereken yer ve zamanlarda enerji üretme görevini üstlenmişlerdir. Bunların yanı sıra hücredeki en yüksek ikinci kütleyi oluşturan proteinler hücrenin işlevliğinde çok önemli görev yaparlar. Diğer yandan, makromolekülleri oluşturan küçük birimlerin çeşitliliği arttıkça makromoleküllerin zenginliğinin ve özgünlüğünün de arttığı bilinmektedir. Bu açıdan en özgün makromolekül olan proteinler, doğada bilinen 20'den fazla standart aminoasitlerin farklı kombinasyon dizilimleri ile oluşmaktadır.

2.2 AMİNOASİTLER

Aminoasitler, proteinleri oluşturan temel yapı taşlarıdır. Bir aminoasitin yapısı Şekil 2.1’ de görüldüğü gibi merkezi karbon (C_{α}) atomuna bağlı dört gruptan oluşmaktadır. Bu gruplardan karboksil grubu (-COOH), amino grubu (-NH₂) ve (-H) atomu tüm aminoasitler için ortak gruplar iken, radikal grup (-R) ya da yan zincir grubu isminden de anlaşılacağı gibi her bir aminoasitin kendisine özgüdür. Her bir aminoasite kendine has özellik kazandıran bu radikal gruplar, aminoasitlerin birbirlerinden farklılaşmasına ve türlere ayrılmasını neden olur. Doğada 300’e yakın farklı aminoasit bulunmaktadır. Ancak DNA tarafından kodlanan ve proteinlerin yapısına katılan sadece 20 temel aminoasit bulunur. Proteinlerin yapısında bulunan bu 20 temel aminoasit standart aminoasitler olarak bilinirler. Bunlar kolaylık olması açısından tek harfli semboller veya üç harfli kısaltmalarla gösterilirler. Çizelge 2.1’ de bu gösterimlerin tümü sunulmuştur.



Şekil 2.1 Standart bir aminoasidin şematik yapısı.

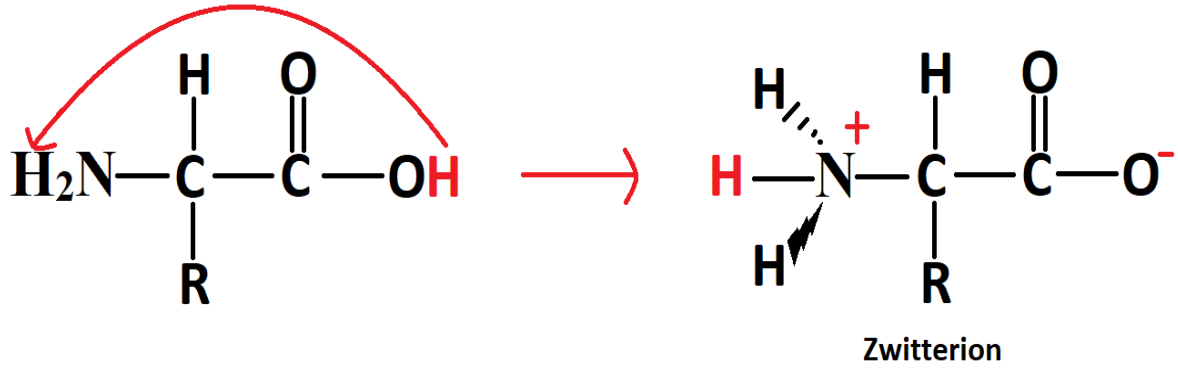
Aminoasitler sahip oldukları amino (bazik) ve karboksil (asittik) gruplarından dolayı amfoterik yani hem asidik hem de bazik karakter taşımaktadırlar. Bundan dolayı, ortamın pH değerine göre aminoasitler iyonik yapıda bulunabilirler. Nötral pH değerlerinde, aminoasitler çift iyon durumunda bulunur. Zwitterion olarak da adlandırılan bu tam iyonlaşmış durumda; aminoasitin amino grubu karboksil grubunun asidik hidrojen atomunu alıp artı yüklü duruma geçerken,

karboksil grubu da eksi yüklü halde bulunur. Aminoasitlerin tam iyonlaşmış duruma geçişi Şekil 2.2' de şematik olarak gösterilmiştir. Aminoasitler nötral sulu çözeltilerden zwitterion durumunda kristalize edilebilir. Ayrıca aminoasitler canlı organizmalarda çözelti ortamında buldukları için genellikle fizyolojik ortamda da zwitterion durumundadırlar. Bir aminoasit, kendisi için karakteristik olan izoelektrik nokta değerine eşit pH ortamında net elektrik yükü taşımaz. Aminoasitler, izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında bazik anyon şeklinde yani aminoasitin karboksil grubu eksi yüklü halde bulunurken, izoelektrik nokta değerinden düşük pH ortamında asidik katyon şeklinde, bir başka deyişle amino grubu artı yüklü halde bulunur.

Çizelge 2.1 Aminoasitlerin kısaltmaları.

Aminoasit	Kısaltma		Aminoasit	Kısaltma	
	3 Harfli	1 Harfli		3 Harfli	1 Harfli
<i>Alanin</i>	<i>Ala</i>	<i>A</i>	<i>Lisin</i>	<i>Lys</i>	<i>K</i>
<i>Arginin</i>	<i>Arg</i>	<i>R</i>	<i>Lösin</i>	<i>Leu</i>	<i>L</i>
<i>Asparjin</i>	<i>Asn</i>	<i>N</i>	<i>Metiyonin</i>	<i>Met</i>	<i>M</i>
<i>Aspartik asit</i>	<i>Asp</i>	<i>D</i>	<i>Fenilalanin</i>	<i>Phe</i>	<i>F</i>
<i>Cistin</i>	<i>Cys</i>	<i>C</i>	<i>Prolin</i>	<i>Pro</i>	<i>P</i>
<i>Glutamik asit</i>	<i>Glu</i>	<i>E</i>	<i>Serin</i>	<i>Ser</i>	<i>S</i>
<i>Glutamin</i>	<i>Gln</i>	<i>Q</i>	<i>Tironin</i>	<i>Thr</i>	<i>T</i>
<i>Glisin</i>	<i>Gly</i>	<i>G</i>	<i>Triptofan</i>	<i>Trp</i>	<i>W</i>
<i>Histidin</i>	<i>His</i>	<i>H</i>	<i>Tayrosin</i>	<i>Tyr</i>	<i>Y</i>
<i>İzolösin</i>	<i>Ile</i>	<i>I</i>	<i>Valin</i>	<i>Val</i>	<i>V</i>

Aminoasitlerin türlerini ve niteliklerini belirleyen radikal gruplar, diğer aminoasitlerin radikal grupları ile etkileşerek, hidrofobik bölgeler, elektrostatik bağlar, hidrojen bağları veya disülfid bağları meydana gelebilmektedir. Bundan dolayı aminoasitlerin türleri ve protein zincirindeki diziliş sıraları, proteinin üç boyutlu yapısının ve üstlendiği biyolojik fonksiyonların temelini oluşturmaktadırlar.



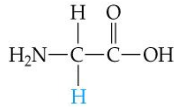
Şekil 2.2 Aminoasitlerin zwitterion durumuna dönüşümü.

Aminoasitler, sahip oldukları radikal grupların polaritesi veya çözelti ile etkileşme eğilimlerine göre, polar, hidrofobik ve yüklü aminoasitler olarak sınıflandırılabilir (Scheeff and Fink 2005). Doğada bulunan 20 adet standart aminoasitin bu özelliklerine göre sınıflandırılması ve kimyasal gösterimleri Şekil 2.3' de bir arada verilmiştir.

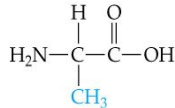
Hidrofobik aminoasitlerin radikal gruplarında genellikle azot ve oksijen bulunmazken çoğunlukla proteinin iç kısmında çözeltiyle etkileşimin en az olduğu kısımlarında bulunurlar. Glisin, alanin, valin, prolin, metiyonin, lösin, izolösin, fenilalanin ve triptofan hidrofobik aminoasitler grubundadırlar. Hidrofobik gruptaki aminoasitlerden prolin, fenilalanin ve triptofan gruptaki diğerlerinden farklı olarak halkalı radikal gruplara sahiptirler. Bu grupta bulunan yaygın aminoasitlerden biri olan glisinin radikal grubu sadece hidrojenidir ve çoğu zaman proteinlerin iç yüzeyindeki, döngü veya sarım bölgelerinde bulunur ve bu bölgelerde polipeptid zincirine yüksek esneklik sağlar.

Bir protein yapısında bulunan hidrofobik aminoasitler, genellikle molekülün iç bölgelerinde bulunurken, çözelti ile hidrojen bağları oluşturma kabiliyetine sahip olan polar ve yüklü aminoasitler ise protein molekülünün dış bölgelerinde bulunmayı tercih ederek, molekülün yüzeylerini kaplarlar. Oldukça reaktif olan bu polar ve yüklü aminoasit grubunda serin, tironin asparjin, cistin, glutamin, tayrosin ve histidin bulunmaktadır.

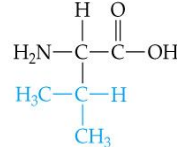
Hidrofobik



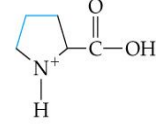
Glisin (Gly)



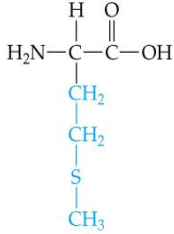
Alanin (Ala)



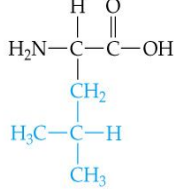
Valin (Val)



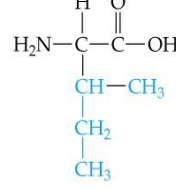
Prolin (Pro)



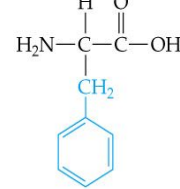
Metiyonin (Met)



Lösin (Leu)

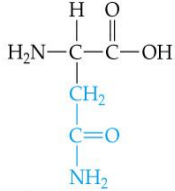


İzolösin (Ile)

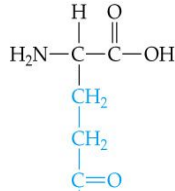


Fenilalanin (Phe)

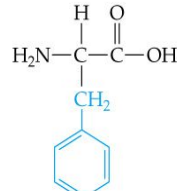
Polar



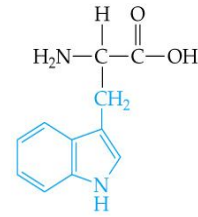
Asparjin (Asn)



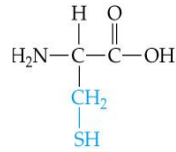
Glutamin (Gln)



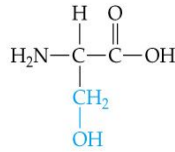
Tayrosin (Tyr)



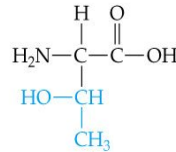
Triptofan (Trp)



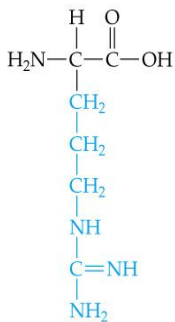
Cistin (Cys)



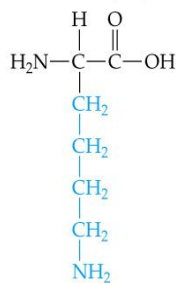
Serin (Ser)



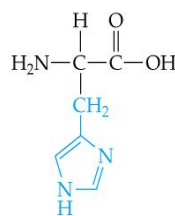
Tironin (Thr)



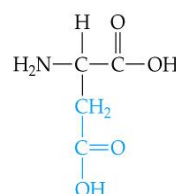
Arginin (Arg)



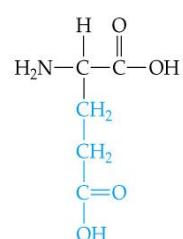
Lisin (Lys)



Histidin (His)



Aspartik asit (Asp)



Glutamik asit (Glu)

Yüklü (+)

Yüklü (-)

Şekil 2.3 Standart aminoasitlerin sınıflandırılması ve sahip oldukları radikal grupları.

Pozitif ve negatif yüklü aminoasitler genellikle tuz köprüsü etkileşimleri oluştururlar. Bu etkileşimler, proteinin üç boyutlu yapısının kararlılığında önemli bir etkileşim türüdür. Örneğin yüksek sıcaklıklarda (80-90 °C ve daha da yüksek sıcaklık) yaşayan organizmalardaki proteinler genellikle geniş bir tuz köprüsü ağına sahiptirler. Bu etkileşimler, proteinlerin termal kararlılığına katkıda bulunarak, yüksek sıcaklıklardaki denatürasyonunu önlerler.

2.3 PROTEİNLERİN İŞLEV VE FONKSİYONLARI

Makromoleküller arasında çok önemli bir yere sahip olan proteinler canlı yaşamında çok önemli işlevler yürütmektedir. Proteinlerin bazıları hücrenin oluşumunda bir yapıtaşı olarak işlev görürken, bazıları ise özgün üç boyutlu yapısı sayesinde molekülleri tanıma, onlarla etkileşerek hücredeki olaylara yön verme yeteneğine sahiptirler. Kısacası yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır. Proteinler yaşamsal fonksiyonlarda aldıkları role göre 7 gruba ayrılabilirler. Bunlar; antikorlar, kontraktil, enzimler, hormonal, yapısal, depolama ve transport proteinlerdir

Antikorlar: vücudu antijenlerden (yabancı işgalciler) korumakla görevli uzmanlaşmış proteinlerdir. Kan yoluyla dolaşabilirler ve bakteri, virüs ve diğer yabancı davetsiz misafirleri tanımlamak ve savunmak için bağışıklık sistemi tarafından kullanılırlar. Antikorlar, antijenleri beyaz kan hücreleri tarafından tahrip edilebilecek şekilde hareketsiz hale getirerek vücudu korurlar.

Kontraktil Proteinler: mekanik hareketten sorumlu olan proteinlerdir. Örnek olarak, aktin ve miyozin proteinleri verilebilir. Bu proteinler kasın kasılması ve hareketi ile ilgilidirler.

Enzimler: biyokimyasal reaksiyonları kolaylaştıran proteinlerdir. Kimyasal reaksiyonları hızlandırdıklarından dolayı çoğu zaman katalizör olarak adlandırılırlar. Laktaz ve pepsin enzimleri bu proteinlere örnek olarak verilebilir. Laktaz sütte bulunan şeker laktozunu parçalamaktadır. Pepsin ise midede gıda maddelerindeki proteinleri parçalamak için çalışan bir sindirim enzimidir.

Hormonal Proteinler: vücut faaliyetlerini koordine etmeye yardımcı olan haberci proteinlerdir. Örnekler arasında İnsülin, oksitosin ve somatotropin bulunur. İnsülin, kan şekeri konsantrasyonunu kontrol ederek glikoz metabolizmasını düzenler. Oksitosin doğum sırasında kadınlarda kasılmaları uyarır. Somatotropin ise kas hücrelerinde protein üretimini uyararak büyüme hormonudur.

Yapısal Proteinler: lifli yapıdaki destek verici proteinlerdir. Örnek olarak keratin, kollajen ve elastin proteinleri verilebilir. Keratinler cilt, saç, tüyler, boynuzlar ve gagalar gibi koruyucu kaplamaları güçlendirirler. Kollajenler ve elastinler ise tendonlar ve bağ dokuları için destek sağlarlar.

Depolama Proteinleri: organizmaların korunması ve büyütülmesi için harekete geçirilebilen ve metal iyonları ve aminoasit rezervleri olarak kullanılabilen proteinlerdir. Örnekler arasında kazein, ovalbümin, ferritin bulunur. Ovalbümin yumurta beyazının ve kazein ise sütün ana proteinleridir. Diğer yandan ferritin karaciğerde demirin depolanmasını sağlayan bir proteindir.

Transport Proteinleri: molekülleri vücudun bir yerinden diğerine taşıyan proteinlerdir. Örneğin, Hemoglobin kırmızı kan hücreleri yoluyla oksijeni taşır.

2.4 PROTEİN YAPILARI, PROTEİN YAPILARINDAKİ BAĞLAR VE PROTEİNLERİN KATLANMA MEKANİZMALARI

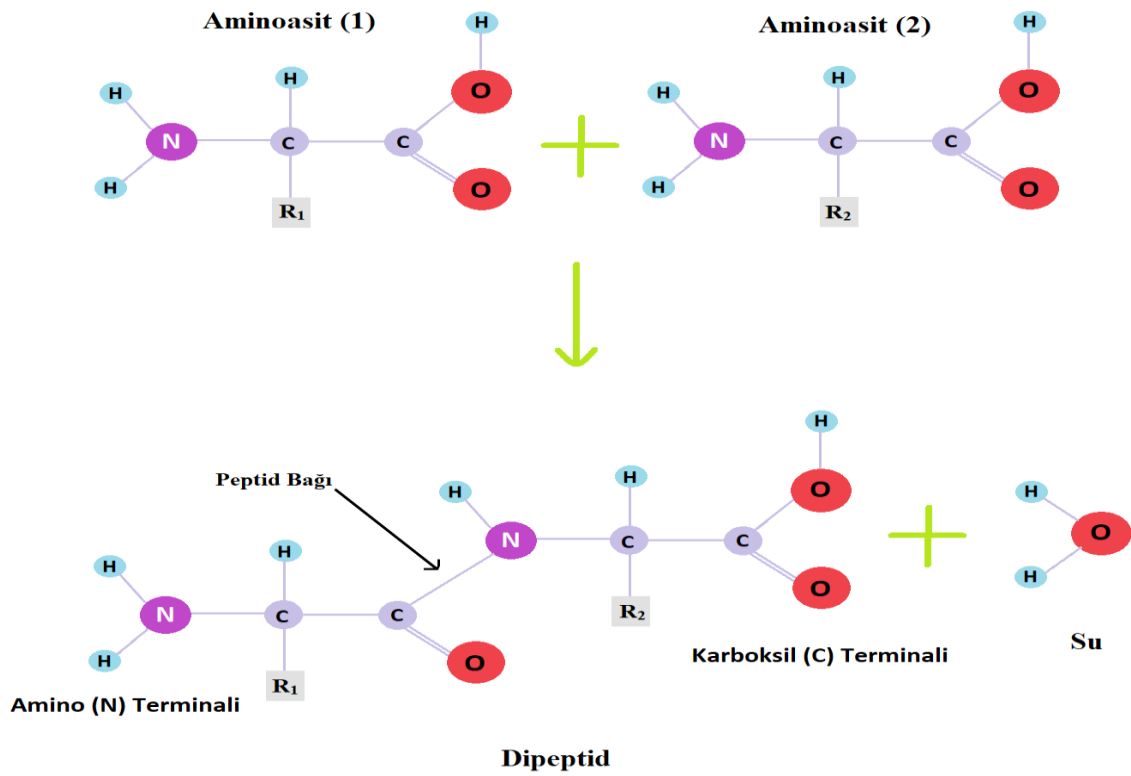
Proteinler canlı hücreler içerisinde çok sayıda görevi olan biyomoleküllerdir. Proteinlerdeki bu görev çeşitliliğinin sebebi ise; birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) yapı olarak tanımlanan dört hiyerarşik yapısal organizasyona sahip olmalarıdır (Onat vd. 2002). Tek bir protein molekülü bu protein yapı tiplerinden birini veya daha fazlasını içerebilir.

Birincil Yapılar:

Bir proteinin birincil yapısı, polipeptid zinciri boyunca aminoasitlerin peptid bağlarıyla birleşerek oluşturdukları dizilimleridir. Birincil yapı genetik olarak kontrol edilmekte olan tek yapı olup, bir proteinin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarını belirlemektedir (Onat vd. 2002)

Aminoasitlerin peptid bağı denilen kovalent bağlarla uç uca birleşerek oluşturdukları kısa polimer zincirlerine peptid denilirken uzun polimer zincirlerine polipeptid veya protein denilmektedir. Peptid bağlarıyla iki aminoasit birleşirse dipeptid, üç aminoasit birleşirse tripeptid oluşur. On beş aminoasite kadar oluşan peptidlere oligopeptid denir. Daha büyük zincirler için ise polipeptid ifadesi kullanılır. Protein ve polipeptid ifadeleri birbirleri yerine kullanılabilirse de genelde polipeptidler 100 den az aminoasit içerirler.

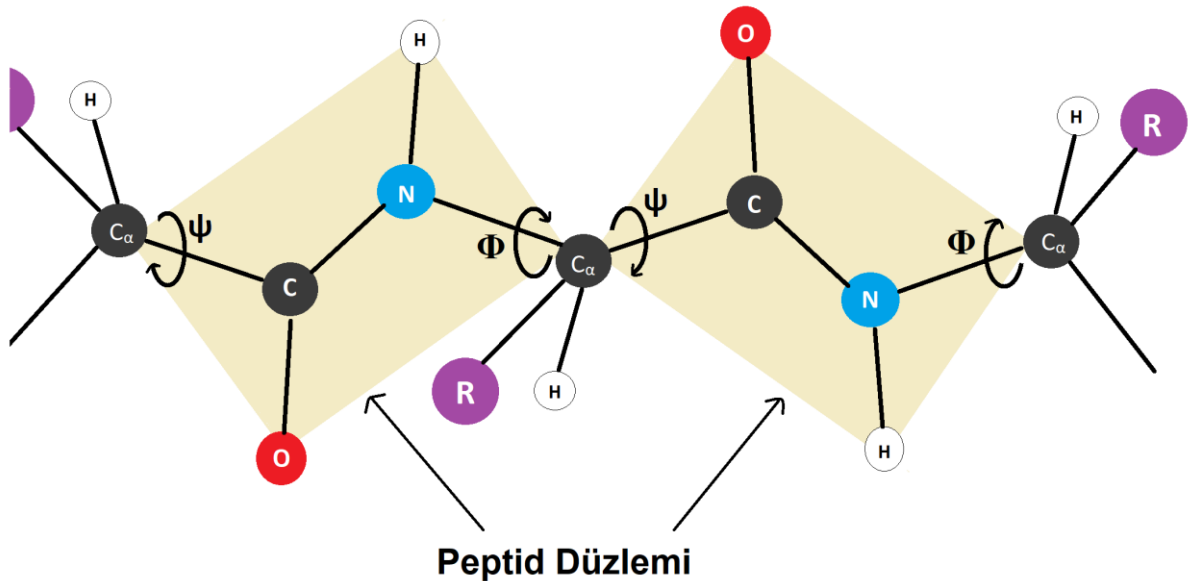
Peptid bağı, bir aminoasitin merkezi karbon atomuna bağlı karboksil grubu ile diğer aminoasitin amino grubunun birbirine bağlanması ile oluşur ve bu süreçte bir adet su molekülü açığa çıkar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Peptid bağının oluşumu.

Proteinler, aminoasitlerin çizgisel sıralanmış dizilimleridir. Tipik bir protein oluşturmak için zincirde 300 aminoasit kullanılmaktadır ve bu aminoasitler 20^{300} farklı olasılıkla dizilebilmektedir. Tüm aminoasitlerin radikal grupları birbirinden farklı olduğunda, aminoasitler büyüklük, şekil, yük, hidrofobite, kimyasal reaktivite ve hidrojen bağlanma kapasitesi açısından her biri diğerlerinden ayrılır. Radikal grupların bu farklı kimyasal özellikleri, proteinlerin üç boyutlu yapısını belirler ve dolayısıyla protein işlevine etki eder. Protein zincirine dahil olmuş $[-N-C_{\alpha}-C-]$ şeklinde kendini tekrarlayan birime "ana zincir" ya da "protein omurgası" denir. Her bir aminoasitin kimyasal yapısı nedeniyle, peptid ya da protein zincirinin bir yönü vardır. Proteinin serbest bir karboksil grubuna sahip olan ucu, "karboksil ucu" (C ucu) ya da "karboksil terminali" (C terminali) serbest bir amino grubu olan ucu ise "amino ucu" (N ucu) ya da "amino terminali" (N terminali) olarak adlandırılır.

Ayrıca, proteinlerde bulunan atomik gruplar bir bağ etrafında dönebilirler. Peptid bağındaki mezomeri veya rezonans nedeniyle C-N bağı %50 çift bağ niteliği kazanmıştır. Çift bağ özelliğinden dolayı, peptid bağı oluşumuna katılan grupların atomları (C, O, N ve H) aynı düzlem üzerinde bulunurlar ve bu durum bağ eksenini etrafındaki dönüşleri (ω açıları) sınırlandırır. Ancak Şekil 2.5' de gösterildiği gibi, peptid bağının her iki yanındaki $C_{\alpha}-C$ bağları etrafındaki (ψ açıları) dönüşler ve $C_{\alpha}-N$ bağları etrafında dönüşler (Φ açıları) olanaklıdır ve bunlar proteinlerin üç boyutlu yapısında önemli rol oynamaktadırlar.



Şekil 2.5 Peptid bağlarının dönüş açıları.

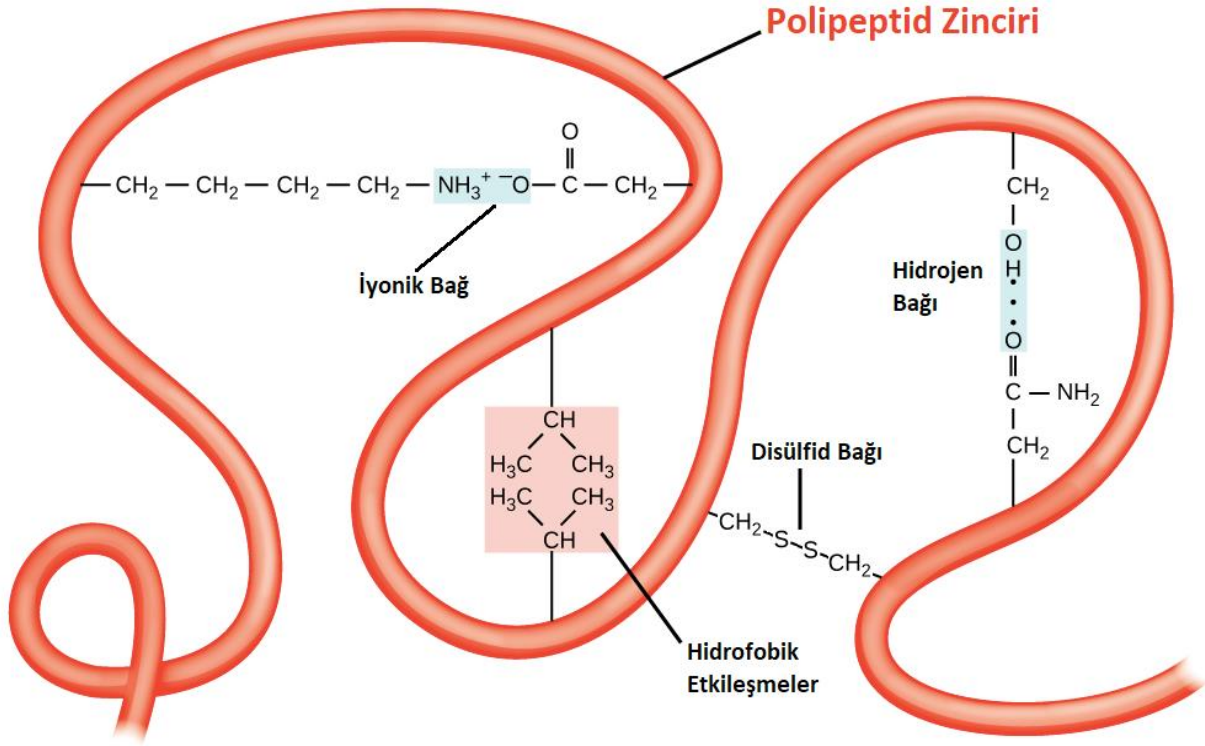
İkincil Yapılar:

Bir proteinin ikincil yapısı bir polipeptid zincirinin yerel konformasyonu olarak düşünülebilir. İkincil yapıların bazıları karardır ve yaygın olarak proteinlerde rastlanmaktadır. Bir proteinin birincil yapısı üzerine peptid bağları ve hidrojen bağları tarafından uygulanan kısıtlamalar onun ikincil yapısını belirlemektedir. Protein yapı araştırmaları sırasında polipeptid zincirlerinde iki tip baskın ve karardlı yerel konformasyon bulunduğu ortaya çıkmıştır. Bu ikincil yapılar 1951 yılında Pauling ve arkadaşları tarafından varlıkları keşfedilen α -heliks (helix) ve β -yaprağı (plate) konformasyonlarıdır (Pauling et al. 1951). Bu ikincil yapılar hidrojen bağı ile bir arada tutulurlar ve yüksek düzeyde karardlılık sergilerler. Bir heliks, polipeptid omurgasının kıvrılmasıyla oluşturulur ve böylece bir sarmal Şekil ortaya çıkar. Polipeptid omurgası iki yönde sarılabilir (sol veya saç), Zinciri sarmal biçiminde tutan ve karardlı hale getiren, bir peptid bağındaki N-H grubu ile diğer peptid grubundaki C=O grubu arasında kurulan hidrojen bağ etkileşmeleridir. Diğer baskın ve karardlı yerel konformasyon β yaprağıdır. Yine hidrojen bağ etkileşmeleri bu yapının yüksek düzeyde karardlılığının nedenidir. Ancak, α -heliklerden farklı olarak β -yaprakları tek bir zincir yerine bitişik polipeptid zincirleri arasındaki hidrojen bağlarıyla oluşurlar. Bununla birlikte, proteinlerde rastgele sarmal, dönüş veya kıvrılma gibi kararsız başka ikincil yapı tipleri de gözlenmektedirler. Bu ikincil yapılar genellikle protein yüzeylerinde ve düzenli bölgeler arasında basit geçiş bölgelerinde rastlanır. Ayrıca, bu ikincil yapılar da proteinlerin aktif veya işlevsel bölgesinde yer alabilmektedir ve bundan dolayı karardlı ikincil yapılar gibi yapısal olarak hayati önem taşımaktadırlar.

Üçüncül Yapılar:

Bir proteinin üçüncül yapısı, polipeptid zincirinin üç boyutlu global yapısı olarak tanımlanır. Üçüncül yapı, bir proteinin sahip olduğu nihai geometrik Őekli olarak tanımlanabilir. Bu nihai Şekil, aminoasitlerin yan zincirleri arasındaki çeşitli bağ etkileşimleri ile belirlenir. Bundan dolayı yan zincirler, proteinin üçüncül yapılarının oluşumunda çok daha aktif bir rol oynamaktadırlar. Yan zincirler arasındaki bu bağlanma etkileşimleri, protein zincirinde bir takım katlamalara, eğilmelere ve ilmeklere neden olabilir. Bu etkileşimler aynı zamanda zincirin farklı parçalarını da birleştirebilirler.

Bir proteinin üçüncül yapısını kararlı kılan yan zincirler arasında dört tür bağlanma etkileşimi vardır. Bunlar; hidrojen bağları, iyonik bağlar (tuz köprüleri), disülfid bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir. Üçüncül yapı bağ etkileşimleri Şekil 2.6 da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Bir polipeptid zincirinin üçüncül yapısında bulunan bağlar.

Hidrofobik etkileşimler bir proteinin katlanmasına ve şekillenmesine büyük ölçüde katkıda bulunurlar. Hidrofilik yan zincirine sahip polar aminoasitler çözelti ile temas kurma ve etkileşme eğiliminde iken, polar olmayan ya da hidrofobik yan zincirine sahip aminoasitler çözelti ile etkileşime girmek için kendilerini proteinin merkezine doğru konumlandırma eğilimindedirler. Çünkü hidrofobik gruplar ile su ve diğer polar aminoasit grupları karşılıklı olarak birbirlerini iterler ve bu durum hidrofobik grupların kendi aralarında bir etkileşime neden olur. Alanin, valin, lösin ve izolösin' in hidrokarbon alkil grupları arasındaki karşılıklı çekici etkileşim bu türden bir etkileşimleri örnektir.

Proteinlerin üçüncül yapısına katkıda bulunan hidrojen bağları ise katlanmış bir polipeptid zincirin farklı bölümlerinde meydana gelerek yapının hidrofobik etkileşimler sonucu belirlenen şeklinin kararlılığı için yardımcı olurlar.

Ayrıca, protein katlanması nedeniyle, birbirlerine yaklaşan pozitif ve negatif yüklü yan zincirine sahip aminoasit grupları arasında iyonik bağlanma meydana gelebilir. Literatürde tuz köprüleri olarak da adlandırılan bu etkileşim türü, yan zincirlerdeki bir asitin ve bazın nötralize edilmesiyle sonuçlanır.

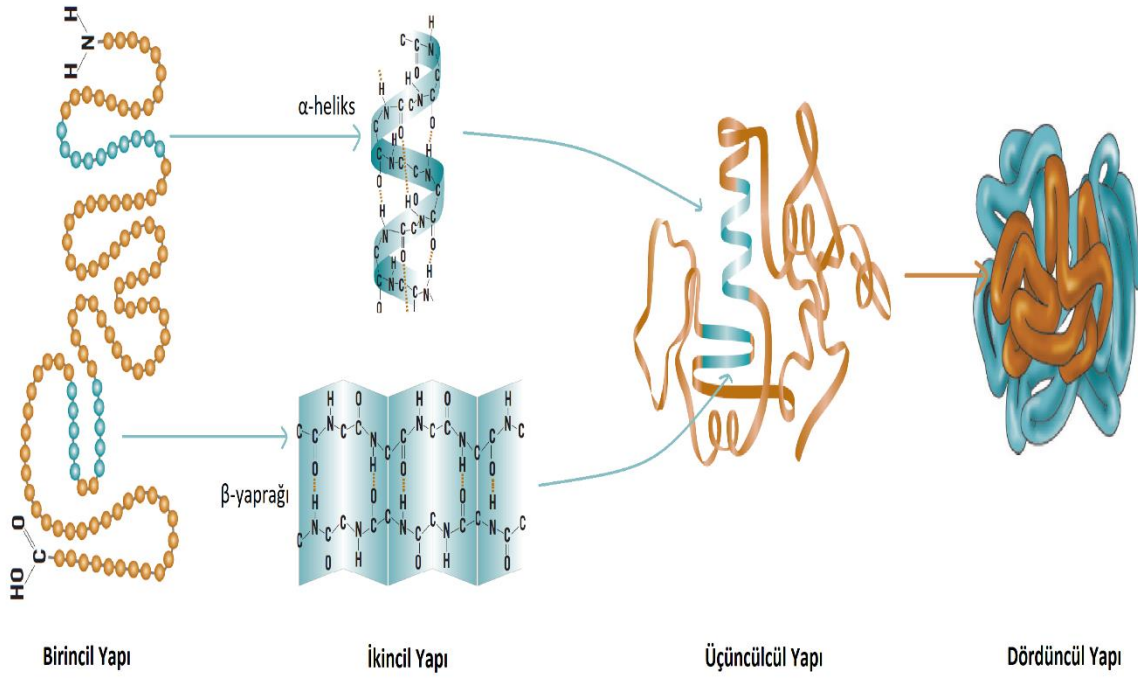
Disülfid bağı ise üçüncül yapıya katkıda bulunabilecek özel bir kovalent bağ türüdür. Disülfid bağları, cistin aminoasitlerinin kükürt içeren yan zincirleri arasındaki kovalent bağlardır. Üçüncül yapıyı oluşturan diğer bağ türlerinden çok daha güçlüdürler. Polipeptid parçalarını sıkıca birbirlerine tutturarak moleküler emniyet pimleri gibi davranırlar.

Çoğu protein belirgin bir üçüncül yapıya sahiptir. Bu proteinlerin ikincil yapısal elementleri (yerel konformasyonları) aynı üçüncül yapıyı üretmek için daima aynı şekilde katlanırlar. Bundan dolayı bu son yapıya üç boyutlu global yapı denilmektedir.

Dördüncül Yapılar:

Dördüncül yapı, iki veya daha fazla bağımsız olarak katlanmış polipeptidin birbiriyle etkileşmesiyle oluşan yapıdır. Birçok proteinin, tek bir zincir (monomer) olarak biyolojik işlevi yoktur. Ancak birkaç polipeptid zinciri bir araya gelerek oluşturdukları dördüncül yapı ile fonksiyonel bir protein meydana getirirler. Bu yapılar, çoklu altbirime sahip veya çok zincirli proteinler de denilmektedir. Dördüncül yapıları da ikincil ve üçüncül yapılarda meydana gelen etkileşimler kararlı kılmaktadır.

Şekil 2.7' de proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının birer şematik gösterimi bir arada verilmiştir.



Şekil 2.7 Protein yapılarının şematik gösterimi.

Proteindeki atomların üç boyutlu uzaysal sıralanmasına onun konformasyonu denir. Yüzlerce bağ içeren protein teorik olarak çok sayıda konformasyona sahiptir, ancak biyolojik olarak bu konformasyonlardan birkaç tanesi baskındır. En düşük Gibbs serbest enerjili konformasyonlar termodinamik olarak en kararlı olanıdır. En kararlı konformasyonu belirleyen proteinin katlanmasındaki aşamalarıdır. Proteinin doğal olarak katlanıp oluşturduğu şekle onun doğal “native” hali denilmektedir.

Diğer taraftan proteinler genellikle çözelti içerisinde bulduklarından, içinde buldukları çözeltilerin bu konformasyonlara etkisi kaçınılmazdır. Protein zincirindeki hidrofobik yan zincirler su ile temas etmeyecek bir şekilde, oluşan küresel yapının merkezine doğru toplanırlar. Böylece su, özellikle üçüncül yapının oluşumunu ve dolayısıyla dördüncül yapıları da büyük ölçüde etkilemiş olmaktadır. Bu nedenle, bir proteinin çözelti içerisinde sahip olacağı konformasyonu vakum ortamındakinden oldukça farklı olacaktır. Proteinlerin çevresel ve biyolojik koşullardan etkilenerek birbiriyle ilişkili olan bir yapıdan başka bir yapıya geçmesine konformasyonel değişim adı verilir.

2.5 PROTEİN YAPILARININ BELİRLENMESİ

Proteinler statik konumda olmayıp dinamik haldedirler ve işlevlerini yapmak üzere konformasyon değişiklikleri yapabilirler. Proteinlerin üç boyutlu yapıları onların fiziksel, kimyasal ve biyolojik fonksiyonlarını belirlemektedir. Her protein işlevini yansıtan benzersiz bir konformasyona sahiptir. Canlı yaşamını ilgilendiren hemen hemen her konuda proteinlerin hayati öneme sahip olması nedeni ile proteinlerin kararlı üç boyutlu konformasyonel yapılarının anlaşılması sağlık, ilaç, endüstri v.b. alanlarda çok önemli gelişmeler sağlamaktadır. Ancak, protein yapısının karmaşıklığı, en gelişmiş analitik ekipmanlarla bile, yapının tümüyle aydınlatılmasını son derece zorlaştırmaktadır.

Küçük protein ya da peptidlerdeki aminoasitlerin dizilimini ve her birinin molar orantısını belirlemek için protein haritalandırma ve kütle spektrometresi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler peptidler ve küçük proteinler için rutin bir işlem olmakla birlikte, büyük ve çok zincirli proteinler için daha karmaşık hale gelmektedir. Diğer yandan proteinler yalnızca birkaç nanometre mertebesinde küçük yapılar oldukları için, 1 mikrometrelik maksimum çözünürlüğe sahip güçlü ışık mikroskobu ile bile gözlemlenemezler. Bunun için daha gelişmiş spektroskopik yöntemler kullanılmalıdır. Bu yöntemlerden biri olan Dairesel Dikroizm yöntemi (CD), bir proteinin ikincil yapısını, katlanma özelliklerinin karakterizasyonunu ve yapının termal kararlılığını incelemek için kullanılan yaygın bir spektral yöntemdir (Greenfield 2006). Bu yöntemle α -heliks, β -yaprağı ve rastgele sarım gibi proteinlerin ikincil yapı türleri, uzak UV spektral bölgede (190-250 nm) kolaylıkla belirlenebilir. Her bir ikincil yapı CD de karakteristik spektruma sahiptir. Tüm spektroskopik teknikler gibi CD sinyali de moleküler popülasyonun ortalamasını yansıtmaktadır. Dolayısıyla, CD bir proteinin yaklaşık %50 alfa-heliks yapı içerdiğini belirleyebiliyor olsa da hangi aminoasitlerin alfa-heliks yapıda olduğunu belirleyememektedir.

Bir proteinin üç boyutlu yapısının daha eksiksiz ve yüksek çözünürlüklü analizinde ise X-ışını Kırınımı ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi iki önemli spektroskopik deneysel yöntem kullanılır.

X-ışını kırınımı yönteminde, paralel bir X-ışını demeti saf bir protein örneğine yönlendirilir ve elde edilen kırınım desenindeki her bir noktanın yeri ve yoğunluğuna bakılarak, kristal yapı içinde bulunan protein atomlarının konumları belirlenmektedir. Başka bir deyişle protein yapısının bir modelini oluşturmak için kullanılabilen üç boyutlu elektron yoğunluğunun haritası elde edilmiş olur. Bu elektron yoğunluğu haritasıyla belli bir çözünürlük ile tüm protein atomlarının üç boyutlu koordinatlarının belirlenmesi mümkündür. Ancak, X-ışını kırınımı ile belirlenen protein yapılarının güvenilirliği ile ilgili temel soru, kristal kafesin proteinlere olan etkisidir. Ayrıca kristalleşme şartları ve kristalin kendisi, proteinin bulunduğu doğal koşullardan farklı olabilir. Proteinlerin kristalleştirilmesi oldukça hünere bir iş; çünkü her yeni proteini kristalize edecek uygun koşulları belirlemek oldukça zordur bazen de imkânsızdır. Hatta kristalleştirme bazı durumlarda protein yapısında büyük bir değişikliğe sebep olmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, X-ışını kristal kırınımı ile genellikle hidrojen atomlarının konumları çözülemez veya oksijenden ve karbondan güvenilir şekilde ayırt edilemez. Tüm bu zorluklara rağmen, X-ışını kırınımı protein yapı tayini için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bilindiği üzere deneysel olarak yapısı çözülmüş tüm proteinler genelde Protein Data Bank (PDB) adlı bir veri tabanına kaydedilmektedir. Bu veri tabanındaki protein yapılarının %80'inden fazlasının yapısı X-ışını kırınımı ile elde edilmiştir.

Bunun yanında, yapısı çözümlenmiş PDB veri tabanına kaydedilen proteinlerin yaklaşık %16'sı ise Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ile elde edilmiştir. NMR yöntemi güçlü bir manyetik alana yerleştirilmiş küçük hacimli konsantre protein çözeltisi ile yapılmaktadır. Kolaylıkla kristalleşmeyen küçük proteinler için tercih edilen bir yöntemdir ve hidrojen atomlarının bazılarının pozisyonlarını da vermektedir. NMR analizinin sonuçları, X-ışını ile elde edilen benzersiz modelin aksine alternatif modellerin bir toplamıdır. Çünkü NMR yapısının hesaplanması dolaylı bir yöntemdir. Bazı atomlar arası mesafeler yaklaşık olarak elde edilirken, proteinlerin genel yapısı ise ampirik olarak parametreleştirilen bir prosedür kullanarak bilgisayar tarafından hesaplanır. NMR yönteminde, tek bir yapının tespiti yerine birkaç yapının belirlenmesinin sebebi budur. Ayrıca NMR spektroskopisi, piklerin çakışması sorunu ve mıknatıslanmanın hızlı gevşemesi sebebiyle büyük proteinlerde verimli sonuçlar vermeyebilir.

Bu iki temel yapı belirleme yöntemi, proteinlerin tamamen farklı özelliklerine dayanmaktadır. Bir proteinin NMR yapısı birkaç çekirdeğin manyetik özelliklerinden hesaplanırken, X-ışını yapısı hidrojen atomu olmadan atomların elektron yoğunluğundan türetilmektedir.

Diğer yandan, PDB' deki yapıların %2 si ise teorik modelleme ile elde edilen yapılardan oluşmaktadır. Teorik modeller deneysel yöntemlerle elde edilenlere göre daha az güvenilir olsa da, ilaç geliştirme ve teknolojik alanlardaki çalışmalar için önemli fikirler sağlayabilirler. Teorik modellerden biri olan Homoloji modellemesi; sekansı (aminoasit dizilimi) belirlenen yapının konformasyonunu, bu sekansa benzer ve deneysel olarak önceden yapısı ortaya konulmuş bir proteinin üç boyutlu yapısına benzetme çalışmasıdır. Homoloji modellemenin sonuçları, yalnızca teoriden (ab initio modelleme) türetilen sonuçlardan daha güvenilir olabilmektedir.

Ayrıca, deneysel olarak karşılaşılan zorluklardan dolayı yapısı ortaya konulamamış proteinlerin yapı tayininde ya da yapısı belirlenen fakat deneysel yöntemlerle gözlemlenmesi zor olan etkilerinin araştırılmasında simülasyon çalışmalarına başvurulmaktadır.

2.6 PROTEİNLERİN KARARLILIĞI VE DENATÜRASYONU

Proteinler, üç boyutlu yapısını kontrol eden zayıf etkileşimlerin doğası nedeniyle çok hassas moleküllerdir. Bir proteinin doğal hali proteinin en kararlı konformasyonu olarak tanımlanır. Bu doğal hal, sıcaklık, pH, hidrofobik yüzeylerin varlığı, metal iyonlarının varlığı, organik çözücüler, deterjanlar ve mekanik karıştırma gibi faktörlerle bozulabilir. Bu faktörlere bağlı olarak proteinin ikincil, üçüncül veya dördüncül yapılarında ortaya çıkan değişimlere, proteinin denatürasyonu denilmektedir. Denatürasyon proteinin rastgele veya yanlış katlanmış şekle dönüşmesine neden olmaktadır.

Denatüre olmuş bir protein doğal formdaki biyolojik fonksiyonu kaybederek çok daha farklı bir aktivite profiline sahip olabilir. Ayrıca denatüre olan proteinler belirli koşullar altında protein topaklanmalarına sebep olabilirler. Protein topaklanması; yanlış katlanmış proteinlerin agregalara ve organize fibrillere (lifli yapılar) dönüşmesine neden olan bir konformasyonu benimseme sürecidir. Bu bahsedilen protein topaklanması süreçleri Alzheimer, Huntington

koresi ve Parkinson gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların temel sebebi olduğundan istenmeyen bir durumdur.

Proteinlerin denatürasyonu sonucu konformasyonunda meydana gelen fiziksel bozulmalarına ek olarak, olası kimyasal bozulma faktörlerinin de farkında olmak önemlidir. Bir proteinin kimyasal yapısını bozabilecek olası faktörler; oksidasyon, de-disidasyon, peptid-bağı hidrolizi, disülfid bağı değiştirme ve çapraz bağlanma gibi süreçlerdir. Proteinlerin formülasyonunda ve işlenmesinde kullanılan bu süreçler, biyofarmasötüğün hem depolanma hem de ilaç verme aşamalarında bozulmayı önlemek ve protein kararlılığını arttırmak için dikkatle ele alınmalıdır.

Bir proteinin kararlılığını belirlemek için birçok farklı deneysel teknikten yararlanılabilir. Örneğin, katlanmamış bir proteinin analizi için floresan, UV (Ultraviyole), kızılötesi ve CD gibi spektroskopik yöntemler kullanılabilir. Ayrıca diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) gibi termodinamik yöntemler, sıcaklığın protein kararlılığı üzerindeki etkisini belirlemede yararlı olabilir. Karşılaştırmalı peptid haritalama yöntemi oksidasyon veya deamidasyon gibi bir proteindeki kimyasal değişikliklerin belirlenmesinde son derece önemli bir yöntemdir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), aynı zamanda proteinin saflığını analiz etmek için paha biçilemez bir yöntemdir. Protein kararlılığını belirlemek için kullanılan diğer analitik yöntemlerden SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), izoelektrik odaklama ve kapiler elektroforez, protein biyofarmasötüğünün potansiyelini belirlemek için uygun biyolojik tahlildirler. Protein kararlılığını belirlemeye yönelik bu yöntemler, protein yapısının doğasının karmaşıklığını ve başarılı biyofarmasötik bir ürünün yapısının korunmasının önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

2.7 PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ

Protein mühendisliği, doğada var olmayan ve istenilen fonksiyonları gerçekleştirebilecek yeni enzimlerin veya proteinlerin tasarlanmasıdır. Protein mühendisliği ile ilgili ilk çalışmalar, 1980li yılların başına kadar uzanmaktadır ve bu çalışmalar aminoasit sekanslarını değiştirmek için rekombinant DNA teknolojisinin kullanımına dayanmaktadır. Ulmer tarafından yapılan bir incelemede, yapay gen sentezi ile kristal yapı ve protein kimyası bilgisinin, istenen özelliklere

sahip proteinleri elde etmek için güçlü bir yaklaşım olduğu vurgulanmıştır (Ulmer 1983). 1992'de yapılan daha sonraki bir çalışmada ise düşük su sistemlerinde enzim kararlılığını ve verimliliğini artırmak için protein mühendisliğinin, son derece umut verici bir teknik olduğu belirtilmiştir (Gupta 1992). İlerleyen yıllarda, rekombinant DNA teknolojisi ve yüksek verimli tarama algoritmalarının geliştirilmesi sayesinde, protein mühendisliği yöntemleri ve uygulamaları gittikçe önem kazanmış ve yaygınlaşmıştır.

Protein mühendisliği yöntemlerinin kısaca tarihsel gelişimi şöyledir. Protein mühendisliğindeki en klasik yöntem, proteinlerin "alana yönelik mutasyon" unu içeren "akılcı tasarım" yaklaşımı olarak adlandırılır (Arnold 1993). Akılcı tasarım, ilgilenilen proteinin yapısı ve mekanizması iyi biliniyorsa çok etkili bir yaklaşımdır. Ancak gelişen teknolojiye rağmen protein yapısı ve mekanizmaları hakkında hala sınırlı miktarda bilgi edilebilmekte idi. Bundan dolayı, istenilen protein özellikleri için "rastgele mutasyon ve seleksiyon" içeren "evrimsel yöntemler" in kullanımı alternatif bir yaklaşım olarak ortaya atılmıştır (Anthonsen et al. 1994). 1994'te Anthonsen ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada ayrıca, protein mühendisliği çalışmalarına ek anahtar bilgiler sağlamak için protein yapılarının homoloji modellemesi, büyük proteinlerin NMR' ı ve protein yapılarının moleküler dinamik simülasyonları gibi önemli bilimsel alanlardan da bahsedilmiştir. İlerleyen yıllarda ise genlerin hiyerarşik evrim ilkesine dayanan "in vitro protein geliştirme sistemleri" protein mühendisliğinde de önem kazanmıştır. Bu ilkeye göre modern genlerin, küçük genetik birimlerden hiyerarşik ve kombinasyonel süreçler üzerine geliştiği ileri sürülmüştür (Shiba 2004). 2003 yılında bu ilke esas alınarak ilk globüler protein olan Top 7 tasarlanmıştır (Kuhlman et al. 2003). 2005 yılında Antikainen ve Martin yaptıkları çalışmada, protein mühendisliği için önemli yöntemleri ayrıntılı olarak sınıflandırmış ve biyolojik kütüphaneleri taramak için etkin tarama yöntemlerinin geliştirilmesini de gündeme getirmişlerdir (Antikainen and Martin 2005). İlerleyen yıllarda, klasik mutasyon ve hiyerarşik evrim teorisi gibi geleneksel protein mühendisliği yöntemlerine ek olarak, hesaplamalı protein tasarım araçları giderek daha da önem kazanmıştır. Van der Sloot ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir incelemede "hesaplamalı protein tasarım ilkeleri ve uygulamaları" tartışılmıştır (Van der Sloot et al. 2009). Hesaplamalı protein tasarım ilkeleri, belirli bir proteinin üç boyutlu omurga yapısı ile en uyumlu aminoasit dizisini belirlemek için, bir kuvvet alanının kullanıldığı ve bir tarama algoritmasının kombinasyonuna dayanmaktadır. Bu algoritma, seçilen pozisyonlardaki orijinal aminoasidi diğer bütün doğal aminoasitlerle değiştirir ve yeni konformasyonlara dönüştürür. Böylece, uygun olan en düşük

enerjili konformasyon belirlenir (Van der Sloot et al. 2009). Bu zamana kadar yapılan hemen hemen tüm protein mühendisliği çalışmaları, doğal olarak oluşan proteinlerin modifikasyonunu içermektedir. Ancak biyomedikal ve nanoteknolojideki mevcut zorlukların üstesinden gelmek için yeni fonksiyonel proteinleri tasarlamak için yeni yöntemlerin kullanımına gerek duyulmuştur. Golynskiy ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, "*de novo* mühendisliği" yöntemi olarak adlandırılan ve proteinlerin sıfırdan tasarlanmasını içeren yeni bir tasarlama yönteminin önemi ve potansiyeli vurgulanmıştır (Golynskiy and Seelig 2010). *De novo*, var olan birçok tarama yönteminin kütüphanesine göre çok daha büyük birden fazla kütüphane taraması ile *de novo* proteinleri seçebilen güçlü yeni bir tekniktir. Ayrıca bu yöntem, içerisinde bugüne kadar çıkmış tekniklerin hemen hemen tüm özelliklerini de barındırmaktadır. Muhtemelen gelecekte uygulanacak protein mühendisliği yöntemleri de birçok yeni teknolojiyi ve mevcut yöntemlerin kombinasyonel kullanımını içerecektir. 2011 yılında ise *de novo* tekniği kullanılarak tasarlanan yapılarda çok büyük bir artış gözlemlenmiş ve bu teknik günümüzde oldukça popüler hale gelmiştir (Huang et al. 2016).

300 aminoasitten oluşan tipik bir proteinde 20^{300} muhtemel aminoasit dizilimi oluşturulabilir. Mutasyon çalışmaları doğal evrim sürecinin yalnızca sonsuz küçük bir altkümesini örnekleyebilmektedir. *De novo* protein tasarımıyla ise protein katlanmasının altında yatan fiziksel ilkelerin rehberliğinde proteinin tam dizilimi araştırılabilir. Ayrıca hesaplamalı tasarım yöntemleri, sıfırdan başlayarak geniş bir yelpazede atomik seviyede bir doğrulukla yapıların tasarlanabileceği noktasına gelmiştir. Yeni yapıların zenginliği ve yöntemlerdeki ilerlemeler artık günümüzde belirli modern sorunları çözmek için proteinlerin, özel amaçlara uygun olarak tam bir kesinlikte hazırlanmasına izin vermektedir.

2003 yılında doğada gözlenmeyen bir katlanma ile tasarlanan ilk globüler protein olan Top7 de dahil olmak üzere geniş bir ideal $\alpha\beta$ protein yapıları dizisi tasarlamak için izlenen prosedür genel olarak iç simetriye sahip tek bir idealleştirilmiş alt birimin tekrarlanması şeklindedir. Günümüz mühendisliğinde de büyük proteinler tasarlanırken amaca uygun geometriyi elde edebilmek için, bu alt birimler uygun bir simetriyle tekrarlanır ya da bu alt birimlerin modifikasyonları ile toroidler, varil v.b. geometriler ortaya çıkarılabilir.

Hiyerarşik evrim ilkesine göre bir proteinin tasarlanması aşamasında, örneklenmenin imkansız olduğu büyük yapılar, tam da *de novo* protein dizaynının alanıdır. Çünkü fonksiyonel katlanan proteinler rastgele sekans kütüphanelerinden elde edilir. Bu süreç çok aşamalı ve rastgele ilerlemektedir. Bunun yerine, biyofizik ilkeleri esaslarıyla sıfırdan yeni proteinler üretmek ön plana çıkmaktadır.

De novo yaklaşımları genel olarak Christian Anfinsen tarafından önerilen şekilde, proteinlerin aminoasit dizilimlerinin erişebileceği en düşük enerji durumlarına katlanacağı hipotezi üzerine inşa edilmiştir (Kresge et al. 2006). Bu yaklaşımın uygulamasında iki zorluk vardır; birincisi, bir sistemin enerjisi mükemmel doğrulukla hesaplanamaz, ikincisi ise olası yapıların ve dizilerin veri tarama alanı çok büyüktür ve bu nedenle kapsamlı bir şekilde kütüphane taraması çok zordur. Tasarım hesaplamalarında kullanılan enerji fonksiyonunun fiziksel temelini oluşturmak ve örnekleme sorununun üstesinden gelebilmek için kullanılan birçok hesaplamalı tasarım algoritması vardır. *De novo* protein tasarımlarında kullanılan bu algoritmalarından bazıları “Rosetta” (Leaver-Fay et al. 2011), “CCBuilder” (Wood et al. 2014), “WISDOM” (Smadbeck et al. 2013) ve “CLEVER and CLASSY” (Negron and Keating 2013) algoritmalarıdır. Bu ve benzeri hesaplamalı tasarım uygulamaları ayrıca moleküler yüzeylerde özel geometriye sahip *de novo* proteinlerin dizaynında kullanılabilir. Çünkü bu moleküler yüzeyler üzerinde tasarlanan zengin dokulu ve çok zincirli yapılara bilim, teknoloji ve endüstri alanlarında işlevsellikleri açısından fazlaca ihtiyaç duyulmaktadır. Bu moleküler yüzeyler, genellikle bilim ve teknoloji açısından öneminden dolayı karbon nanotüpler olarak tercih edilmektedirler. Örnek vermek gerekirse tek duvarlı karbon nanotüpü (SWCNT) çevreleyen boru şekilli bir *de novo* yapının tasarımı aşamasında, zengin dokulu ve çok zincirli yapılar elde edilirken hesaplamalı tasarım hem alt birimlerin moleküler yüzeyi tanıyacağı hem de alt birimler arasındaki uygun etkileşimleri birlikte kodlayan bir aşamada ilerlemektedir. (Grigoryan et al. 2011).

BÖLÜM 3

MOLEKÜLER MODELLEME VE KUVVET ALANLARI

3.1 GİRİŞ

Günümüzün en güncel problemlerinden biri proteinlerin katlanabilirliğinin anlaşılması ve kararlı yapılarının belirlenmesi işlemleridir. Protein yapılarının değişim gösterip katlanarak oluşturduğu üç boyutlu yapıya proteinin “doğal hali” ya da “katlanmış hali” denir (Dobson et al.1999, Radford 2000). Deneysel olarak bir proteinin doğal ya da katlanmış üç boyutlu yapısının ortaya konulmasının mümkün olmadığı durumlarda kuramsal yöntemlere ve simülasyon çalışmalarına başvurulur.

3.2 MOLEKÜLER MODELLEME

Proteinler gibi biyolojik moleküllerin kuramsal ve simülasyon çalışmalarını yapabilmek için yapının iyi bir şekilde modellenmesi gerekmektedir. “Moleküler Modelleme” olarak adlandırılan bu yöntemde amaç kısaca moleküllerin 3 boyutlu yapılarını, tepkimelerini bulmak ve göstermektir. Aslında, bir kâğıt üzerine moleküllerin yapılarının çizilmesi, mekanizmaların gösterilmesi en basit anlamda moleküler modellemeye örnektir. Ancak gerçek anlamda moleküler modelleme, bilgisayarlar yardımıyla moleküllerin değişik yöntemlerle çözülmesi ve üç boyutlu yapılarının ortaya çıkarılmasına denilmektedir. Moleküler modellemede temel düşünce, sistemi oluşturan atom ve moleküllerin bilinen temel etkileşme terimlerine bağlı olarak sistemi tanımlayabilmektir. Genellikle moleküler modelleme, gerçek bir sistemin fiziksel özelliklerini tahmin etmenin yanı sıra yeni materyallerin dizaynı için de günümüzde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Proteinler modellenirken sahip oldukları oldukça esnek yapılarından dolayı anormal sayıda olası konformasyonlar ortaya çıkmaktadır. Böylesine çok sayıda serbestlik derecesine sahip olan sistemlerin kuramsal açıdan anlaşılması ise oldukça zordur. Tamamı ile yeni matematiksel yaklaşımlarla bu sistemler izah edilmeye çalışılmasına rağmen, en önemli bilgilerin simülasyon çalışmaları ile elde edileceği bilinmektedir (Hao and Scheraga 1994, Hansmann and Okamoto 1993, Okamoto 1998). Bu nedenle son otuz yıldır proteinlerin düşük enerjili konformasyonları simülasyon teknikleri ile örneklenmeye çalışılmaktadır (Meirovitch et al. 1997, Baysal and Meirovitch 1997).

Bu amaca yönelik olarak kullanılan kuantum mekaniksel yöntemler, aslında Schrödinger denkleminin ($H\Psi_n=E\Psi_n$) çözümü üzerine kurulmuştur (Pauling and Wilson 2012). Kuantum mekaniksel hesaplamalar sadece çok küçük sistemler için pratiktir. Biyomoleküller de dahil olmak üzere daha geniş ölçekli sistemler içerisindeki elektronların çoklu parçacık sisteminin Schrödinger denklemini çözmek için çeşitli yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan biri olan Born-Oppenheimer yaklaşımında, molekülün hareketleri elektronlar ve çekirdekler olmak üzere iki aşamaya ayrılarak incelenir: Elektron ile çekirdeğin kütlelerinin arasındaki büyük fark bu yaklaşımın temelinde önemli rol oynamaktadır. Bu yaklaşımda ilk olarak, çekirdeklerin pozisyonları sabit olarak kabul edilir ve sadece elektronlar hamiltonyenin bağımsız değişkeni olarak ele alınır. Elektron hareketinin bu analizinden çıkan özdeğerler, atomik koordinatların bir fonksiyonu olarak bir molekülün elektronik enerji düzeylerini temsil eder. Bu enerji durumları Born–Oppenheimer enerji yüzeyleri (Born–Oppenheimer energy surfaces, BOES) olarak bilinir ve Hamiltonyenin potansiyel enerjisi olarak Coulomb potansiyeli yerine elektronik taban durumunun BOES’ u kullanılarak sistem tanımlanır. Çekirdeklerin kuantum mekaniksel davranışı ise daha sonra ele alınır.

Teorik olarak, deneysel bilgiye girdi olarak ihtiyaç duymayan bu kuantum mekaniksel hesaplamaların, karmaşık kimyasal süreçlerin tanımlanmasında güvenilir bir araç olması beklenmektedir. Ancak, küçük moleküller dışında Schrödinger denkleminin tam olarak doğru bir şekilde analitik çözümü yapılamamaktadır. Bundan dolayı büyük sistemler için Schrödinger denklemi, yaklaşım metotları kullanılarak çözülebilmektedir. Uygulamada “ab-initio” ve “yarı ampirik” metotlar diye adlandırılan iki temel kuantum mekaniksel metot kullanılmaktadır. Bunların her ikisi de Born-Oppenheimer yaklaşımını temel almaktadır.

Ab-initio metodu, kuantum mekaniğinin temel kanunlarına dayanır ve temel eşitlikleri çözmek için matematiksel yaklaşımlar kullanır. Bu yaklaşımlar ile molekül yapısı ve buna bağlı özellikler hesaplanabilir ve bir tepkime mekanizması tam olarak modellenebilir. Moleküler dinamik veya yarı deneysel metotlara benzemeyen *ab-initio* metotlarında deneysel parametre kullanılmaz. *Ab-initio* hesaplamalarında, “Hartree-Fock Self Consistent Field” (HF-SCF) ve “Density Functional Theory” (DFT) olarak adlandırılan iki farklı matematiksel yaklaşım kullanılır. HF modelinde, elektron-elektron etkileşimleri için ortalama bir potansiyel temel alınır. Bu yaklaşım, molekül frekanslarının hesaplanması ve molekül geometrisinin tayini için uygundur. DFT modelinde ise molekül dalga fonksiyonları yerine, elektron olasılık yoğunluğu (ρ) hesaplanır ve molekül özelliklerinin belirlenmesinde çok daha doğru sonuçlar verir. *Ab-initio* yöntemlerinde hesaplama süresi moleküler dinamik yöntemlere göre çok daha uzundur. GAUSSIAN, HYPERCHEM, CACHE *ab-initio* yöntemlerinin kullanıldığı bazı paket programlardır (Hehre 1986).

Diğer yandan, *yarı ampirik* metotlarda, dalga fonksiyonu etkileşimleriyle ilişkili matris elemanları açıkça integraller yoluyla hesaplanmaz iken, bunun yerine önceden belirlenmiş parametre setleri oluşturulur. Bu parametreler deneysel verilere uyum sağlayacak şekilde, atomik orbitallerin formlarını ve enerjilerini tanımlar. *Yarı ampirik* yöntemlerde deneysel parametreler kullanılarak integrallerin çoğu ihmal edilir. *Ab-initio* yöntemlerinde olduğu gibi, sonuçların kalitesi, yapılan yaklaşımların kalitesine eleştirel biçimde bağlıdır.

Kuantum mekaniksel çoklu parçacık problemlerinden doğan *ab-initio* ve *yarı ampirik* yaklaşımların yanı sıra moleküler mekanik olarak bilinen kuvvet-alanı veya potansiyel enerji fonksiyonlarının kullanıldığı alternatif yaklaşımlar da bulunmaktadır. Kuvvet alanları (potansiyel enerji fonksiyonu) sistem içerisindeki moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri tanımlarlar.

3.3. KUVVET ALANLARI

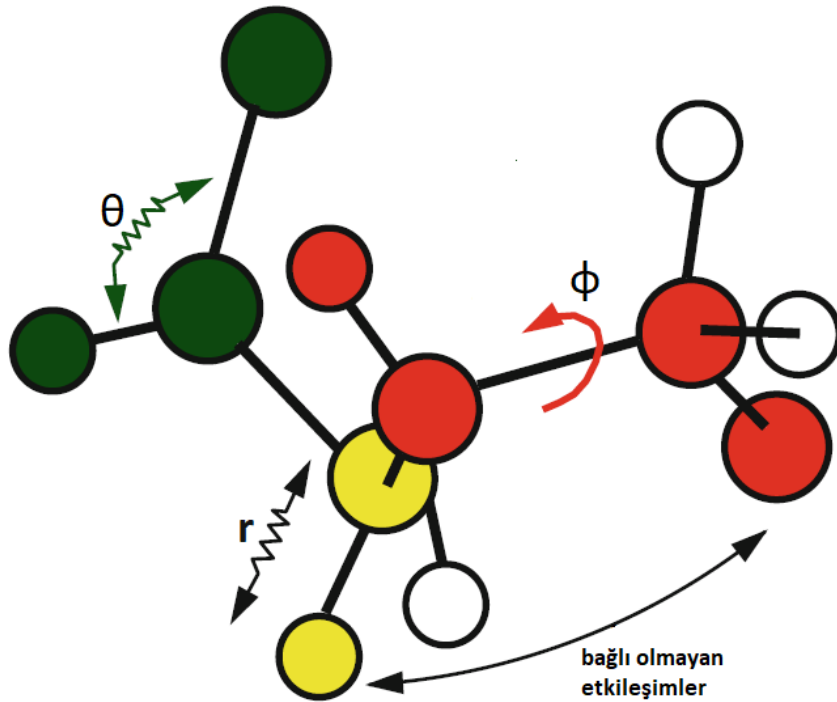
Moleküler mekanik yaklaşımların kullanıldığı Moleküler Dinamik (MD) ve Monte Carlo (MC) simülasyonları; 25 yıldan daha uzun bir süre önce ortaya çıkmıştır. Simülasyonlar, proteinlerin katlanma ve denatüre olmasından enzim reaksiyon mekanizmalarına kadar çeşitli koşullar altında proteinlerin yapı ve dinamiğinin araştırılmasında yoğun olarak kullanılan bir araçtır. Simülasyonların temeli, atomik koordinatların fonksiyonu olarak enerjinin ifade edilmesine dayanır. Denge durumunda sistemlerin, bu potansiyel enerjinin düşük enerji bölgelerinde yoğunlaştığı tahmin edilir ve atomlar arasındaki kuvvetler bu potansiyel enerji fonksiyonunun gradyentidir. Bu nedenle bu fonksiyonlar “kuvvet alanları” olarak isimlendirilir. Kuvvet alanları, bağların ve açılarının “referans” veya “denge” değerlerinden sapması ve bağlar döndükçe enerjinin nasıl değiştiğini anlatan bir fonksiyon ve sistemin bağ yapmayan bölümleri arasındaki etkileşimi açıklayan terimleri içermektedir.

Kuvvet alanlarının dizaynı ve parametrizasyonu, uyarlanacak deneysel verilerin doğru olarak seçilmesi ve hesaplama etkinliği de göz önüne alınarak yapılan karmaşık bir işlemdir. Ampirik potansiyel enerji fonksiyonları, hesaplanan enerjide hatalara neden olan bazı sınırlandırmalar içerir. Parametreler belirlenirken, belli atom tipleri için sınırlı setler kullanılır. Atom tipleri, özel bir bağlanma durumundaki atomu tanımlar. Örneğin, sp^3 bağlanma durumundaki alifatik karbon ile bir histidin halkasındaki karbon atomu farklı özellikler gösterir. Bu nedenle atom tiplerindeki sınırlama tipe-bağlı (type-specific) hatalara neden olur. Bazı atom tiplerinin çevreye duyarlılığı minimumdur ve bunlar için tek bir parametre seti yeterli olabilir, fakat oksijen ve azot gibi atomlar komşu atomlardan daha çok etkilenir ve farklı bağlanma çevrelerine göre farklı parametre setleri tanımlanmalıdır. Ayrıca etkileşimler hesaplanırken, hesaplama etkinliğini artırmak üzere yalnızca iki atom arasındaki etkileşme göz önüne alınır ve üç ya da daha fazla atomun aynı andaki etkileşmesi ihmal edilir.

Kuvvet alanları temel olarak üç kısımdan oluşur. Bunlar sırasıyla bağ olmayan terimler, bağ olan terimler ve özel terimlerdir. Böyle bir kuvvet alanının genel formu Eşitlik (3.1) ve açık formu Eşitlik (3.2)' de sırasıyla verilmiştir. Şekil 3.1' de ise bu potansiyel enerji terimlerini doğuran moleküldeki etkileşim türleri şematik olarak gösterilmektedir. Burada incelenen sistem polimer bir yapı olduğundan, bu yapıyı oluşturan birimler arasındaki ilişkiler göz önüne alınmıştır. Bu yapı birimleri kovalent bağlarla bir arada buldukları için, bu bağlar harmonik potansiyellerle ifade edilebilir.

$$V(r) = V_{bağ} + V_{açıl} + V_{burulma} + V_{bağlı\ olmayan} \quad (3.1)$$

$$V(r) = \sum_{bağ} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{açıl} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{burulma} K_\phi (1 + \cos(\phi_r)) + \sum_{i=0}^N \sum_{j=i+1}^N \left\{ 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}} \right\} \quad (3.2)$$



Şekil 3.1 Potansiyel enerji fonksiyonunda terimlere karşılık gelen etkileşimler.

Eşitlik (3.1) ve açık hali olan Eşitlik (3.2)' deki konformasyonel enerji ifadesinde bulunan ilk üç terim bağı etkileşimlere karşılık gelmektedir. Burada, $V_{bağ}$ iki atom arasındaki bağ uzunluklarındaki (r) değişimlerden kaynaklanan titreşimlerin potansiyel enerjisini, $V_{açı}$ üç atomu birbirine bağlayan bağlar arasındaki açılarının (θ) değişimlerinden kaynaklanan titreşimlerin potansiyel enerjisini ve $V_{burulma}$ ise iki farklı düzlem üzerinde bulunan molekül grupları için düzlemler arası açının (ϕ) değişimiyle oluşan burulmadan kaynaklı potansiyel enerjiyi ifade etmektedir. Eşitliklerde N toplam aminoasit sayısını gösterirken, r_0 , θ_0 ve ϕ_r değerleri ise proteinin kristal yapısından elde edilen deneysel uzaklık ve açı parametreleridir. Bu ampirik parametreler elektronik ortamda bulunan PDB, SCOP (Structural Classification of Proteins), vb. çeşitli veri bankalarından elde edilebilmektedir. Yine bu terimlerde bulunan K_r , K_θ ve K_ϕ parametreleri ise etkileşim katsayılarını göstermektedir (Kaya and Chan 2003). Konformasyonel enerji ifadesinde bulunan dördüncü terim $V_{bağlı olmayan}$ ise; aminoasit zinciri üzerinde birbirinden en az dört atom kadar uzak mesafede olan atomlar için ele alınan etkileşim potansiyelidir. Bu etkileşimler atomlar arasındaki belirli bir bağ ilişkisine bağlı değildir. Bunlar, uzaklığa bağlı etkileşimlerdir ve genellikle uzaklığın tersinin belirli bir kuvvetinin bir fonksiyonu olarak modellenirler. Bir kuvvet alanındaki bağlı-olmayan terimler genellikle iki grupta incelenir; bunlardan biri elektrostatik etkileşimler, diğeri ise Van der Waals etkileşimlerdir.

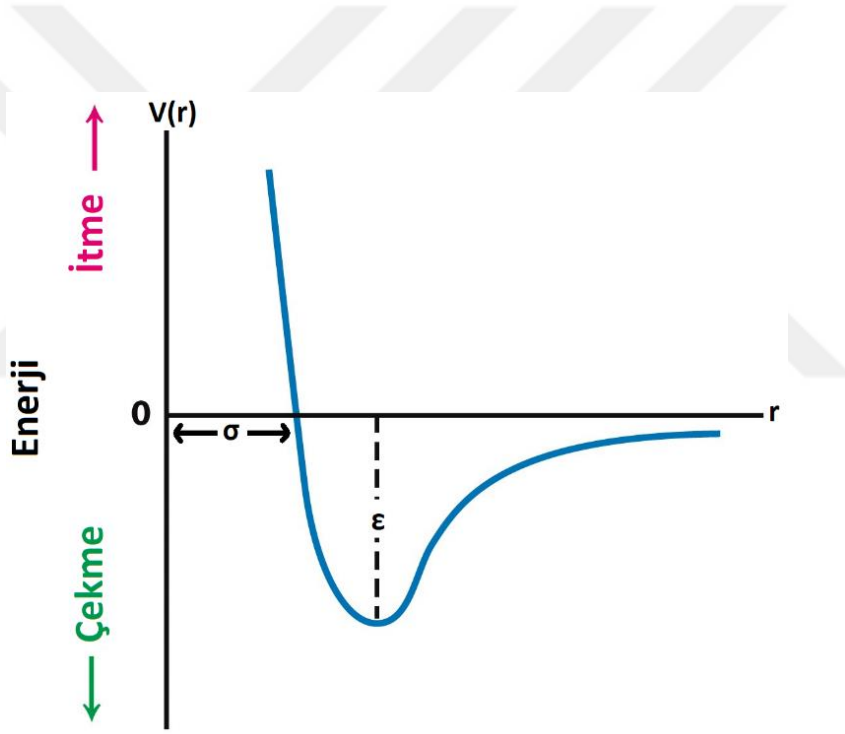
İki molekül arasındaki elektrostatik etkileşim, uç yük çiftlerinin arasındaki etkileşimlerin toplamı olarak Coulomb yasası Eşitlik (3.3) ile hesaplanır.

$$V = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.3)$$

Burada q_i ve q_j i. ve j. atomun elektrostatik yükünü, ϵ_0 boşluğun elektriksel geçirgenlik katsayısını ve r_{ij} ise i. ve j. yükler arasındaki uzaklığı göstermektedir. Bağlı olmayan diğer etkileşim türlerinden Van der Waals etkileşimleri, doğadaki önemli etkileşimlerden biridir. Modellenmek istenen sistem için belirlenmesi gereken, çok sayıdaki Van der Waals potansiyel fonksiyonlarından en çok bilineni Lennard-Jones fonksiyonudur. İki atom arasındaki etkileşim için Lennard-Jones fonksiyonu Eşitlik (3.4)' deki gibi tanımlanır.

$$V(r) = \sum_{i=0}^N \sum_{j=i+1}^N \left\{ 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{i,j}} \right)^6 \right] \right\} \quad (3.4)$$

Lennard-Jones “12-6” potansiyeli sadece iki ayarlanabilir parametre içermektedir: çarpışma çapı ($\sigma_{i,j}$) ve kuyu derinliği (ε_{ij}) parametreleridir. Lennard-Jones potansiyel fonksiyonunun grafiği ve parametrelerin neye karşılık geldiği Şekil 3.2’ de gösterilmiştir. Lennard-Jones potansiyeli, r^{-6} ile değişen bir çekim kısmı ve r^{-12} ile değişen itme bölümüyle karakterize edilmektedir. Van der waals kuvvetleri zayıf olmasına rağmen özellikle protein konformasyonlarının etkilendiği diğer kuvvetlerle karşılaştırıldığında proteinlerdeki üçüncül yapının sürekliliğinde bu etkileşimler önemli bir etki yapar (Whitford 2005).



Şekil 3.2 Lennard-Jones potansiyeli.

Moleküler modelleme ile protein veya peptid dizilimlerinin hem termodinamiksel özelliklerini hem de katlanma özelliklerini çalışmak için literatürde oluşturulmuş birçok kuvvet alanı mevcuttur. Bunlardan en çok bilinenleri, AMBER (Cornell et al. 1995), OPLS (Jorgensen et al. 1996), CHARMM (MacKerell Jr et al. 1998), GROMOS (van Gunsteren et al. 1996) ve ECEPP (Sippl et al. 1984) potansiyel enerji fonksiyonlarıdır.

Proteinler fizyolojik ortamda genellikle çözücü içinde bulunurlar. Modellenen sistemin gerçeğe yakın olması için molekül-çözücü etkileşimlerinin göz ardı edilmemesi gerekir. Bu nedenle çözücülerin de protein gibi modellenmesi gerekmektedir. Çözücü de içeren bir sistemin modellenmesi çok sayıda serbestlik derecesi içereceğinden oldukça zordur. Çözücü ile birlikte modellenen sistemin konfigürasyon uzayını araştırmak için geleneksel MC tekniğinin kullanılması, su molekülleri ile etkileşimlerinin çok düşük kabul edilmesine yol açmaktadır. Bundan dolayı bu tür sistemlerin simülasyonunda, daha yavaş olan MD simülasyon tekniklerine başvurulmaktadır.

3.4. ÇÖZÜCÜ MODELLERİ

Hesaplama gücündeki hızlı büyüme ve moleküler simülasyon yöntemlerinde devam eden iyileştirmelere rağmen, konfigürasyon alanının kapsamlı bir şekilde örnekleme, ilgi gösterilen biyomoleküler sistemlerin çoğu için hala pratik değildir. Bu sistemlerin simülasyonundaki zorluk, yüksek boyutsallıklarına dayanmaktadır. Genomik veri tabanlarındaki ortalama bir protein, yaklaşık 300 adet aminoasit ve yaklaşık 4800 tane atom içermektedir. Bu büyüklükteki bir proteinde bile yaklaşık 26000 tane serbestlik derecesinin örnekleme zaten çok zorlayıcıdır. Tüm bunlara ilaveten sistemin doğru olarak modellenmesi için çözücü, yardımcı-çözücüler ve hareketli iyonlar da dahil olmak üzere sulu ortama karşılık gelen çözücü etkileşimlerini de hesaba katmak gerekmektedir. Çözücü etkisini karşılayabilmek için literatürde “açık (explicit)” ve “kapalı (implicit)” çözücü modelleri olmak üzere iki türlü yaklaşım vardır.

Standart bir açık çözücü yaklaşımı, sulu ortamı tam olarak taklit etmek için su ve iyonları tam olarak modeller. Bunun için literatürde su molekülünü temsil edecek birçok su modeli geliştirilmiştir. Bu modellerin başlıcaları, single-point charge (SPC) (Berendsen et al. 1981), extended single-point charge (SPC/E) (Berendsen et al. 1987), three-point potential (TIP3P) (Jorgensen et al. 1983), four-point transferable intermolecular potential (TIP4P) (Jorgensen et al. 1983) ve five-site rigid nonpolarizable model of liquid (TIP5P) (Mahoney and Jorgensen 2000) su modelleridir. Bunlar temel olarak aynı olmakla beraber su molekülünü tam olarak temsil edebilen yük merkezlerinin yerlerinde ve kullandığı etkileşim parametrelerinde farklılıklar vardır. Bütün bu popüler su modelleri, oda sıcaklığı ve 1 atm basınç altında suyun

karakteristik özelliklerini temsil edebilen modellerdir. Bunun yanında, 10-12 Å'lık açık çözücü ile çevrili 300 aminoasit içeren bir proteinin bulunduğu standart bir ortamda, çözücü için simülasyona 20000-30000 atomun daha eklenmesi, örneklendirme sorununun daha da kötüleşmesine neden olabilmektedir. Kapalı su modellerinde ise çözücü etkisi, bir çeşit ortalama kuvvet potansiyelinin eklenmesi ile hesaplanır ve böylelikle çözülmüş sistemin simülasyonları daha verimli hale getirilmiş olur.

Kapalı su modellerinde çözücü simülasyona hiç ya da birkaç serbestlik derecesinde katkıda bulunduğundan hesaplamaları oldukça hızlı olabilmektedir. Yine de, hesaplama verimliliğine rağmen, kapalı çözücü modelleri tarafından yapılan doğal yaklaşımlar bazen hatalı sonuçlara neden olabilir. Çünkü bu modellerde, çözünen yüzeydeki hidrojen bağı dalgalanmaları, konformasyonel değişikliklerden kaynaklanan su moleküllerinin dipol yönelimleri ve köprü oluşturu su molekülleri gibi belirli özellikler ihmal edilmektedir (Schlick 2010). Molekül-çözücü etkileşiminin önemi ve bu yaklaşımlarda daha elverişli bir şekilde kullanılabilmesi için literatürde kapalı çözücü modeli için birçok çözücü etkisi yaklaşımı geliştirilmiştir. Bunlardan başlıcaları GB (Generalized Born), PB (Poisson or Poisson–Boltzmann) ve SASA (Solvent Accessible Surface Area) yaklaşımlarıdır. Bu yaklaşımlardaki ana fikir hesaplamalara çözünmeyi katmadan bir çözücünün etkisini karşılayabilecek uygun bir metot geliştirmektir.

Çözücü katkısını karşılayan ve yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan biri olan SASA; protein atomlarına uygulanan kuvvetlerin, çözücü tarafından protein atomlarının erişilebilir yüzey alanlarıyla orantılı olduğu fikrine dayanmaktadır. Bu yaklaşımda, protein-çözücü etkileşimi her bir atom türünün çözücüye maruz kalan yüzey alanıyla orantılı olduğu katkıların toplamı olarak karakterize edilebilir. Bu model basitliği ve uygulama kolaylığından dolayı oldukça popülerdir. Bu yaklaşımda $E_{\text{çözücü}}$ çözüme enerjisini, A_i i atom tipinin SASA'sı ve σ_i atom tipine bağlı ve çözücünden gelen tüm katkıları içeren orantı sabiti olmak üzere,

$$E_{\text{çözücü}} = \sum_i \sigma_i A_i \quad (3.5)$$

ifadesiyle verilir. i parametre setinin seçimi, bir çözücü modeli tanımlar ve halen literatürde çeşitli ASP parametre setleri (Atomic Solvation Parameters) bulunmaktadır. İlk SASA parametrisasyon setleri, oktanol ve su arasındaki aminoasit transferinin serbest enerjisinden (Eisenberg and McLachlan 1986) ve yedi kimyasal grup üzerindeki küçük bir molekül kümesinden türetilmiştir (Ooi et al. 1987). Çoğu parametre seti küçük moleküler yapıların deneysel verilerinden elde edilirken, bazıları ise yapıların kuantum kimyasal hesaplara uyumundan parametrize edilmiştir.

Genel anlamda bir çözücü içerisindeki proteinin enerjisi (E) Eşitlik (3.6)' da ki gibi

$$E = E_p + E_{\text{çözücü}} \quad (3.6)$$

iki terimin toplamı şeklinde ifade edilmektedir. Burada E_p , Eşitlik (3.2)' de verilen proteinin konformasyonundan kaynaklanan potansiyel enerjisi ve $E_{\text{çözücü}}$ ise proteinin içinde bulunduğu çözücüyle olan etkileşme enerjisidir.

BÖLÜM 4

SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ

4.1 GİRİŞ

Fiziksel bir sistemin bilgisayar ortamındaki simülasyonu, onun en basit modelidir. Simülasyon çalışmalarında karşılaşılan en büyük problem, sistemin yapısal özelliklerini doğru termodinamiksel nitelikler ile tasvir eden ve çok hızlı oluşabilen atomik etkileşimler için uygun yöntemin belirlenmesidir. Başka bir deyişle, sisteme en yakın benzetimi elde edebilmek için, sistemin gereksinimlerini karşılayacak en uygun yöntemi seçmek gerekmektedir.

Bu yöntemler sistemlerin termodinamik, dinamik ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi için deneysel yaklaşımlardan bağımsız olarak oluşturulmuş moleküler sistemin potansiyel enerjisini hesaplama biçimine göre iki temel sınıfa ayrılabilir. Bunlar; kuantum ve klasik mekaniksel yaklaşımları temel alan yöntemlerdir. Kuantum mekanik yöntemleri, temel parçacıklar olan elektronları kullanarak moleküler sistemin özelliklerini hesaplamak için Schrödinger denklemini yaklaşık olarak çözmeyi amaçlar. Hesaplamalar büyük ölçüde doğru olmasına rağmen, hesaplama maliyetleri çok yüksek olduğundan yaklaşık 100 atoma kadar olan küçük sistemler için uygulanabilmektedir. Bu sebeple biyomoleküller gibi çok sayıda atom içeren sistemlerin simülasyonlarında, genellikle klasik yaklaşımı temel alan yöntemler kullanılmaktadır. Klasik yaklaşımı temel prensip olarak kabul etmiş birçok metod vardır. Moleküler Dinamik (MD), Monte Carlo (MC), Moleküler Mekanik (MM), Örgü Optimizasyonu, Enerji Minimizasyonu (EM) gibi yöntemler bunlara örnek olarak gösterilebilirler (Ercolessi 1997).

4.2 SİMÜLASYON

Bilim ve teknolojinin hızla geliştiği günümüzde simülasyon, önemi gün geçtikçe artan bir konudur. Simülasyon, gerçek bir sistemin ya da bir sürecin bilgisayar yardımıyla modelini kurmak ve bu kurulan modelle, sistem ya da sürecin hem davranışını incelemek hem de sistemin değişik şartlar altında işleyişini belirleme işlemidir (Shannon 1975). Geçmiş yıllarda, fiziksel bilimler yalnızca deney ve teori ile karakterize edilebiliyordu. Bilindiği gibi deneylerde, çeşitli ölçümler sonucunda sistemin belirli özelliklerini sayısal biçimde ifade eden sonuçlar elde edilir. Deneysel çalışmalar her zaman sistemin özelliklerini belirleyebilmek için en gerçekçi yöntem olsa da, her sisteme uygulanabilirliğinin zorluğu deneysel yöntemin önemli bir dezavantajıdır. Teorik çalışmalarda ise sistemin bir modeli matematik denklem takımları ile kurulur ve daha sonra ise bu model, sistemin davranışını tasvir eden denklemlerin çözümünü kolaylaştıracak şekilde geçerli hale getirilir. Teorinin olumsuz yanı ise; model kurulurken çözümü kolaylaştırmak ve karmaşıklıkları gidermek için kullanılan yaklaşımlar ve sadeleştirmelerin, sistemin özellikleri ile ilgili gerçek değerlerinden bir miktar sapmaya yol açmasıdır. Fakat yine de teorik çalışmalar, sistemler için basit ve kullanışlı ifadeler üretir. Teorik yöntemlerde karşılaşılan en büyük zorluk, çok parçalı sistemlere uygulanabilirliğinin neredeyse mümkün olmamasıdır. Günümüzde yüksek hızlı bilgisayarların gelişimi ile birlikte, tüm bu zorlukların üstesinden gelebilmek için teori ile deney arasına “bilgisayar deneyi” denilen yeni bir unsur girmiştir. Bilgisayar deneyinde modeli hala teorikçiler kurmakta olup hesaplamaları belirli bir yönergeyi izleyen makineler yapmaktadır. Bilgisayar deneyleri olarak tarif edilen bu süreç aslında bilgisayar simülasyonlarıdır. Simülasyonlara bazen bir teori, bazen de bir deney gözüyle bakılmaktadır. Simülasyon çalışmalarında, bir yandan hala teorik olarak kurulmuş modellerle uğraşılırken, öte yandan deneysel fizikçinin yaptığı gibi, sistem istenilen şekilde değiştirilebilir ve daha sonra da sonuçlar analiz edilir. Simülasyon, bu haliyle ne tam olarak teori ne de tam olarak deney sınıfına sokulabilir. Bilgisayar simülasyonlarını, düşünce deneyleri ya da başka bir deyişle gerçekte olması tam olarak mümkün olmayan fakat sonuçları ile olayları anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştıran teorik bir sistem olarak düşünebiliriz (Ercolessi 1997). Bu anlamda simülasyon, sistemin mikroskobik detaylarından (atomların kütleleri, atomlar arası etkileşim, moleküler geometri vs.) deneyin makroskobik verilerine (durum denklemi, yapısal düzen parametresi vs.) doğru bir geçiş sağlar (Alder and Wainwright 1957). Diğer yandan simülasyon, sadece deneyle teori arasında bir bağlantı değil, aynı zamanda çok farklı uygulama alanlarında gelişimini sürdüren güçlü bir araçtır. Endüstriyel ve teknolojik alanlarda birçok yeni maddenin

geliştirilmesi ile bu maddelerin deneysel ortamlarda kullanılabilirliğinin zorluğu da göz önünde bulundurularak bilgisayar simülasyonlarına olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bilimsel araştırmalarda da, mikro yapıdaki kimyasal olayların ve fiziksel özelliklerin simülasyon tekniği ile incelenmesi önemli bir adım olmuştur. Günümüzde özellikle atomik düzeyde simülasyon, yoğun madde fiziği ve malzeme biliminin birçok alanında gittikçe önem kazanan bir araç haline gelmiştir (Kart et al. 2005).

4.3 SİMÜLASYON TEKNİKLERİ

Bilgisayar simülasyon yöntemleri nümerik olarak problem çözmede son derece etkilidir. Bu sebeple bilgisayar simülasyonları, günümüzde farklı amaçları gerçekleştirmek için pek çok alanda yaygınlaşan ve çok değişik alanlarda uygulanabilen bir araç haline dönüşmüştür. Son zamanlarda, simülasyon teknikleri; ekonomi, pazarlama, eğitim, politika, ulaşım, sosyal bilimler, davranış bilimleri ve sayısal bilimler gibi pek çok değişik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilimsel amaçlı ilk simülasyon çalışması, Von Neuman ve Slam tarafından II. Dünya savaşı sırasında atom bombasının geliştirilmesi ve anlaşılmasına yardımcı olmak için yapılmıştır. Simülasyonların modern çağı ise 1950'lerde uygun programlama dillerinin geliştirilmesi ile başlamıştır. Bilgisayar yazılım ve teknolojilerinin gelişimi ile birlikte, geçmişten günümüze kadar açıkça anlaşılamayan ve deneysel olarak ortaya konması mümkün olmayan bir çok teorik çalışma, simülasyon teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Bilgisayar simülasyonları yardımıyla analitik çözümü tam olarak yapılamayan problemlerin çözümleri yapılabilmekte, karmaşık sistemlerin incelenmesini ve bunların davranışlarının açıklanması mümkün kılınmaktadır. Ayrıca, kuramsal fizik alanında ortaya atılan varsayımların geçerliliği, simülasyon hesaplarıyla kolayca gösterilebilir.

Fizik bilimi alanında klasik yaklaşımı temel alan bilgisayar simülasyonları, Monte Carlo (MC) ve Moleküler Dinamik (MD) olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Bunlara ek olarak her iki tekniğin özelliklerini bir arada barındıran karma simülasyon teknikleri de vardır. Daha önce de ifade edildiği gibi bir sistemin simülasyonu, bu sistemi temsil edebilecek bir model oluşturma işlemidir. Model, incelenecek herhangi bir sistemin temsilidir ve sistemi açıklamak, anlamak veya geliştirmek için kurulur. Modeller, temsil ettiği sistem üzerinde hesaplamaların ve işlemlerin yapılarak incelenmesine olanak sağlar. Bu sayede gerçek sistemin davranışları ve

yapısı hakkında bilgiler edinilir (Gibson et al. 1960). Simülasyon modelleri, sistemin davranışlarının incelenmesi bakımından deterministik ve stokastik olarak iki gruba sınıflandırılabilir. Deterministik modeller davranışı daha önceden tahmin edilebilen, rastgele değişken içermeyen ve gelecekte ne tür davranışlara gireceği bilinen modellerdir. Bu modellerde, sistemdeki mekanizma açık ve belirgin bir şekilde tanımlanır ve sistemin davranışı önceden tahmin edilebilir. Stokastik modellerde ise sistemin davranışı daha önceden bütünüyle kestirilemez ve en az bir tane rastgele değişken içinde barındırır. Yani stokastik simülasyon modelleri, girdi olarak bir veya daha fazla rastgele değişkeni göz önüne almaktadır. Sonuçlar rastgeleliğe dayandığı için, elde edilen sonuçlar modelin gerçek karakteristiklerinin tahminleri olarak göz önüne alınabilirler. Bu tip modellerde süreç, olasılık dağılımları ile temsil edilebilmektedir. Stokastik modeller deterministik olanlardan daha karmaşık olduğu için bu modellere çözümler bulmak ve bulunan çözümlerin analitik olarak yeterli olması deterministik modellere kıyasla daha güçtür. Bu tanımlamalara göre Monte Carlo tekniği stokastik simülasyon, Moleküler Dinamik tekniği ise deterministik simülasyon modelidir.

4.3.1 Monte Carlo Yöntemi (MC)

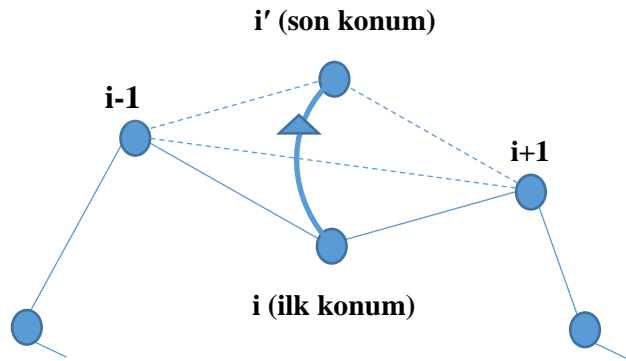
Monte Carlo metotları, rastgele sayılar kullanarak konformasyon uzayının modellenmesi için uygulanan sayısal tekniklerdir. Yöntemin temelinde rastgelelik olunca devreye bu iş için kullanılan rastgele sayı üreticileri girmektedir. Rastgele sayı üreticileri $[0,1]$ arasında rastgele sayı üretmek amacıyla tasarlanmış algoritmalar (Knuth 1969). Monte Carlo metotları, hızlı ve etkili bir şekilde rastgele sayı üretilmesine sıkı bir şekilde bağlıdır. Bunun yanında yeterli kalitede olmayan bir rastgele sayı üretici, Monte Carlo simülasyonlarında sistematik hatalara yol açabilir. Bu sebeple, burada iki önemli noktaya dikkat çekilmelidir ki; bunlardan biri rastgele sayıyı oluşturan algoritmalar iken, diğeri ise bu rastgele sayı üreticilerinin kalitesini belirlemek için kullanılan test yöntemidir. İdealde rastgele sayı üreticinin vereceği sayı dağılımının

- i) Her yerde aynı özelliği göstermesi (aynı rastgelelikte olsun, uniform),
- ii) Birbiriyle ilişkili olmaması,
- iii) Mümkün olduğu kadar büyük bir periyoda sahip (çok uzun bir süre kendini tekrarlaması) olması,

sağlaması istenilen özelliklerdir (Landau and Binder 2014),

Fakat pratikte bunları gerçekleştirmek o kadar kolay değildir. Hatta rahatlıkla söylenilebilir ki; hem rastgele sayı üreticilerinde hem de onların kalitesini test edecek yöntemlerde, hala bazı problemler vardır. Önemli olan hedef çalışmaya ve algoritmaya uygun ve kaliteli bir rastgele sayı üreticini kullanmaktır (Coddington 1994).

MC metodu genel olarak iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama yeni konformasyonun üretilmesi aşamasıdır. Bu üretilen her konfigürasyonun fiziksel olması gerekmez. Yeni konformasyonun elde edildiği bu ilk aşamada, öncelikle tüm dinamik değişkenler (ξ_i) için birer değer atanır. Burada, dinamik değişkenler molekülleri oluşturan atomların konumlarıdır ve bu konumlar rastgele olarak atanır. Bu değerler kullanılarak yerel enerjileri hesaplanır. Her bir simülasyon adımında dinamik değişkenler değiştirilerek, yeni konformasyonlar oluşturulur. Atomların konumları, açıların rastgele değiştirilmesiyle yeniden üretilir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 MC simülasyonda atomların konumlarının değiştirilerek yeni konfigürasyonların elde edilmesinin şematik gösterimi.

MC metodlarının ikinci aşamasında ise oluşturulan yeni konformasyonun kabul edilebilirliği test edilir. Bunun için, yeni atom konumları için hesaplanan enerji değerleri hesaplanır ve olasılık fonksiyonu yazılır (Eşitlik (4.1)).

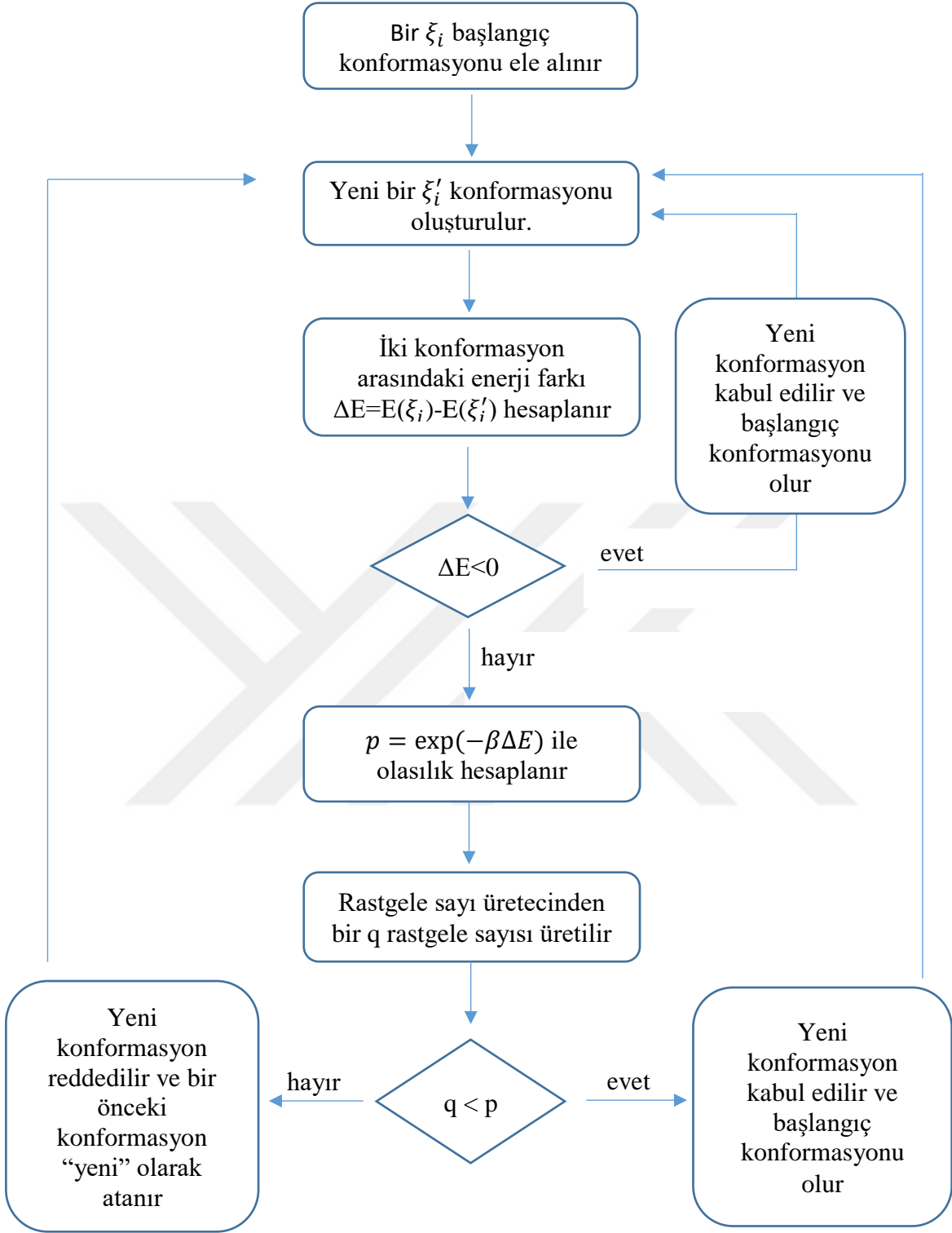
$$W(\{\xi_i\} \rightarrow \{\xi'_i\}) = \begin{cases} \exp[-\beta(E' - E)], & E' \geq E \\ 1, & E' < E \end{cases} \quad (4.1)$$

Burada k_B Boltzmann sabiti ve T sıcaklığı göstermek üzere $\beta = 1/k_B T$ şeklinde ifade edilir. E' yeni enerji değeri ve E eski enerji değeri olmak üzere, yeni hesaplanan konformasyonun enerjisi öncekinden küçükse kabul edilir. Eğer yeni enerji eskisinden büyükse bu durumun olasılığı aşağıdaki olasılık fonksiyonu yazılarak test edilir.

$$p = \exp(-\beta \Delta E) \quad (4.2)$$

burada $\Delta E = E' - E$ iki durumun enerji seviyeleri arasındaki farktır. Program bu şekilde bir durumla karşılaştığı her seferde bu konformasyonun olasılık fonksiyonu (p) ile rastgele sayı üreticiden çağırdığı rastgele sayıyı (q) ile karşılaştırır ve eğer $p > q$ ise değişim kabul edilir, $p < q$ ise değişim reddedilir.

Bu kısım Metropolis testi olarak adlandırılır (Metropolis et al. 1953). Eğer konformasyon kabul edilmezse kabul edilebilen bir konformasyon bulununcaya kadar aynı işlemler devam eder. Kabul edilebilir bir konformasyon bulunduğu anda ise bu ilk konformasyon olarak alınır ve bu konformasyon değiştirilir. MC yönteminin temel amacı rastgele yeni konformasyonlar üretmek ve bunların kabul edilebilirliğini test etmektir. Genel olarak MC yönteminin tüm bu işleyişi Şekil 4.2' de akış şeması olarak sunulmuştur;



Şekil 4.2 MC yönteminin akış şeması.

Monte Carlo simülasyonlarında sıcaklık önemli bir rol oynar ve genel olarak Monte Carlo simülasyonları, düşük enerji durumlarına yaklaşma eğilimindedir. Fakat yüksek sıcaklıklarda (β küçük değerlerinde), yüksek enerji değerlerine gitme olasılığı vardır. Bu olasılık, düşük

sıcaklıklarda küçüktür ve $T \rightarrow 0$ limit durumunda ortadan kalkar. Bundan dolayı, konformasyon uzayının genel modellenmesi için düşük sıcaklık Monte Carlo simülasyonları sıklıkla kullanılır. Monte Carlo simülasyonları birçok farklı alanda popülerdir. Bunun nedeni, kullanımının kolay olması ve iyi bir yakınsama özelliğine sahip olmasıdır. Bununla beraber, kabul edilen konformasyonların tüm konformasyonlara oranı olarak tanımlanan kabul edilebilirlik oranının, Monte Carlo metodunda düşük olması bu metodun verimliliğini düşürmektedir.

4.3.2 Moleküler Dinamik Yöntemi (MD)

Literatürdeki ilk Moleküler Dinamik simülasyon çalışması Alder ve Wainwright tarafından 1957 yılında dengedeki bir sistem için yapılmıştır. Bu çalışmada küre (hard spheres) sisteminin, özellikle katı ve sıvı bölgeleri dikkate alınarak faz diyagramı incelenmiştir (Alder et al. 1957). 1960 yılında ise Gibson ve arkadaşları tarafından 500 atomdan oluşan bir sistemde sonlu farklar zaman integrasyonu yöntemine dayanan sürekli potansiyellerin kullanıldığı ilk moleküler dinamik simülasyon örneği yapılmıştır (Gibson et al. 1960). Moleküler dinamik metodunda en çok dikkat çeken gelişme ise 1964 yılında Rahman tarafından yapılan çalışma ile olmuştur. Bu çalışma, sıvı Argon için Lennard-Jones potansiyelinin kullanıldığı ilk simülasyondur (Rahman 1964). Proteinler ile ilgili ilk moleküler dinamik çalışma ise 1977 yılında McCammon tarafından gerçekleştirilmiştir (McCammon et al. 1977). Geçmişten günümüze kadar, MD simülasyonları elektronikten biyomoleküllere kadar uzanan geniş bir yelpazede gelişim göstermeye devam etmektedir.

MD, protein ve DNA gibi birçok biyolojik makromolekülün konformasyonel yapılarının zaman içerisindeki değişimi hakkında birçok bilgi sağlamaktadır. Ayrıca MD yöntemleri kullanarak başka bir şekilde elde edilemeyecek bir zaman ölçeğinde, bu biyolojik makromoleküllerin kinetik ve termodinamik özellikleri hakkında önemli bilgiler edinilebilmektedir. Özellikle bu yönü ile MD simülasyonlar, bir sistemin zaman içerisindeki evrimini anlamamızı kolaylaştıracak bir araç olmaktadır.

Moleküler dinamik simülasyon metodunda çok parçacıktan oluşan sistemlerin özelliklerini belirlemede deterministik bir yaklaşım söz konusudur. Başka bir deyişle, MD yöntemlerde göz önüne alınan sistemin başlangıç koşullarının bilinmesiyle birlikte bir sonraki adım için sistemin zamana bağlı davranışlarının incelenmesi mümkündür. Bu simülasyonlar, genel olarak “başlangıç aşaması (hazırlık)”, “sistemin integrasyonu” ve “sonuçların analiz edilmesi” şeklinde üç temel adım altında gerçekleştirilir.

Simülasyonun başlangıç aşamasında, öncelikle incelenen sistemin içerisindeki atomik etkileşimlerin her birini içinde barındıran bir kuvvet alanının seçilmesiyle işe başlanır. Daha sonra sistemi oluşturan parçacıkların başlangıç konumları ve hızları belirlenir. Başlangıç konumları genellikle deneysel verilerden alınırken, başlangıç hızları ise Maxwell-Boltzmann dağılımına uyacak şekilde seçilir. Bu dağılım;

$$\propto \int \exp\left(-\frac{1}{2}\beta m v^2\right) dv \quad (4.3)$$

ile orantılıdır, burada k_B Boltzmann sabiti ve T sıcaklık olmak üzere $\beta = 1/k_B T$ dir. Bu dağılım verilirken kütle merkezinin hızı sıfır olmalıdır. Bunun dışında toplam enerji, çizgisel ve açısal momentum bileşenleri de korunmalıdır. Genellikle bir ürün simülasyona başlanmadan önce enerji minimizasyonu yapılması önerilmektedir. Enerji minimizasyon ile ilgili literatürde birkaç teknik olup ve bunların temel mantığı, tüm parçacıklar üzerinden kuvvet hesaplanarak sistemin minimum enerjili bir noktaya hareket ettirilmesidir. Enerji minimizasyon teknikleri hakkında detaylı bilgi bu bölüm içerisinde ileride verilecektir.

İkinci aşamada ise belirli istatistiksel küme koşulları altında, tüm parçacıklar üzerinden kuvvet hesaplanarak hareket denklemlerinin sayısal integrasyonu ile çözüme geçilir. Burada amaç, elde edilmek istenilen küme özelliklerine uygun termodinamik koşullar zamanla sabitleşene kadar simülasyonlar yapmaktır. Bu aşamaya sistemin dengelenmesi aşaması da denilmektedir. Daha sonra ise dengelenen sistemler kullanılarak yine uygun istatistiksel küme koşulları altında ürün simülasyonları gerçekleştirilir.

Üçüncü ve son aşamada ise dengelenmiş ve ürün simülasyonları yapılmış sistemde tüm nicelikler üzerinden analizler yapılmaktadır.

MD, bir sistem içindeki moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri hesaba katarak, her bir moleküldeki her bir atom için Newton, Lagrangian veya Hamilton gibi klasik fizik hareket denklemlerinden uygun olan birini çözerek istatistiksel bir küme oluşturur. MD simülasyonlar sayesinde, mikroskobik ölçekte yapılan simülasyonlarla bir sistemin makroskobik özelliklerini elde etmek mümkün olmaktadır. Burada mikroskobik simülasyonlarla makroskobik özellikler arasındaki bağlantı ise istatistiksel kümeler ile kurulmaktadır.

4.3.2.1 Moleküler Dinamik Yönteminde İstatistiksel Kümeler

Sistemin durumunu belirleyen sıcaklık, basınç, parçacık sayısı gibi parametre setine sistemin termodinamik durumu denir. Bir sistem, konumu q ve momentumu p olmak üzere $(q;p)$ koordinatları cinsinden faz uzayındaki bir nokta olarak temsil edilir ve bu nokta “ Γ ” ile gösterilir. İstatistiksel küme bir sistemi oluşturan parçacıkların yerlerinin ve hızlarının farklı oluşundan elde edilen, belirli termodinamik durumun şartlarını sağlayan faz uzayındaki noktalar topluluğudur. Moleküler dinamik, zamanın fonksiyonu olarak faz uzayında $(q;p)$ noktalar serisi üretir. Bu noktalar aynı topluluğa ait olup sistemin değişik şekillerine ve bu şekillerin momentumlarına karşılık gelir. Moleküler dinamikte kullanılan kümeler sistemin bulunduğu koşullara göre değişir ve bu koşullar için kullanılan başlıca kümeler;

Mikrokanonik Küme (NVE): Sabit atom sayısı N , sabit hacim V ve sabit enerji E ile karakterize edilen termodinamik durumdur. Bu durum izole edilmiş sisteme karşılık gelir.

Kanonik Küme (NVT): Sabit atom sayısı N , sabit hacim V ve sabit sıcaklık T ile karakterize edilen durumdur. Sıcaklığı koruyarak sabit sıcaklıkta simülasyonlar gerçekleştirebilmek için, bir şekilde sistemin bir ısı banyosuna bağlanmasını veya farklı algoritmaların kullanılmasını gerektirir.

İzotermal-İzobarik Küme (NPT): Sabit atom sayısı N , sabit basınç P ve sabit sıcaklık T ile karakterize edilen topluluktur. Deneysel çalışmaların çoğu sıcaklık ve sabit basıncın sabit olduğu ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Simülasyon ortamında deneysel koşulları oluşturabilmek için hem sıcaklığın hem de basıncın korunması gerekmektedir. Bunun içinde sistemin bir ısı ve basınç banyosuna bağlanması ve ya bu koşulları yaratacak farklı algoritmaların kullanılması gereklidir.

Moleküler dinamikte genellikle fiziksel bir niceliği ölçmek, sistemin fiziksel özelliklerinin zaman ortalamalarını almak anlamına gelir. Fiziksel nicelikler konum ve hızın fonksiyonu olarak yazılırlar. İstatistik mekanikte, enerji, hız, ivme gibi gözlenebilen niceliklere karşılık gelen ortalamalar doğrudan küme ortalamalarının alınmasıyla hesaplanır. Küme ortalaması eş zamanlı olarak incelenen sistemin çok sayıda kopyası üzerinden alınan ortalamadır ve aşağıdaki gibi verilebilir.

$$\langle A \rangle_{k\ddot{u}me} = \iint dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N) \quad (4.4)$$

Burada $A(p^N, r^N)$ ilgilenilen niceliktir ve sistemin konumları (r), ve momentumları (p)'nin cinsinden ifade edilir. $\rho(p^N, r^N)$ ifadesine ise olasılık yoğunluğu denir ve şöyle verilir:

$$\rho(p^N, r^N) = \frac{1}{Z} \exp \left[\frac{-H(p^N, r^N)}{k_B T} \right] \quad (4.5)$$

Burada H Hamiltonyen, T sıcaklık, k_B Boltzmann sabiti, Z üleşim fonksiyonudur. Üleşim fonksiyonu;

$$Z = \iint dp^N dr^N \rho(p^N, r^N) \exp \left[\frac{-H(p^N, r^N)}{k_B T} \right] \quad (4.6)$$

ifadesiyle hesaplanır fakat bu integral sistemin mümkün olan bütün durumları üzerinden alındığından hesaplanması oldukça zordur.

Şimdiye kadar, spesifik termodinamik değişkenleri hesaplamak için klasik mekanik kullanarak uygun ifadeler elde edilmeye çalışılmıştır. N parçacıklı bir sistem için önerilen bu denklemler çok boyutludur (10^{23}) ve bu nedenle çözülmesi neredeyse imkânsızdır. İncelenecek sistemlerle ilgili hesaplamalar yapabilmek için bir varsayımda bulunulması gerekmektedir. Bunun için önerilen sistemde ilgilenilen A niceliğinin küme ortalamasını almak yerine, zaman ortalaması belirlenmektedir. Çünkü “Ergodic Hipotezi’ne” göre incelenen herhangi bir niceliğin zaman ortalaması küme ortalamasına eşittir. Sistemin ergodik olduğu varsayımı altında;

$$\langle A \rangle_{k\ddot{u}me} = \langle A \rangle_{zaman} \quad (4.7)$$

ifadesi geçerli olmaktadır. Bir niceliğın zaman ortalaması

$$\bar{A} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(p(t)^N, r(t)^N) dt \gg \frac{1}{M} \sum_{t=1}^M A(p(t)^N, r(t)^N) \quad (4.8)$$

eşitliğı ile verilir. Burada t simülasyon zamanına, M simülasyondaki zaman adımı sayısına, $A(p(t)^N, r(t)^N)$ ise A ’nın ani değerine karşılık gelir. Zaman ortalamasının hesaplamasında temel mantık sistemin süresiz olarak gelişimine izin verilip bu sayede mümkün olan bütün durumlardan geçmesini sağlamaktır. Buna göre MD simülasyonlarının amaçlarından biri de sistemi, bu eşitliğı sağlayacak şekilde yeterince temsili parçacıkla oluşturmaktır. İstatistiksel fiziğe göre faz uzayında hareket eden bir sistem gözlemlendiğinde, eğer yeterince uzun süre beklenilirse sistem nihayetinde sistemi kontrol etmek için uygulanan kısıtlamalarla tutarlı olan tüm mikroskobik durumları ziyaret edecektir.

İncelenecek küme özellikleri belirlendikten sonra MD simülasyonu ile çok parçacıklı bir sistemi doğru bir şekilde ifade edebilmek ve mikroskobik ölçekteki simülasyonlarla makroskobik özelliklere ulaşabilmek için, Newton, Hamiltoniyen ve Lagrangien hareket denklemlerinden uygun olan herhangi biri kullanılabilir. Sistemin kuvvet alanının (potansiyel enerji fonksiyonu) tanımlanması atom ve molekül topluluklarının hareketlerini anlamak için önemlidir. Bu etkileşme potansiyellerinin bilinmesi sayesinde, Newton hareket denkleminin çözümünden (integrasyonundan), her bir atom üzerindeki kuvvet hesaplanıp, sistemdeki atomların ivmeleri belirlenir.

4.3.2.2 Moleküler Dinamik Yönteminde İntegrasyon Algoritmaları

MD yöntemlerinde hareket denklemlerini çözmek için birçok integrasyon algoritması bulunmaktadır. Hareket denkleminin integrasyonundan parçacığın zaman içinde değişen ivmesini, hızını ve yerini belirten yörüngesi elde edilir. Daha sonra elde edilen bu yörüngeden istenilen özelliklerin ortalama değerleri belirlenebilir. Bu metot belirleyicidir (deterministik), çünkü herhangi bir anda her bir atomun yeri ve hızı biliniyorsa, sistemin durumu geçmişte veya gelecekteki herhangi bir zaman için de belirlenebilir.

N tane atomdan oluşan bir sistem için Newton hareket denklemi aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i(t) \quad (i = 1, 2, 3, \dots, N) \quad (4.9)$$

Bu eşitlik de, r_i ve m_i sırasıyla i . atomunun pozisyonunu ve kütesini ifade etmektedir. F_i ise t zamanındaki i . atom üzerine uygulanan toplam kuvveti gösterir. Korunumlu kuvvet, potansiyel enerjinin gradyanı olarak ifade edilebildiğinden aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla}_i U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (4.10)$$

Eşitlik (4.9) ve eşitlik (4.10) birleştirilirse;

$$-\frac{\partial U}{\partial r_i} = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (4.11)$$

ifadesi oluşturulabilir. Hareket denklemi olan bu ifadenin basit çözümünden Eşitlik (4.12)-(4.14)' de ifade edilen terimler elde edilir.

$$\vec{a} = \frac{\vec{F}}{m} \quad (4.12)$$

$$\vec{v} = \vec{v}_0 + \vec{a}t \quad (4.13)$$

$$\vec{x} = \vec{x}_0 + \vec{v}_0t + \frac{1}{2}\vec{a}t^2 \quad (4.14)$$

Bu denklemlerden görüleceği gibi yörüngenin hesaplanması için atomların başlangıç yerlerinin, başlangıç hız dağılımlarının ve potansiyel enerjinin gradyantından belirlenebilen ivmelerinin bilinmesine ihtiyaç vardır. MD simülasyonlarında atomların başlangıç konumları, deneysel yapılardan veya sayısal algoritmalar tarafından belirlenebilir. Hızların başlangıç dağılımları ise genellikle Maxwell-Boltzmann dağılımına uyacak şekilde rastgele dağılımlardan elde edilir. Rastgele hız dağılımlarının büyüklükleri istenilen sıcaklığı sağlamalı ve bütün momentumların toplamları sıfır olmalıdır. Başka bir deyişle hareket denklemi belirleyicidir; atomların başlangıçtaki yerleri ve hızları biliniyor ise her hangi bir zamandaki hız ve yerleri belirlenebilir.

MD yönteminde, hareket denklemlerini zamana göre integre ederek moleküllerin pozisyonlarını hesaplayan sonlu fark algoritmaları kullanılmaktadır. Bunların temeli, bir “ t ” anında parçacığın bilinen konum, hız ve diğer dinamik bilgilerini kullanarak “ $t + \Delta t$ ” anındaki bilgilerini hesaplamaktır. Bu yöntemlerin uygulanmasında aşağıdaki esaslar temel alınır;

1. İntegrasyon küçük zaman aralıklarına bölünür.
2. Bir parçacığa t zamanında etkiyen kuvvet, atomların pozisyonlarına göre kuvvet alanından hesaplanır.
3. Kuvvetten ivme belirlenir.
4. Buradan Δt süre sonraki konum ve hız belirlenir.
5. t ile $t+\Delta t$ zaman aralığında kuvvetin sabit kaldığı kabul edilir.

İntegrasyon algoritmalarının seçiminde çeşitli kriterler göz önüne alınır. Bu kriterlerden en çok dikkat edilenleri, integrasyon için yeterli zaman adımına izin vermesi, hızlı olması, algoritmanın enerji ve momentum terimlerini içermesi, etkili bir şekilde hesaplamalara yön verebilmesi sayılabilir. Bu sayısal algoritmaların çözümleri ile istenilen termodinamiksel niceliklere sahip toplulukların (ensemble) konformasyonel yörüngeleri (trajektörileri) elde edilmektedir. Bu algoritmalarından en çok kullanılanları Verlet algoritması, Leap-Frog algoritması ve Verlet hız algoritmalarıdır.

Yukarıda bahsi geçen temel integral algoritmalarından, Verlet algoritması en önemlisi olup diğerleri onun çeşitli varyasyonlarından oluşmaktadır. Bu algoritmaların hesaplama mantığı şu şekildedir. İlk olarak Taylor seri açılımı yardımıyla küçük bir Δt zaman adımı düşünülerek incelenen sistemdeki t anı için i parçacığının bilinen konum ve hız gibi dinamiksel 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 sırasıyla Eşitlik (4.15)-(4.17)' deki gibi Taylor seri açılımları ile ifade edilirler (Verlet 1967).

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dr(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2r(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \quad (4.15)$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{dv(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2v(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \quad (4.16)$$

$$a(t + \Delta t) = a(t) + \frac{da(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2a(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \quad (4.17)$$

Bu ifadelere göre Verlet algoritması şöyle yazılabilir. Parçacığın konumunun Δt zamanı kadar öncesi ve sonrasını yazılırsa

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dr(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2r(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \quad (4.18)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - \frac{dr(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2r(t)}{dt^2} \Delta t^2 - \dots \quad (4.19)$$

eşitlikleri elde edilir. Bu iki eşitlik kullanılarak parçacığın $t + \Delta t$ anındaki konumu

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t)\Delta t^2 \quad (4.20)$$

şeklinde ifade edilir. Bu eşitliğe göre Verlet algoritması t anındaki konum ve ivme değerleri ile $t - \Delta t$ anındaki konum değerlerini kullanarak $t + \Delta t$ anındaki yeni pozisyonları hesaplar. Ayrıca, Verlet algoritmasının hızlar gerekmeden, moleküllerin pozisyonlarını hesapladığı Eşitlik 4.20' den görülmektedir. Ancak kinetik enerjiyi veya toplam enerjiyi belirlemek için hızların hesaplanması gerekmektedir. Hız yine Eşitlik 4.18 ve 4.19 kullanılarak

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (4.21)$$

biçiminde elde edilir. Verlet algoritması uygulanması kolay olmasına rağmen $t = 0$ olduğu durumda hesaplama yapabilmek için $t = -\Delta t$ zamanındaki pozisyonlara ihtiyaç vardır. Ayrıca hızların hesaplanmasında da bir dezavantaja sahiptir. Hızları hesaplarken o anda mevcut olan hızları hesaplar. Fakat bir sonraki pozisyonların belirlenmesi bir sonraki hızlara bağlıdır. Bunu geliştirmek için birçok modifikasyonlar yapılmıştır.

Leap-Frog algoritmasında ise; konum ve hız ifadeleri aşağıdaki eşitlikler ile bulunabilir. Bu algoritma ile hızlar net bir şekilde hesaplanabilir (Hockney 1970).

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \Delta t \quad (4.22)$$

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) a(t)\Delta t \quad (4.23)$$

$$v(t) = \frac{1}{2}\left[v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)\right] \quad (4.24)$$

Orijinal Verlet ve Leap-Frog Verlet algoritmalarında kuvvet hesabı ilerleyen aşamada gerçekleşirken Hız-Verlet algoritmasında ise aynı aşamada hesaplanır. Böylece hız ve konumun aynı anda (senkronize) hesaplanması sağlanır.

Verlet algoritmasının en çok kullanılan varyasyonu Verlet Hız olarak adlandırılan konum ve hızların eşit zaman aralıklarına karşılık gelecek şekilde hesaplandığı algoritmadır. Genel olarak konum ve hız sırasıyla Eşitlik (4.25) ve Eşitlik (4.26)' da verilen eşitliklerden hesaplanır.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dr(t)}{dt}\Delta t + \frac{1}{2}\frac{d^2r(t)}{dt^2}\Delta t^2 \quad (4.25)$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{1}{2}\left[\frac{d^2r(t)}{dt^2} + \frac{d^2r(t + \Delta t)}{dt^2}\right]\Delta t \quad (4.26)$$

Bunların dışında MD yönteminde kullanılan daha birçok integrasyon yöntemleri mevcuttur.

4.3.2.3 Enerji Minimizasyonu

Bir proteinin doğal konformasyonu, termodinamik açıdan en küçük serbest enerjiye sahip durumdaki kararlı yapısıdır. Bu sebeple Moleküler Dinamik tekniğinde enerji minimizasyonu modellemenin doğru yapılabilmesi açısından son derece önemlidir. Bir MD simülasyonunda enerji minimizasyonu sistemin belirli istatistiksel koşullar altında dengelenmesinden önce, sistemdeki kötü kontakları ve uygun olmayan geometriyi yok etmek için yapılır.

Minimizasyondaki amaç, modellenen sistemdeki enerjiyi temsil eden bir $f(x)$ fonksiyonunda tüm x değerleri için $f(x_0) \leq f(x)$ ifadesini sağlayan bir x_0 değeri bulmaktır. Enerji minimizasyonu için birçok algoritma bulunmaktadır. Bu algoritmalarındaki temel düşünce, belirli bir mertebeye kadar türevi hesaplanabilen sürekli fonksiyonlarda uygun doğrultu ve adım büyüklüğünde ilerleyip minimumlarının bulunmasıdır.

4.3.2.3.1 Steepest Descent Algoritması

Steepest Descent, algoritması minimizasyon için en etkin algoritma olmamasına karşın güçlü ve uygulanması kolay bir algoritmadır. Öncelikle bir “ r ” konum vektörü tanımlanıp kuvvet F , ve potansiyel enerji U hesaplanır. Atomların yeni konumları şu eşitlik ile bulunur;

$$r_{n+1} = r_n + \frac{F_n}{\max(|F_n|)} \quad (4.27)$$

Burada; r_n maksimum yer değiştirme, F_n kuvvet veya potansiyel enerjinin gradyanı ve $\max(|F_n|)$ ise kuvvetin maksimum büyüklüğüdür. Atomların yeni konumlarının hesaplanmasından sonra, kuvvet ve enerji bu yeni konuma göre tekrar hesaplanır. Yeni konuma göre hesaplanan potansiyel enerji bir önceki potansiyel enerjiden küçükse yani $U_{n+1} < U_n$ ise yeni pozisyon kabul edilir değilse yeni pozisyon reddedilir. Algoritma belirlenen iterasyon sayısına ulaştığında son bulur.

4.3.2.3.2 Conjugate Gradient Algoritması

Conjugate Gradient metodu Steepest Descent metoduna göre daha yavaştır. Conjugate Gradient metodunda kuvvet vektörü, potansiyel enerjinin gradyantının eksi işaretlisi olarak tanımlanmıştır. Gradyant vektörü verilen fonksiyonun en büyük artış yönünü gösterir. Bu nedenle, kuvvet vektörü potansiyel enerjideki en büyük azalış yönünü gösterir. Potansiyel enerjinin minimumu, gradyanti sıfıra eşitleyerek elde edilen denklemin r^N için çözümü ile bulunur. Buradaki fikir, başlangıç konumu bilinen sistemi kuvvet vektörü doğrultusunda hareket ettirmektedir. Bunun için uygulanan iterasyon

$$r_{m+1} = r_m + \alpha_m d_m \quad (4.28)$$

şeklinde ifade edilir. Burada d_m adım yönüdür ve α_m adım yönünde potansiyel enerjiyi minimize eden adım uzunluğudur.

4.3.2.3.3 Benzetişimli Tavlama (Simulated Annealing) Algoritması

Benzetişimli tavlama (SA; Simulated Annealing) yöntemi ilk olarak Kirkpatrick, Gelatt ve Vecchi tarafından önerilmiş, olasılık tabanlı bir algoritmadır (Kirkpatrick et al. 1983). İncelediğimiz fiziksel sistemlerin en büyük veya en küçük enerji değerlerinin bulunması ve özellikle pek çok yerel minimuma sahip sistemlerin en küçük enerji değerlerinin bulunması için tasarlanmıştır. SA algoritmasını diğer optimizasyon metodlarından ayıran önemli özelliklerden birisi de, büyük oranda yerel minimumlardan kurtulabilme kabiliyetinin olmasıdır.

Bu algoritma, katı cisimlerin soğurken mükemmel şekilde atomik dizilişlerini örnek alarak tasarlanmıştır. Malzemelerin atomları yüksek sıcaklıklarda yüksek enerji seviyelerindedir ve düzgün dizilimler için daha fazla hareket serbestliğine sahiptirler. Sıcaklık düştüğünde ise atomik enerji azalır ve düzgün yapı bir kristal sağlandığında sistem minimum enerjiye sahip olur. Fiziksel sistemin hızlı soğutulması sonucu sistem, her zaman en düşük enerjili duruma gelmeyebilir. Fakat soğutma işlemi yavaş yapılırsa sistem en düşük enerjili durumuna

erişecektir (Thompson and Dowsland 1995). Verilen bir T sıcaklığında incelenen sistemin enerjilerinin olasılık dağılımı Eşitlik (4.29)' da ki gibi belirlenir:

$$p(E) = e^{-E/k_B T} \quad (4.29)$$

Burada, E sistemin enerjisi, k_B ise Boltzmann sabitidir. Sistemin durumunda değişiklik yaratılarak yani yüksek sıcaklıklara çıkarılan sistemin soğutulularak düzenli adımlarla SA algoritmasına göre yeni enerjisi hesaplanır. Eğer enerji azalmış ise sistem bu yeni duruma geçer. Eğer enerji artmış ise düzgün dağılımdan 0-1 arasında rastgele bir “ δ ” sayısı üretilir ve bu sayı Eşitlik (4.30)' da verilen şartı sağlarsa, ilgili durum yeni durum olarak kabul edilir. Aksi takdirde, mevcut durum değiştirilmez.

$$\delta \leq e^{\Delta E/k_B T} \quad (4.30)$$

Burada, ΔE , iki durumun enerji seviyeleri arasındaki farktır. SA yöntemi kabaca bu mantıkla çalışır. Eşitlik (4.30)' a göre, yüksek sıcaklıklarda tüm enerji durumları için $p(E)$, 1'e yakınsar. Düşük sıcaklıklarda bile sistemin yüksek enerji seviyesine sahip olması küçük bir olasılıkla görülebilir. Bu nedenle enerjilerin istatistiksel dağılımı sistemin bir bölgesel enerji minimumundan çıkmasına izin verir. SA algoritmasının performansı büyük oranda seçilen soğutma planına bağlıdır. Literatürde önerilen en eski plan Kirckpatrick ve arkadaşlarının ileri sürdükleri plandır. Bu planda T sıcaklık parametresinin başlangıç değeri, denenen tüm hareketler kabul edilecek kadar yüksek seçilmiştir. Sıcaklık parametresinin değerini azaltmak için ise

$$T(t + 1) = rT(t) \quad (4.31)$$

bağıntısı kullanılmıştır. Burada, r değeri 1' den küçük fakat 1'e yakın bir sabittir ve genellikle değeri 0.80 ile 0.99 arasında seçilir. Bu sıcaklık fonksiyonu ile sıcaklık parametresinin değeri sifıra yaklaştıkça daha da yavaş azalmaktadır. Bu tavlama planında, sıcaklık parametresinin her

değerinde elde edilen çözüm belirli sayıda ardışık sıcaklık değişimleri boyunca aynı kalırsa SA algoritması durdurulmaktadır.

4.3.2.4 Moleküler Dinamikte Sıcaklık ve Basınç Kontrolü

Moleküler Dinamikte incelenecek sistemde, arzu edilen istatistiksel küme koşulları altında simülasyonları gerçekleştirmek için, sıcaklık ve basınç gibi bazı termodinamik niceliklerin simülasyonlar esnasında sabit kalması gerekmektedir. Bu nedenle özellikle MD yöntemlerinde sistemin sıcaklığını ve basıncını kontrol amacıyla geliştirilmiş termostat ve barostatlar bulunmaktadır.

4.3.2.4.1 Hız ölçeklendirme metodu

Eşitlik (4.32)' den görüleceği gibi incelenen sistemin sıcaklığı (T), sistemin ortalama kinetik enerjisi ($\langle E \rangle$) ile ilişkilidir.

$$\langle E \rangle = \frac{3}{2} N k_B T \quad (4.32)$$

Dolayısıyla sıcaklığı kontrol altına almak için hızı da kontrol altına almak gereklidir. Bu amaçla kinetik enerjinin hedeflenen sıcaklığı verebilmesi için her adımda hızların yeniden ölçeklendirilmesi gerekmektedir. Herhangi bir “ t ” zamanında sistemin sıcaklığı “ $T(t)$ ” ise ve m kütleli parçacıkların hızlarını bir “ λ ” faktörü ile çarpılırsa sıcaklık farkları için aşağıdaki eşitlikler yazılabilir.

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i}{N k_B} (\lambda v_i)^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i}{N k_B} (v_i)^2 \quad (4.33)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1) T(t) \quad (4.34)$$

Her iki eşitlikten de “ λ ” faktörü,

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_{yeni}}{T(t)}} \quad (4.35)$$

olarak bulunulacaktır. Sıcaklığın istenilen değerde tutulması için, parçacıkların hızlarının her adımda bu “ λ ” faktörü ile çarpılması gerekmektedir. Bundan dolayı bu yönteme “hız ölçeklendirme metodu” denilmektedir. Bu yöntemin dezavantajı, kanonik kümede sıcaklık dalgalanmalarına izin vermemesidir.

4.3.2.4.2 Berendsen sıcaklık çiftlenimi

Berendsen termostatı hız ölçeklendirme yaklaşımı ile benzerdir. Ancak hızların, her zaman adımında hedef sıcaklığa tamamen ölçeklendiğini varsaymak yerine, hızların güncellenmesi için bir zaman ölçeği atar. Bu yaklaşımın temelinde, incelenecek sistemde sıcaklığı kontrol etmek için sistemi bağlanma sabiti (zamanı) olan bir ısı tankı ile etkileşimde tutarak sıcaklığı istenilen değere getirmek vardır (Berendsen et al. 1984). Sıcaklık değişim oranı, sistem ile ısı tankı arasındaki sıcaklık farkı ile orantılıdır ve sistemin modifiye edilmiş hareket denklemi aşağıdaki gibidir.

$$m_i \frac{dv_i}{dt} = F_i + m_i \gamma \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right) v_i \quad (4.36)$$

Burada T_0 ısı tankının sıcaklığı ve “ γ ” çiftlenim parametresidir. Bu parametrenin büyüklüğü sistem ile ısı banyosu arasındaki etkileşimin boyutunu belirler. Sıcaklıktaki değişim;

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau_T} (T_0 - T) \quad (4.37)$$

olmak üzere, modifiye edilmiş hareket denkleminin v den λ_v ye hız adımlarının ölçeklendirilmesindeki λ faktörü aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right) \quad (4.38)$$

Burada “ τ_T ” zaman sabiti olup $\tau_T = (2\gamma)^{-1}$ olduğundan, bu sabit ne kadar büyük olursa sistem ile ısı-tankı arasındaki çiftlenim zayıf, ne kadar küçük ise çiftlenim o kadar güçlü olur. $\tau_T = \delta\tau$ ise algoritma basit hız ölçeklendirme yöntemine dönüşür.

4.3.2.4.3 Andersen sıcaklık çiftlenimi

Andersen termostadı, moleküler dinamikler için önerilen ilk termostattır (Andersen 1980). Bu termostat, atomların veya moleküllerin kinetik enerjisini değiştiren stokastik kuvvetler yoluyla sistemi bir ısı banyosuna bağlar. Çarpışmalar arasındaki zaman veya bazı (kısa) zaman aralıklarındaki çarpışmaların sayısı, aşağıdaki Poisson dağılımıyla rastgele olarak belirlenir.

$$P(t) = Ve^{-Vt} \quad (4.39)$$

Burada V stokastik çarpışma frekansıdır. Bir çarpışma olayında çarpışmaya katılan bir atomun yeni momentum değeri T sıcaklığındaki Boltzmann dağılımdan rastgele seçilir. Prensip olarak V her değere uyum gösterir. Ancak yine de uygun değerini seçimi için, α boyutsuz bir sabit, κ termal iletkenlik, V hacim ve κ_B Boltzmann sabiti olmak üzere Eşitlik (4.40) kullanılır,

$$V = \frac{2\alpha\kappa V^{1/3}}{3\kappa_B N} \quad (4.40)$$

4.3.2.4.4 Nose-Hoover sıcaklık çiftlenimi

Genişletilmiş sistem metodu, Nose ve Hoover tarafından geliştirilmiş bir metottur (Hoover 1985; Nosé 1984). Bu metot, kanonik faz uzayı dağılımını yeniden üretmeye amaçlar ve bu amaç doğrultusunda toplam kinetik enerjiyi sabit tutmak için, sistemin hareket denklemlerine Newton denkleminde olmayan bir terim ekler. Böylelikle modifiye edilmiş hareket denklemi,

$$\frac{dv(t)}{dt} = \frac{F(t)}{m} - \gamma v(t) \quad (4.41)$$

şeklinde yazılır. Eşitlikteki γ termodinamik sürtünme katsayısıdır ve zamanla değişimi aşağıdaki gibi verilir.

$$\frac{d\gamma(t)}{dt} = \frac{1}{Q} [mv(t)^2 - (X + 1)\kappa_B T] \quad (4.42)$$

Burada Q boyutu (enerji) \times (zaman)² olan ekstra serbestlik derecelerinin kütesidir ve gerçek sistemle ısı-tankının çiftlenim büyüklüğünü belirler. X ise serbestlik derecesinin sayısıdır. İncelenen gerçek fiziksel sistem ile bu sisteme ısı banyosu entegre ederek oluşturulan genişletilmiş sistemin hızları arasında bir ilişki vardır. Gerçek sistemdeki parçacıkların hızları;

$$\vec{v}_i = s \frac{d\vec{r}_j}{dt} \quad (4.43)$$

şeklinde tanımlanabilir. Gerçek sistemdeki zaman adımına dt , genişletilmiş sistemdeki zaman adımına dt' denilirse, aralarındaki ilişki ek bir serbestlik derece sayısı (s) kullanılarak aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$dt = s dt' \quad (4.44)$$

Buradaki “s” ek serbestlik değeri değıştikçe, parçacık hızlarına bağı olarak gerçek sistemdeki sıcaklıkta değışir. Bu sayede ilgilenilen gerçek sistem ile ısı banyosu arasında ısı geçişı olacaktır ve sistem istenilen sıcaklığa erişecektir.

4.3.2.4.5 Berendsen basınç çiftlenimi

Daha önce bahsedildiğı gibi, MD yönteminde sabit basınç altında simülasyon yapmak istenildiğinde, basınç değışimi de sıcaklık değışimi gibi simülasyon sonucunu etkileyeceğinden, kontrol altına alınması gereken bir parametredir. MD simülasyon yönteminde basıncın kontrol edilebilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri Berendsen barostatıdır. Berendsen barostatı, basınç değışimini etkileyen hareket denklemlerine ek bir terim ekler ve banyo sıcaklığına ulaşmak için,

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{ref} = \frac{P_o - P}{\tau_p} \quad (4.45)$$

eşitliğini kullanılır. Burada P_o referans basınç ve τ_p ise zaman sabitidir. Bu algoritma esnasında koordinatlar ve kutu boyutları her adımda yeniden ölçeklendirilir. Sistemin izotropik olduğu bir kutu içerisindeki μ ölçeklendirme faktörü, κ_T izotermal sıkıştırılabilirliği göstermek üzere,

$$\mu = 1 - \frac{\kappa_T \Delta t}{3\tau_p} (P_o - P) \quad (4.46)$$

şeklinde ifade edilir.

4.3.2.4.6 Parinello-Rahman basınç çiftlenimi

1980 yılında MD simülasyonlarında basıncı sabitlemek için Parinello ve Rahman tarafından anizotropik sistemlere uygulanabilecek bir yöntem geliştirilmiştir (Parinello and Rahman 1981). Bu yöntemde, yalıtılmış N parçacıklı sistem için toplam iç enerji ve simülasyon kutusunun hacmi bağımsız değişkenler olarak alınır. Kutunun kenarları $b=(A,B,C)$ şeklinde bir matris oluşturacak biçimde $A(t)$, $B(t)$ ve $C(t)$ ile tanımlanan lineer bağımsız ve zamanın fonksiyonu olan üç vektör ile ifade edilir. Parinello ve Rahman yaklaşımında kutu içindeki bir i atomunun hareket denklemi (Haile 1992),

$$\frac{d^2b}{dt^2} = VW^{-1}b^{I-1}(P_{ref} - P_{dış}) \quad (4.47)$$

ile verilir. Burada, V simülasyon kutusunun hacmi, P_{ref} istenilen basınç değeri, $P_{dış}$ sisteme uygulanan dış basınçtır. W matrisi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir ve sistem ile basınç tankının etkileşiminin büyüklüğünü belirler.

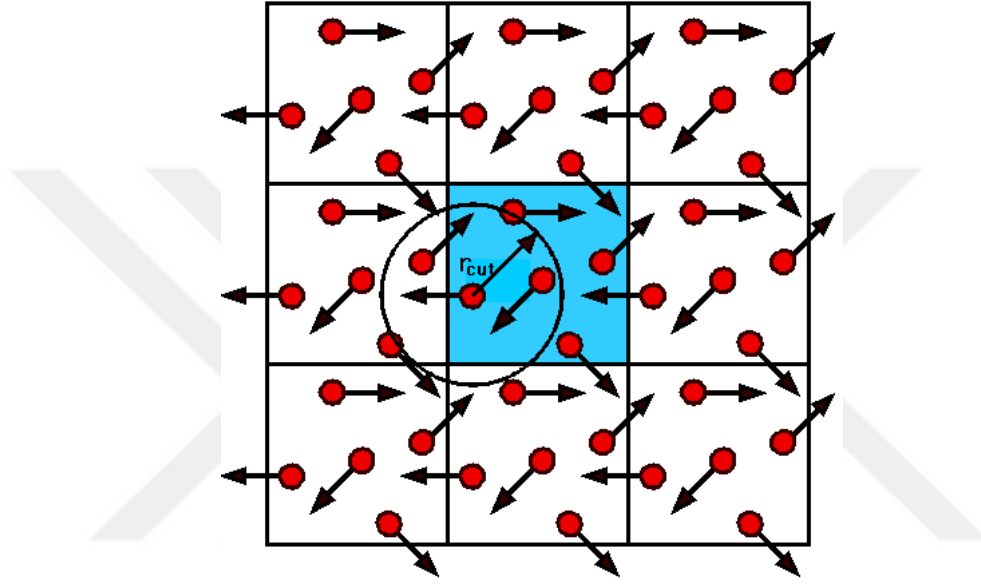
$$(W^{-1})_{i,j} = \frac{4\pi^2\beta_{i,j}}{3\tau_p^2L} \quad (4.48)$$

Parinello-Rahman yaklaşımı ile simülasyonda basınç zaman sabiti τ_p ve izotermal sıkıştırılabilirlik β belirlenerek sistemin basıncı kontrol altına alınır. Burada L ise seçilen simülasyon kutusunun en büyük kenar uzunluğunu temsil eden matris elemanıdır.

4.3.2.5 Moleküler Dinamik Tekniğinde Sınır Koşulları

MD tekniği atomik veya moleküler sistemlerin makroskobik özelliklerini incelemeyi amaçlar. Ancak görece olarak az sayıda parçacık kullanılarak istenilen makroskobik özelliklerin hesaplanmasında, sınır etkilerinin de dikkate alınması çok önemli bir husustur. Örneğin 1000 atomun içinde bulunduğu $10 \times 10 \times 10$ nm' lik bir simülasyon kutusu düşünüldüğünde, bu

atomların neredeyse yarısının yüzey bölgelerinde yer aldığı görülür. Diğer yandan, incelenen sistemlerin yüzey etkileşmelerinin yani atomların içinde buldukları kutunun duvarlarıyla olan etkileşmelerinin, sistemin özelliklerini büyük oranda etkilediği de bilinmektedir. İşte bu amaçla, MD simülasyonlarında “periyodik sınır koşulları (PBC)”, simülasyon kutusunun boyutlarının bir sınır dahilinde seçilebilmesinden kaynaklanan yüzey etkileriyle ilgili problemleri önlemek ve sistemin boyutlarını olası periyodik etki hesaplama maliyetlerine rağmen sonsuza benzeyen bir hale getirmek için kullanılmaktadır.



Şekil 4.3 Periyodik sınır koşullarının uygulanması.

Bunun için Şekil 4.3' deki gibi iki boyutlu bir sistem düşünülür. Periyodik sınır koşullarına göre, V hacmini kaplayan N tane atomun bulunduğu hücreye “ana hücre” denir. Bu sistemde ana hücre ortadaki mavi renkli hücredir ve iki boyutta çalışıldığından bu hücreye komşu 8 adet hücre vardır. Komşu hücreler, ana hücre ve bu hücre ile aynı boyut ve geometrik şekle sahiptir. Bu sanal hücrelerde de N tane atom bulunmaktadır, bunlara ana hücredeki atomların görüntü atomları denir. Ana hücredeki bir i parçacığı r_i konumunda ise L hücre büyüklüğü ve n tamsayı olmak üzere;

$$R(r_i) = R(r_i + nL) \quad (4.49)$$

konumlarında görüntü atomları bulunur. Böylece ana hücre, tüm doğrultularda görüntülenerek periyodik hale getirilir. Periyodik sınır koşullarının kullanıldığı simülasyon modellerindeki mantık, Şekil 4.3’de gösterildiği gibi ana hücreden diğer bir komşu hücreye hareket eden parçacığa karşılık, sanalının da aynı hareketi yapmasıdır. Sonuç olarak ana hücredeki parçacık sayısı değişmez, bütün parçacıklar birbirleriyle etkileşir ve böylece ana hücre için sınır koşulları ortadan kalkmış olur. Periyodik sınır koşulları kullanılarak hücredeki atomlar arası etkileşimler hesaplanırken “kısa mesafelerdeki” etkileşimleri göz önünde tutulur. Bunun anlamı, ana hücredeki bir i atomunun toplam potansiyel enerjisi bir “ r_{cut} ” kesim mesafesinden küçük uzaklıklarda bulunan komşu atomlarla yaptığı etkileşimlerden oluşur. Periyodik sınır koşulları kullanıldığında r_{cut} ’ın periyodik hücre boyutunun yarısından küçük olması ($r_{cut} < L/2$) önemlidir. Çünkü bu durumda i atomunun en yakın komşularla yaptığı etkileşimler dikkate alınmaktadır. Periyodik sınır koşulları, korunum yasalarını sağlamaktadır. Şöyle ki; Sistemin toplam atom sayısı sabit ve sanal atomlar ana hücredeki atomlarla özdeş olduğundan kütle korunmaktadır.

Sistemin uzun-mesafe Coulomb etkileşimleri ise 3 boyutlu “Ewald” toplamı (Ewald 1921) tekniği ile çözülür. Çünkü Ewald toplamı, çoğu sistem için daha güvenilir enerji tahminleri verir. Bu toplamda yüklerden oluşan sistemin elektrostatik potansiyeli, kısa ve uzun mesafe katkıların toplamı olarak ifade edilir.

4.3.2.6 Sınırlandırma Algoritmaları

Günümüzde MD simülasyonları, hesaplamalı kimya, fizik ve biyolojide kullanılan çok önemli bir araçtır. İlk başlarda moleküler sistemlerin dinamik özelliklerini anlamak için faydalı olan MD simülasyon tekniği, kristalografik verilerden protein modeli oluşturmak ve farklı ilaç moleküllerinin aynı reseptöre bağlanmasındaki serbest enerjisi farklarını belirlemek gibi çok çeşitli görevler için paha biçilemez bir yöntem haline gelmiştir. Bu hesaplamalar daha geniş çaplı problemler için daha doğru ve uygulanabilir hale geldikçe, araştırmacılar MD simülasyon tekniğini daha büyük ve daha karmaşık sistemlere uygulamayı ve gittikçe daha uzun zaman ölçeklerinde gerçekleşen süreçleri incelemek için kullanmayı düşünüp uygulamaya başlamışlardır. Ancak, bu durum hem bilgisayar donanımı hem de yazılım performansında sürekli geliştirmelere ihtiyaç duymaktadır.

Moleküler dinamik simülasyonları tipik olarak Newton'un hareket denklemlerinin sayısal integrasyonunu içerir. Bu integrasyonlarda zaman adımları, en hızlı modların doğru bir şekilde işlenmesi için yeterince küçük olmalıdır. Örneğin, hidrojen atomları içeren bağ uzunluklarını ele alabilmek için zaman adımı yaklaşık 1 fs' dir. Bu da karmaşık problemlerin ve sistemlerin incelenmesinde büyük zamanlara ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda kısa ve uzun menzilli kuvvetleri ayırarak ve farklı kuvvetler için farklı zaman adımları ile başarı elde edilmiş olsa da, zaman adımını artırmak için en popüler yaklaşımlar, bağ uzunluk ve açılarını sınırlandırarak hareket denklemlerini daha düşük serbestlik dereceleri için çözmeyi amaçlamaktadır. Bu yaklaşımın, bağ uzunlukları ve açılarının bir yapıdan diğerine az değişen ve hemen hemen tüm önemli konformasyonel geçişlerin dihedral açılı hareketlerden kaynaklandığı büyük biyolojik moleküller üzerinde yapılan çalışmalar için doğruluğu kuşkusuzdur. Bunun için de literatürde simülasyon yöntemleri için geliştirilmiş bir çok algoritma bulunmaktadır. Bağ uzunlukları ve bağ açıları GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulation)'da, geleneksel "Shake" (Ryckaert et al. 1977) veya "Lincs" (Hess et al. 1997) algoritması kullanılarak sınırlandırılabilir.

Shake Metodu:

Shake algoritması moleküler dinamik simülasyonlar uygulanırken, bağ geometri sınırlamalarını uygulamak için geliştirilen ilk algoritmalardan biridir. Günümüzde Shake algoritması, özellikle sabit bağ uzunlukları ile MD simülasyonları yapmanın standart bir yaklaşımı olmuştur. Ayrıca, bağ açılarını sabit tutmak için de kullanılabilir. Shake, bir parçacık sisteminde kartezyen koordinat dereceleri için hareket denklemlerini bütünleştiren Verlet algoritmasının bir modifikasyonudur. Parçacık hızları önce sınırlandırılmamış sistem için hesaplanır, daha sonra her kısıtlamayı karşılayacak şekilde modifiye edilir. Bu kısıtlama değerleri simülasyon protokolleri belirlenirken cut-off (kesim mesafeleri) değerleri ile belirlenmektedir. Bütün kısıtlamaları aynı anda karşılamak için tekrar eden bir süreç gereklidir. Shake metodu basit ve nümerik olarak kararlıdır. Shake algoritması, 5 fs a kadar zaman adımları için iyi çalışır, böylece kısıt denklemlerini yineleyerek çözme süreci çok fazla zaman harcamadığı sürece, hesaplama zamanında beş kat hızlanma sağlar.

Lincs Metodu:

Lincs algoritması, bağları kendi gerçek uzunlukları ve yönlerine göre sınırlandıran bir algoritmadır. Shake metoduna göre daha kararlı ve yaklaşık dört kat hızlıdır. Fakat bu metod, sadece bağ sınırlamaları ve izole edilmiş açılı sınırlamaları ile kullanılabilir. Kararlılığından dolayı bilhassa Brownian dinamiği için kullanışlıdır. Lincs algoritması, moleküler dinamikte Leap-Frog veya Verlet tipi (MD) algoritması için uygun olarak hazırlanmıştır. Yine kısıt değerleri simülasyon öncesi hazırlanan protokol dosyalarına eklenecek cut-off (kesim mesafeleri) değerleri ile kolayca belirlenebilmektedir.



BÖLÜM 5

SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI

5.1 GİRİŞ

Bu tez çalışmasında Grigoryan ve arkadaşları tarafından hesaplamalı tasarım kullanılarak dizayn edilmiş bir de novo peptidi olan HexCoil-Ala'nın tetramerik (dört zincirli) bir formu, MD simülasyon yöntemiyle incelenmiştir (Grigoryan et al. 2011). HexCoil-Ala hesaplamalı tasarımda bir devrim olarak nitelendirilen de novo yönteminin öncü dizaynlarından. 30 adet aminoaside sahip olan HexCoil-Ala'nın aminoasit diziliminin 3 harfli kodlaması aşağıdaki gibidir.

Ala-Glu-Ala-Glu-Ser-Ala-Leu-Glu-Tyr-Ala-Gln-Gln-Ala-Leu-Glu-Lys-Ala-Gln-Leu-Ala-Leu-Gln-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Leu-Lys-Ala

HexCoil-Ala, Grigoryan ve arkadaşları tarafından tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) etrafına heksamerik (altı zincirli) formu özel bir geometriyle sarılarak dizayn edilmiş bir peptittir (Grigoryan et al. 2011). SWCNT etrafındaki bu özel geometri heksamerik form, HexCoil-Ala'ların birbirlerine anti-paralel olarak yerleştirilmesi ile elde edilmiştir. Bunun yanında, HexCoil-Ala'nın sahip olduğu 30 adet aminoasit dizilimi öyle seçilmiştir ki; HexCoil-Ala'nın hem altılı formunun SWCNT'ye en iyi şekilde tutunması, hem de anti-paralel HexCoil-Ala zincirlerinin birbirleriyle etkileşiminin en mükemmel olması sağlanmıştır. Bu etkileşim özelliklerini ve eşsiz geometriyi elde etmek için bir tasarım motifi olan "sarılmış-sarmal" (coiled-coil) motifi kullanılmıştır. Sarılmış-sarmallar periyodik bir yapıya sahiptir ve peptidi oluşturan aminoasit dizilimi içerisinde yedi aminoasidin geometrik olarak kendini tekrar etmesiyle meydana gelir. Kendini geometrik olarak tekrar eden bu yedili aminoasitler bir etiketleme ile anlatırsa; $(abcdefg)_n$ aminoasitlerinin geometrik pozisyonlarını göstermek üzere,

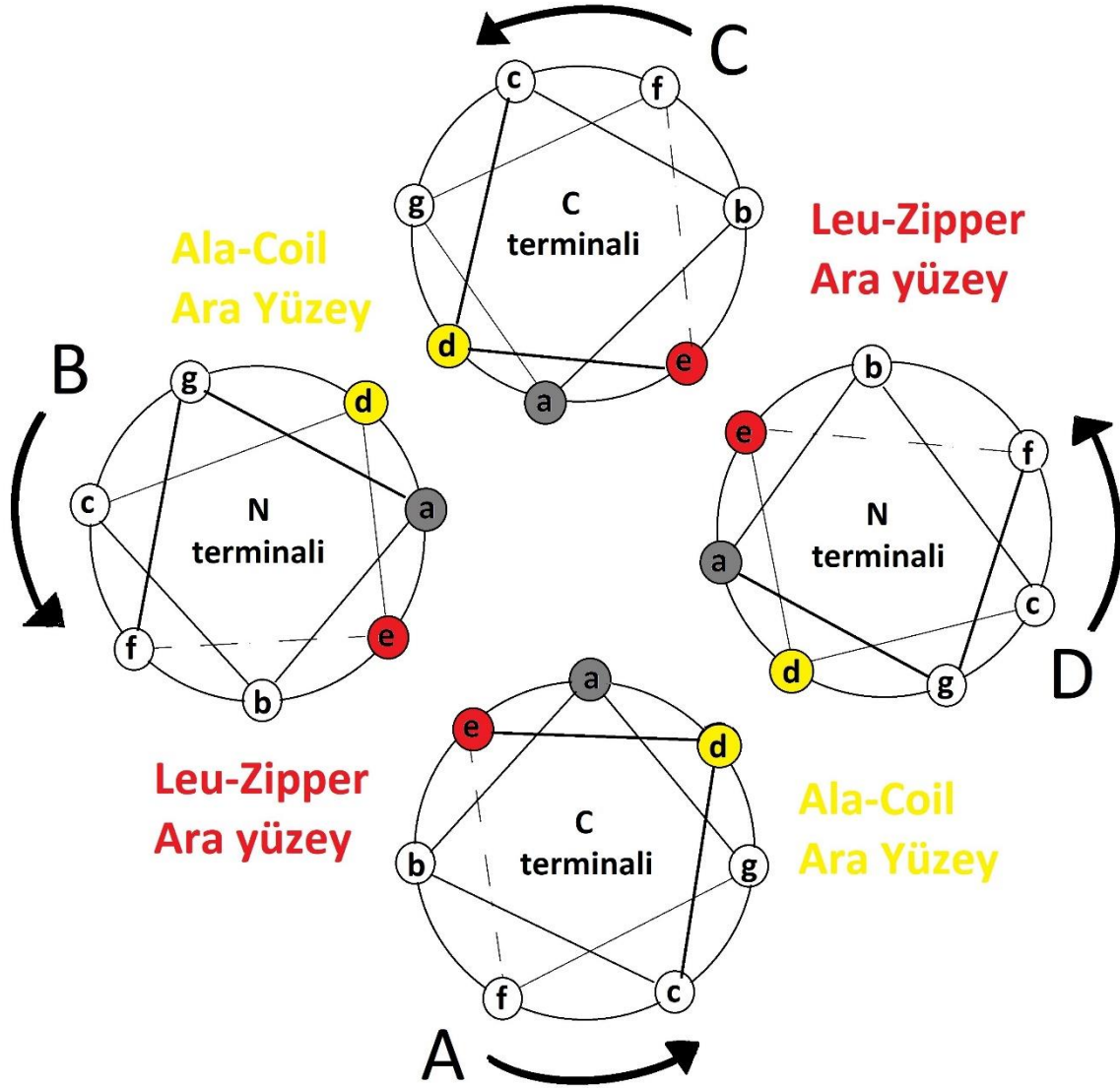
genellikle ele alınan sarılmış-sarmal yapıların yedili tekrarlarındaki a ve d etiketine karşılık gelen pozisyonlardaki aminoasitler ortak seçilir. HexCoil-Ala' nın yedili tekrar aminoasitlerinde ise a, d ve e geometrik pozisyonları ortak olarak seçilerek aminoasit dizilimi oluşturulmuştur. HexCoil-Ala' nın aminoasit dizilimindeki yedili tekrarlar farklı renklendirmeler kullanılarak Çizelge 5.1' de gösterilmiştir. Ayrıca, bu çizelgeden Hex-Coil-Ala' nın her bir yedili tekrarındaki, geometrik a, d ve e pozisyonlarında bulunan ortak aminoasitler açıkça görülmektedir.

Çizelge 5.1 HexCoil-Ala' nın aminoasit diziliminin tek harfli kodlaması ve yedili tekrarları.

HexCoil-Ala	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g
HexCoil-Ala	A	E	A	E	S	A	L	E	Y	A	Q	Q	A	L	E	K	A	Q	L	A	L	Q	A	A	R	Q	A	L	K	A

Sarılmış-sarmal yapıların aminoasit dizilimindeki bu ortak pozisyonlar, genellikle protein ya da peptitin işlev ve fonksiyonuna uygun olacak şekilde belirlenmektedir. Anti-paralel olacak şekilde, karşılıklı olarak yerleştirilmiş çok zincirli HexCoil-Ala demeti tasarımlarında ise geleneksel “a” ve “d” pozisyonuna ilaveten “e” pozisyonundaki aminoasitlerin de ortak seçilmesiyle iki tip özel heliksel ara yüzeyi oluşturulması amaçlanmıştır ki; bu ara yüzeyler literatürde Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyleri olarak adlandırılmaktadır. HexCoil-Ala' nın sahip olduğu bu ara yüzeyleri ile anti-paralel heliksler arasındaki etkileşimlerin artırılarak yapının oligomerik (çok zincirli) formunun koruması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmamızda incelenen HexCoil-Ala' nın anti-paralel olarak yerleştirilmiş tetramerik formunun sarılmış-sarmal motifi ve bu özel motif aracılığıyla oluşan heliksel Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyleri sembolik olarak Şekil 5.1' de gösterilmiştir. Burada A, B, C ve D anti-paralel dizimli, her bir HexCoil-Ala peptidini temsil etmektedir. Genelde sarılmış-sarmallar birbirine paralel ya da anti-paralel olarak yerleştirilmiş en az 2 adet heliksten oluşan yapısal motiflerdir. HexCoil-Ala %90 α -heliks ikincil yapısına sahiptir. HexCoil-Ala' nın tetramerik formu ise 4 adet anti-paralel heliks zincirinden oluşan bir sarılmış-sarmal yapısal motifine sahiptir. Şekil 5.1' de, bu yapısal motifteki, (abcdefg)_n yedili tekrar aminoasitlerinin sarım yönlerine göre sıralanışı ve “a”, “d” ve “e” ortak pozisyonları aracılığıyla oluşan anti-paralel HexCoil-Ala heliksleri arasındaki ara yüzeyler açıkça betimlenmektedir.



Şekil 5.1 Tetramerik HexCoil-Ala' nın sarılmış-sarmal motifi ve Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyleri.

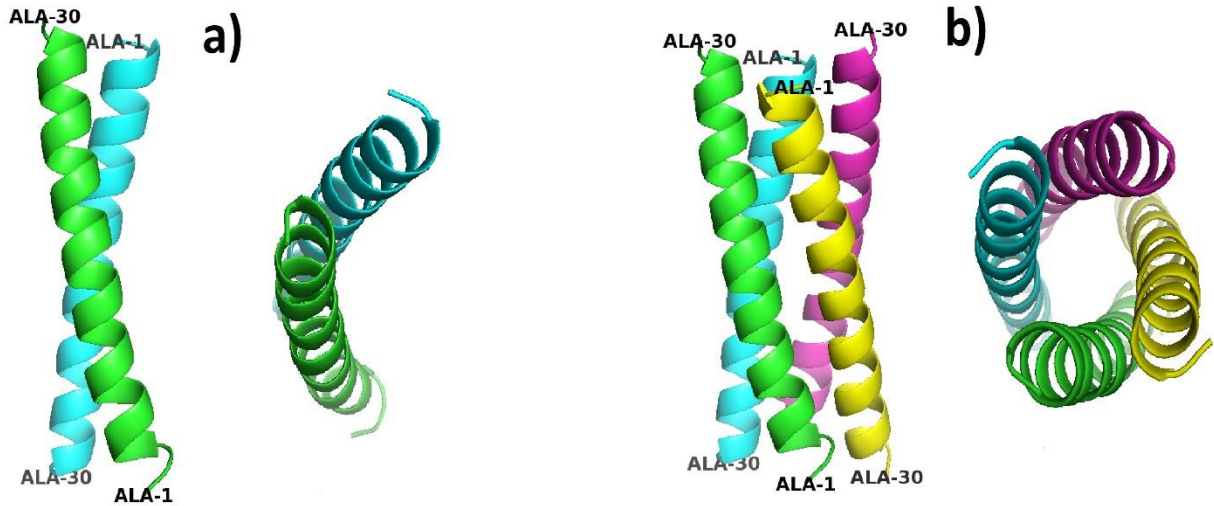
Grigoryan ve arkadaşları aynı zamanda yapmış oldukları deneysel çalışmalar sonucunda, karbon nanotüpün yokluğunda AUC (sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation) analizi ile HexCoil-Ala' nın tetramerik yapılar halinde bulunmayı tercih ettiğini göstermişlerdir (Grigoryan et al. 2011). Ancak, HexCoil-Ala' yı karbon nanotüp kullanmadan inceledikleri bu deneyde, yapının tetramerik bir sarmal demeti değil de sadece anti-paralel birimli dimerik (iki zincirli) formu kristalleştirilebilmiştir. X ışınları kullanılarak yapısı çözülmüş olan HexCoil-Ala' nın dimerik kristal yapısı, PDB veri tabanına 3S0R kodu ile konulmuştur (Şekil 5.2.a). Bundan dolayı tez çalışmasında, yukarıda bahsedilen SWCNT nin yokluğunda yapılan deneysel

bilgiler ışığında, tetramerik form oluşturma eğiliminde olduğu ileri sürülen HexCoil-Ala' nın tetramerik formu ele alınmış ve yapı MD simülasyon yöntemiyle incelenmiştir (Demir et al. 2017).

5.2 MD SİMULASYONLARI

5.2.1 Metot

HexCoil-Ala' nın tetramerik formunun MD simülasyonları ile incelenebilmesi amacıyla, öncelikle PDB veri tabanında bulunan 3SOR adlı dimerik anti-paralel yapı ele alınmış ve PyMOL (DeLano 2002) programının simetri aracı ile anti-paralel tetramerik HexCoil-Ala demeti oluşturulmuştur. PyMOL kullanılarak yapılandırılan bu tetramerik form Şekil 5.2.b' de gösterilmektedir. Oluşturulan bu başlangıç yapısından yola çıkılarak 300, 315, 335, 350, 400 ve 500 K sıcaklıklarında MD simülasyonları gerçekleştirilmiş ve bu tetramerik formun konformasyonel kararlılığına sıcaklığın etkisi araştırılmaya çalışılmıştır.



Şekil 5.2 HexCoil Ala'nın anti-paralel a) dimerik birim (3SOR)' nin ve b) tetramerik formunun yandan ve üstten görünüşü. Renklendirme: yeşil, zincir A; mavi, zincir B; pembe, zincir C; sarı, zincir D.

Simülasyonların başlangıç aşamalarında öncelikle tetramerik yapı çözelti ortamında 2 aşamalı bir enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur. Çözelti içerisinde enerjisi minimize olmuş yeni yapı kullanılarak ilgilenilen sıcaklıklar için sistem 2 aşamalı dengeleme simülasyonlarıyla dengelenmiştir. Daha sonra ise her bir sıcaklıkta dengelenen sistemlerin, NPT kümesi kullanılarak ürün simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Simülasyonlar sırasında, molekül içi ve moleküller arası etkileşimlerin tanımlanması ve hesaplanmasında AMBER99SB kuvvet alanı (Hornak et al. 2006) kullanılmıştır. Bu potansiyel kuvvet alanı bilindiği gibi, proteinlerin katlanma ve kararlılık çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Moleküler dinamik simülasyonlarında integrasyon algoritması olarak Verlet algoritması kullanılmış ve moleküler dinamik zaman adımı 2 fs olarak seçilmiştir (Verlet 1967). Periyodik sınır koşullarını daha etkin bir şekilde uygulayabilmek için tetramerik yapı, boyutları minimum olacak şekilde bir simülasyon kutusuna yerleştirilmiştir. Simülasyonlarımızın tamamı GROMACS 4.6.5 programı ile gerçekleştirilmiştir (Pronk et al. 2013). Çözelti ortamında gerçekleştirilen simülasyonlarda, çözelti modeli olarak SPC açık su modeli kullanılmıştır (Berendsen et al. 1981).

5.2.2 Simülasyon Detayları

PyMOL programı ile oluşturulan tetramerik HexCoil-Ala demeti 5x5x8.3 nm boyutlarında bir simülasyon kutusunun merkezine yerleştirilmiştir. Bu yerleştirmede tetramerik yapının herhangi bir atomu ile simülasyon kutusu arasındaki minimum uzaklık 1 nm olarak alınmıştır. Daha sonra simülasyon kutusunun içerisine SPC216 su modeli kullanılarak 6240 adet su molekülü eklenmiştir. Ayrıca, dengeleme ve ürün simülasyonlarında ihtiyaç duyulan PME teorisi gereğince, tetramerik yapının nötrale olması için sisteme 4 tane Na⁺ iyonu “genion” programıyla eklenmiştir.

Nötralize olmuş çözelti içerisindeki bu sistem, sistemdeki kötü temasları ve uygun olmayan geometrileri yok etmek için iki aşamalı bir enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur. Bu işlem $50 \text{ kJ mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$ enerji gradiyenti elde etmek için önce “Steepest Descent” ardından “Conjuge Gradient” metodları ile 2000 zaman adımı kullanılarak yapılmıştır. Minimizasyon aşamalarından sonra, enerjisi minimize olmuş yapı, ilgilenilen sıcaklıklar için 2 aşamada dengeleme simülasyonlarına tabi tutulmuştur. Bilindiği gibi, ilgilenilen sistemlerin başlangıç yörünge ve koşulları, ürün simülasyonuna başlamadan önce faz uzayında beklenen yörünge konumu civarında bulunamayabilir. Sistemlerin faz uzayı üzerinde istenilen yörüngelere yerleşmesi ve durağan durumlarını elde etmek için dengeleme simülasyonları yapılmaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen dengeleme simülasyonlarının ilk aşaması NVT kümede 400 ps simülasyon süresince gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada sıcaklığı sabit tutmak için v-rescale termostadı kullanılmış ve çiftlenim parametresi 0.1 ps olarak seçilmiştir (Bussi et al. 2007). Bu aşama yapılırken sisteme konum sınırlaması getirilmiştir. Konum sınırlaması (position restrain), sabit pozisyonda tutulan özelleşmiş atomların harmonik etkileşimleridir. Çözücü eklenecek sistemimizde konum sınırlaması ile, su moleküllerinin simülasyon kutusu içerisinde serbestçe dolaşmasına imkan verilirken, atom pozisyonları da sınırlandırılarak, makromoleküllerin içinin su ile kaplanması sağlanmaktadır. Dengeleme simülasyonlarının ikinci aşaması ise NPT kümede 500 ps simülasyon süresince gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada hem sıcaklığı hem de basıncı sabit tutabilmek için Berendsen termostat ve barostatı kullanılmış olup bunlar için çiftlenim sabitleri sırasıyla 0.1 ps ve 1 ps olarak seçilmiştir (Berendsen et al. 1984). En son aşamada ise ilgilenilen her bir sıcaklık için ürün simülasyonları NPT kümede 120 ns simülasyon zamanı uzunluğunda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ve basınç Berendsen algoritması kullanılarak sırasıyla 0.1 ps ve 1 ps çiftlenim sabitleri ile sabit tutulmuştur.

Dengeleme ve ürün simülasyon aşamalarında uzun erimli (long-range) etkileşimleri betimlemek için Particle Mesh Ewald (PME) (Darden et al. 1993) metodu kullanılmış ve kesim mesafeleri (cut-off), coulomb etkileşmelerinde 0.9 nm ve van der Waals etkileşmelerinde ise 1.0 nm olarak seçilmiştir. Ayrıca, Lincs (Hess et al. 1997) algoritması kullanılarak ilgilendiğimiz tetramerik yapıdaki kovalent bağlar sınırlandırılmıştır.

5.2.3 Sonuç ve Analizler

Yukarıda ayrıntılı bir şekilde bahsedilen protokoller izlenilerek gerçekleştirilen 120 ns'lik MD ürün simülasyonlarından, tetramerik HexCoil-Ala demeti için ilgili her bir sıcaklıkta yörünge dosyaları elde edilmiştir. Bu dosyaların analizlerinden ilgilenilen yapının özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

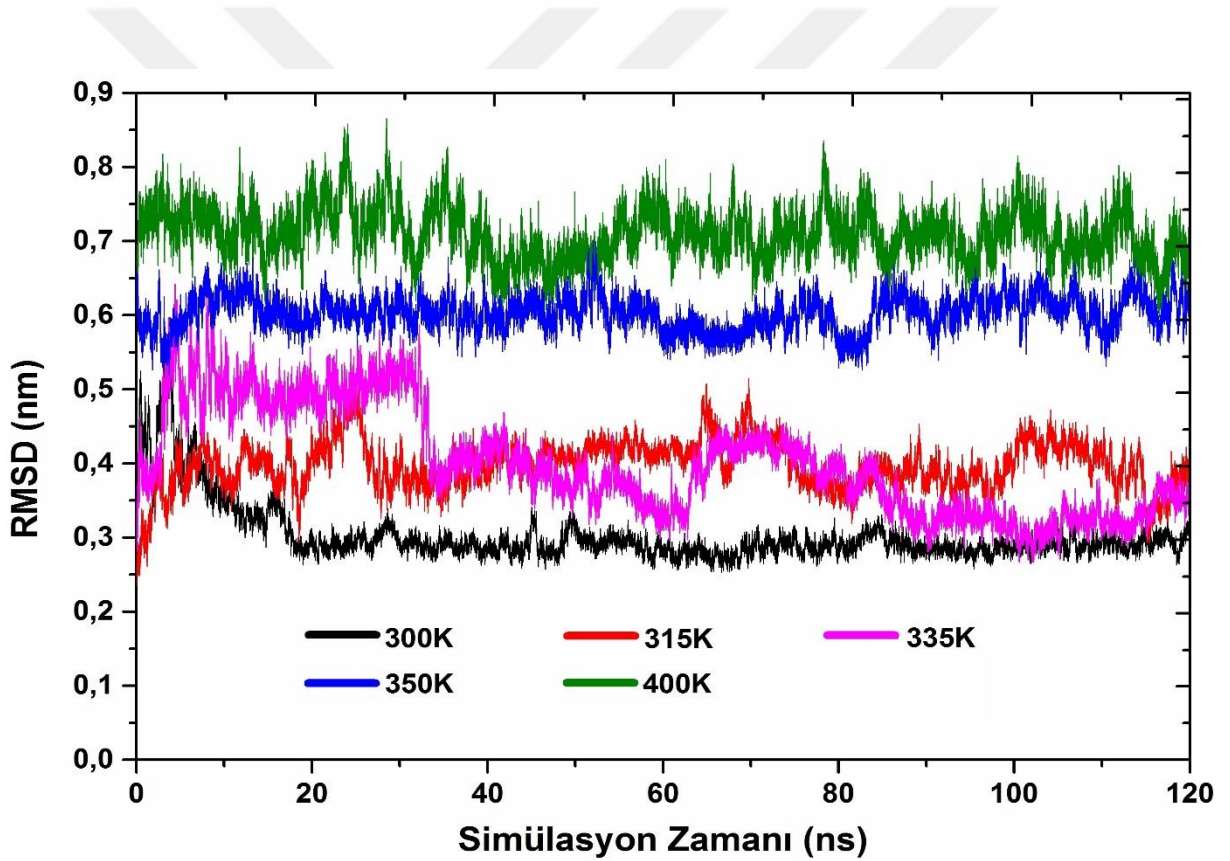
Bu amaçla öncelikle kare ortalama karekök yer değiştirme (RMSD, root mean square deviation) değerleri incelenmiştir. Bilindiği gibi RMSD çok zincirli yapıların kararlılık çalışmaları için sıklıkla kullanılan başlıca analiz araçlarından (Alred et al. 2014; Berhanu et al. 2015; Berhanu and Hansmann 2012; 2013a). Protein zincirlerindeki omurga atomlarının simülasyon boyunca doğal konformasyonel yapılarındaki konumlarından ne kadar uzaklaştığı hakkında bilgi veren RMSD sonuçları, tetramerik yapının konformasyonel kararlılığına sıcaklığın etkisi hakkında önemli bilgiler sağlayabilmektedir. M yapının toplam kütlelerini, m_i i. atomun kütlelerini, $r_i(t)$ i. atomun ilgili simülasyon zamanındaki ve r_i^{ref} ise i. atomun referans yapısındaki konumunu göstermek üzere, simülasyon zamanına bağlı olarak RMSD hesabı Eşitlik (5.1) kullanılarak yapılır.

$$RMSD(t) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |r_i(t) - r_i^{ref}|^2 \right]^{1/2} \quad (5.1)$$

Hesaplamalarımızda, referans yapısı olarak enerjisi minimize olmuş yapı kullanılmış ve ilgilenilen sıcaklıklar için elde edilen sonuçlar simülasyon zamanına bağlı olarak Şekil 5.3' de bir arada gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere, sıcaklığın artması ile birlikte elde edilen ortalama RMSD değerleri de beklenildiği gibi artmaktadır. Bunun yanında 120 ns lik simülasyonlar boyunca, özellikle 20 ns den sonra, tüm sıcaklıklar için tetramerik yapının daha kararlı hale dönüştüğü ve bundan sonraki simülasyon zamanlarında da bu kararlılığını koruduğu görülmektedir. En küçük ortalama RMSD değeri 300 K' de gözlemlenirken en yüksek değer ise 500 K' de gözlemlenmiştir. Ancak 500 K' deki bu değer yaklaşık ~7.73 nm civarında olduğundan skalanın uygunluğu bakımından Şekil 5.3' de sergilenememiştir. Bu yüksek değer

500 K sıcaklıkta yapının doğal halinden oldukça uzaklaştığı fikrini doğrulamıştır. RMSD değerleri 335 K' e kadar olan sıcaklıklar için yaklaşık 0.3 ile 0.5 nm aralığında dalgalanmakta iken, 350 ve 400 K' de ise bu değerler sırasıyla 0.60 nm ile 0.85 nm civarındadır. RMSD için elde edilen bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, tetramerik yapının 400 K sıcaklığına kadar yüksek termal kararlılığa sahip olduğu düşünülebilir.

Bunun yanında RMSD değerlerinde gözlemlenen farklı dalgalanmalar, aminoasit zincirlerinin ikincil yapılarındaki köklü değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Bundan dolayı tetramerik yapının kararlılığı hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için ikincil yapılarındaki değişimin simülasyonlar boyunca incelemesi gerekmektedir.



Şekil 5.3 RMSD değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.

Bu amaç doğrultusunda simülasyonlar boyunca HexCoil-Ala'nın tetramerik formunun ikincil yapılarındaki değişimler, DSSP (the dictionary of protein secondary structure) (Kabsch and Sander 1983) analiz yöntemiyle elde edilmiş ve her bir sıcaklık için hesaplanan ikincil yapılarındaki ortalama popülasyonlar Çizelge 5.1' de gösterilmiştir. Daha önce de söylenildiği

gibi, HexCoil-Ala' nın özel aminoasit dizilimi tasarlanırken, alanin zengini bir yapı olmasına özen gösterilmiştir. HexCoil-Ala zincirinin sahip olduğu 30 aminoasitten 11 tanesi alanindir ve yine bilindiği gibi Alanin en iyi α -Heliks yapma özelliğine sahip aminoasittir. Bundan dolayı HexCoil-Ala peptidinin doğal hali %90 α -Heliks ikincil yapısına sahiptir. Ayrıca, bu türden Alanin esaslı polipeptid yapılarının heliks katlanma süreçlerinin incelenmesi büyük ilgi uyandıran bir konudur (Chakrabartty et al. 1994; Levy et al. 2001; Son et al. 2001).

Çizelge 5.1. İkincil yapı içeriklerinin ortalama popülasyonları.

T[K]	Rastgele Sarım (%)	Kıvrılma (%)	Dönüş (%)	α -Heliks (%)	3-Heliks (%)	Diğer (%)
300	9.1 ^a (1.8) ^b	0.4 (0.1)	2.9 (0.2)	87.5 (2.8)	0.1 (-)	-
315	11.0 (2.3)	0.3 (0.1)	3.4 (0.3)	85.2(4.0)	0.1 (-)	-
335	14.4 (2.4)	0.1 (-)	2.8 (0.4)	81.4 (5.3)	1.3 (0.1)	-
350	15.4 (1.7)	2.2 (0.2)	8.1 (0.8)	71.2 (4.9)	2.8 (0.3)	0.3 (-)
400	17.2 (2.7)	4.0 (0.4)	9.1 (4.1)	66.0 (6.3)	2.2 (0.3)	1.5 (0.1)
500	39.3 (4.8)	18.2 (2.3)	19.2 (2.2)	14.2 (2.2)	6.9 (1.0)	2.2 (0.2)

^a Ortalama değerler, ^b Standart sapmalar.

Çizelge 5.1' deki ortalama ikincil yapı popülasyonları detaylı olarak incelendiğinde, özellikle 300 K sıcaklıkta elde edilen α -Heliks ikincil yapısının popülasyon değerlerinin doğal yapının sahip olduğu %90 oranına çok yakın olduğu söylenebilir. 300 K' den sonraki tüm sıcaklıklar için, artan sıcaklıkla birlikte baskın α -Heliks ikincil yapısının çoğunlukla rastgele sarım ikincil yapısı olmak üzere farklı ikincil yapılara dönüştüğü çizelgeden açıkça görülmektedir. 500 K' de ise α -Heliks popülasyon değeri %14 civarına düşmüştür ki bu; ilgilenilen yapıdaki heliks formun neredeyse tamamının diğer ikincil yapılara dönüştüğünü göstermektedir. Bunun yanında baskın α -Heliks popülasyon değerlerindeki değişimlere odaklanıldığında, tetramerik yapının sarmal tipteki kararlılığının 400 K sıcaklığına kadar büyük oranda korunduğu, başka bir değişle, yapının 400 K sıcaklığa kadar yapısal bir termal dirence sahip olduğu söylenebilir.

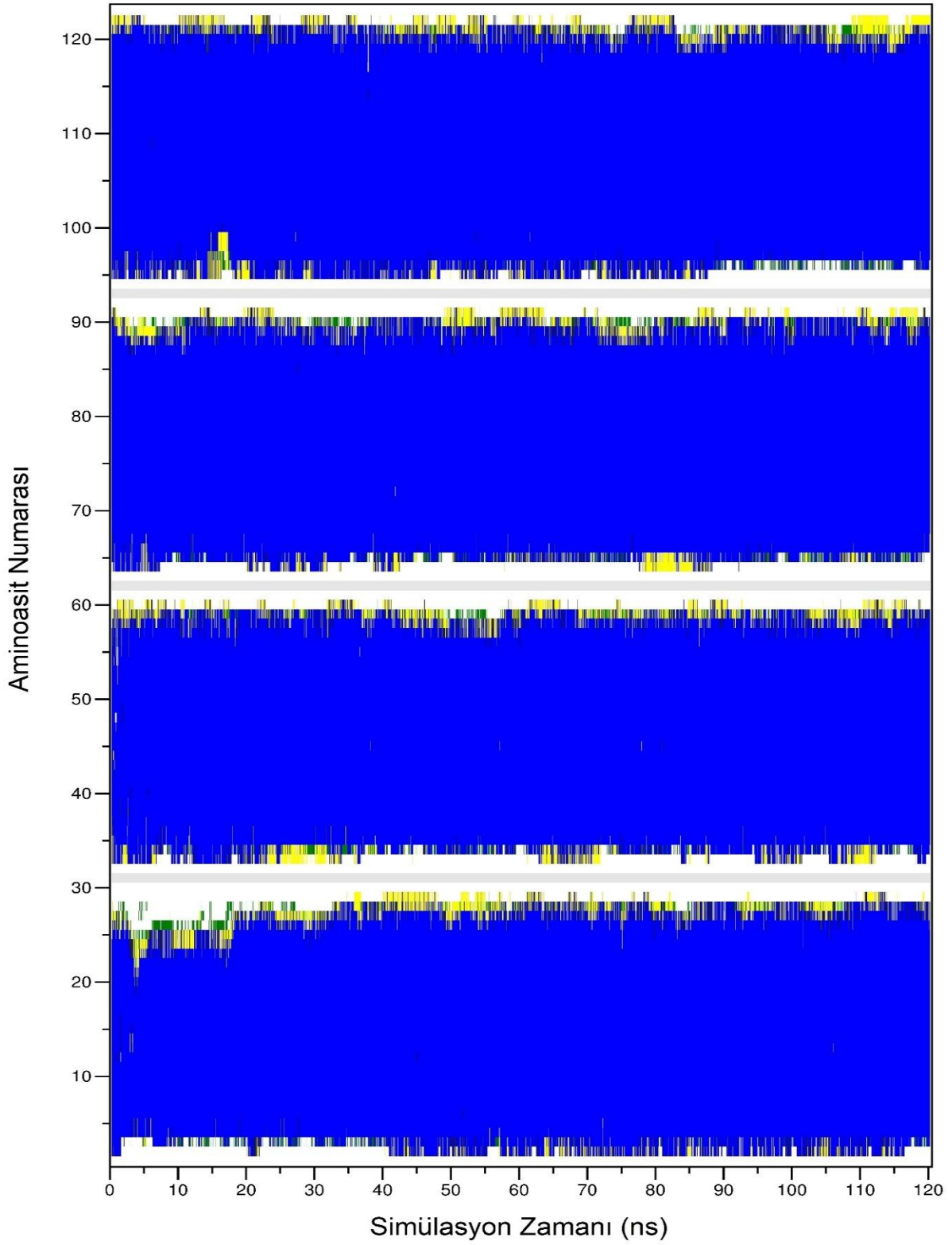
İkincil yapılardaki değişimlerin görsel olarak anlaşılması amacıyla, tetramerik yapının her bir zincirindeki aminoasitlerin simülasyonlar boyunca sergilediği ikincil yapılar elde edilerek grafik halinde çizilmiş ve farklı sıcaklıklar için elde edilen bu grafikler Şekil 5.4-5.9' da verilmiştir. Şekillerde düşey sütun her biri 30 adet aminoaside sahip dört zincirli (A,B,C ve D

zincirleri) yapının toplam 120 aminoasidinin A zincirinden başlayarak sıra numarasını vermektedir. Farklı renkler ise her bir aminoasidin ilgili simülasyon zamanındaki ikincil yapılarını sembolize etmektedir. Renklerin karşılık geldiği ikincil yapılar: beyaz- rastgele sarım (random coil), yeşil- kıvrılma (bend), sarı- dönüş (bend), mavi- α -heliks (α -heliks), koyu gri- 3-Heliks (3-Heliks), mor- 5-Heliks (5-heliks), siyah- β -Köprüsü (β -Bridge), kırmızı- β -Yaprağı (β -Sheet) ve açık gri- zincir ayırıcı olacak şekilde sembolize edilmişlerdir. Bütün şekillerden görüleceği üzere tüm sıcaklıklarda zincirlerin uç kısımları rastgele sarım ikincil yapısındadır. Bunun sebebi terminal bölgelerdeki aminoasitlerin daha esnek bir yapıya sahip olmasıdır. Her bir sıcaklık için elde edilmiş bu şekiller ayrı ayrı incelendiğinde, özellikle Şekil 5.4' te 300 K sıcaklıkta yapının baskın α -heliks ikincil yapı formunu koruduğu ancak Şekil 5.5' de 315 K sıcaklıkta baskın α -heliks yapıların yine çoğunlukla korunmasına karşın, özellikle C ve D zincirlerinde bu baskın yapılarının dönüş, kıvrılma ve rastgele sarım gibi farklı ikincil yapılarla dönüştüğü gözlemlenmektedir. Şekil 5.6' da sergilenen 335 K sıcaklıkta ikincil yapılardaki değişimler incelendiğinde, bu sefer 315 K' de olduğu gibi sadece C ve D zincirleri değil, tüm zincirlerdeki baskın α -heliks yapıların yerini dönüş, kıvrılma ve rastgele sarım gibi diğer ikincil yapılarla bıraktığı gözlemlenmektedir. Ancak, 315 K sıcaklıkla karşılaştırıldığında, 335 K sıcaklıktaki rastgele sarım yapıların oranında, çoğunluğu terminal bölgelerinde olmak üzere daha fazla artış olduğu görülmektedir. Şekil 5.7' de gösterilen 350 K sıcaklığında ikincil yapılarda ortaya çıkan değişimler incelendiğinde ise yine 315 K' de olduğu gibi bu sıcaklıkta da, özellikle C ve D zincirlerindeki baskın α -heliks ikincil yapıların daha fazla bozularak genellikle dönüş, kıvrılma ve 3-Heliks gibi diğer ikincil yapı tiplerine dönüştüğü görülmüştür. Ayrıca, A ve B zincirinde de başta terminal bölgeler olmak üzere ikincil yapılarda baskın yapının bir miktar dönüşümü söz konusudur. Şekilde 5.8' de gösterilmiş olan ikincil yapılar incelendiğinde ise 400 K sıcaklıkta baskın α -heliks yapılardaki değişimlerin tüm zincirler için oransal olarak daha da arttığı ve bu dönüşümlere diğerlerinin yanı sıra β -Köprüsü ve β -Yaprağı gibi ikincil yapıların da eklendiği fark edilmiştir. 500 K sıcaklığında ise Şekil 5.9' dan görüleceği üzere, baskın α -heliks yapıların tüm zincirler için neredeyse tamamen ortadan kaybolduğu ve farklı tür ikincil yapılara dönüştüğü gözlemlenmektedir.

RMSD ve DSSP sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, özellikle 400 K sıcaklığa kadar, HexCoil-Ala zincirlerinin sahip olduğu doğal ikincil yapı özelliklerinin ve tetramerik demet formunun çoğunlukla korunmasına karşın, sıcaklığın artmasıyla 500 K' de zincirlerdeki ikincil yapıların doğal halinden uzaklaştığı ve tetramerik demet formunun bozulduğu söylenebilir.

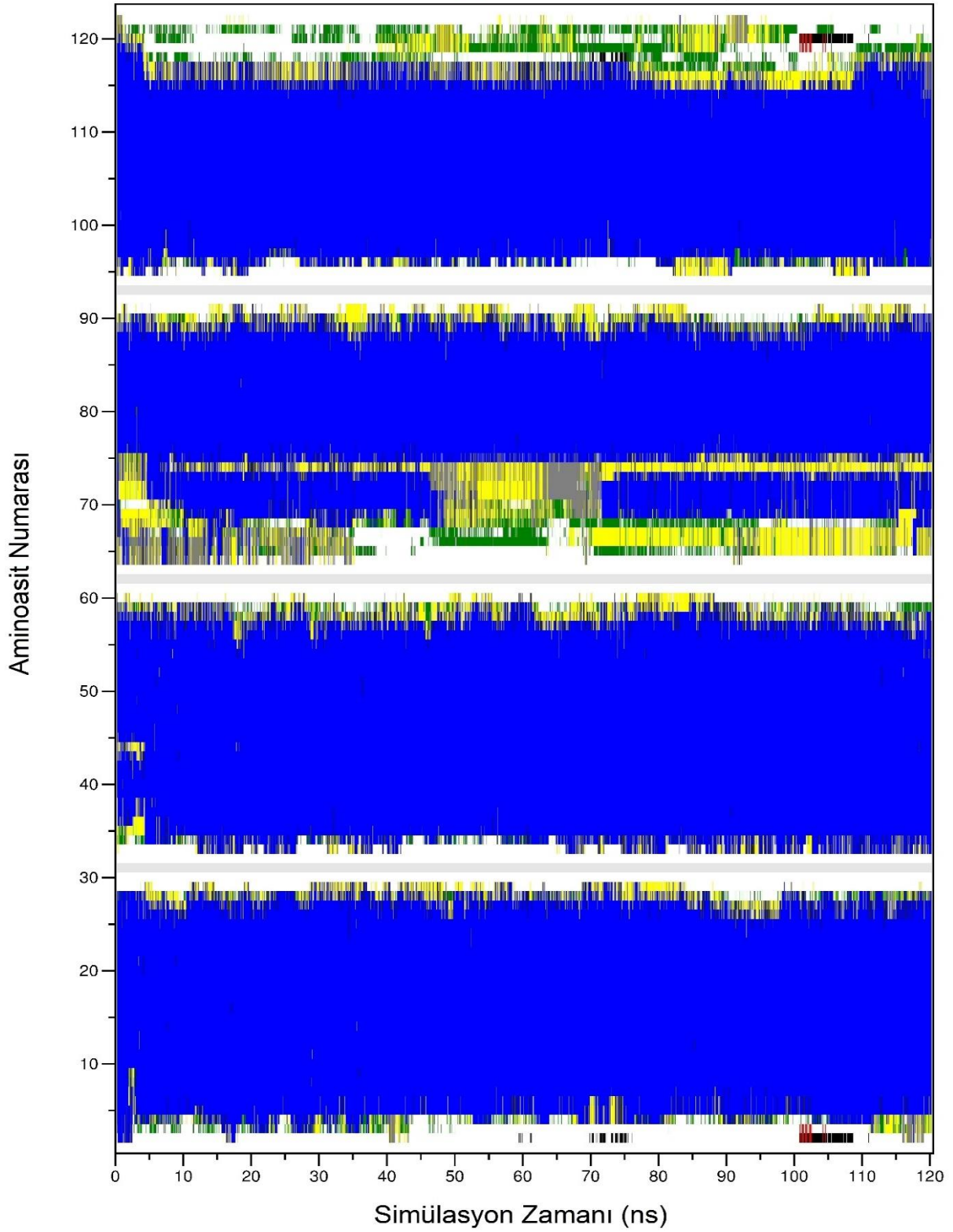
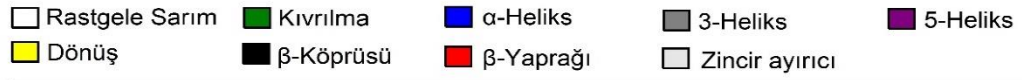
300K

□ Rastgele Sarım ■ Kıvrılma ■ α-Heliks ■ 3-Heliks
■ Dönüş ■ β-Köprüsü ■ Zincir ayırıcı



Şekil 5.4 MD simülasyonları boyunca 300 K sıcaklıktaki DSSP analizi.

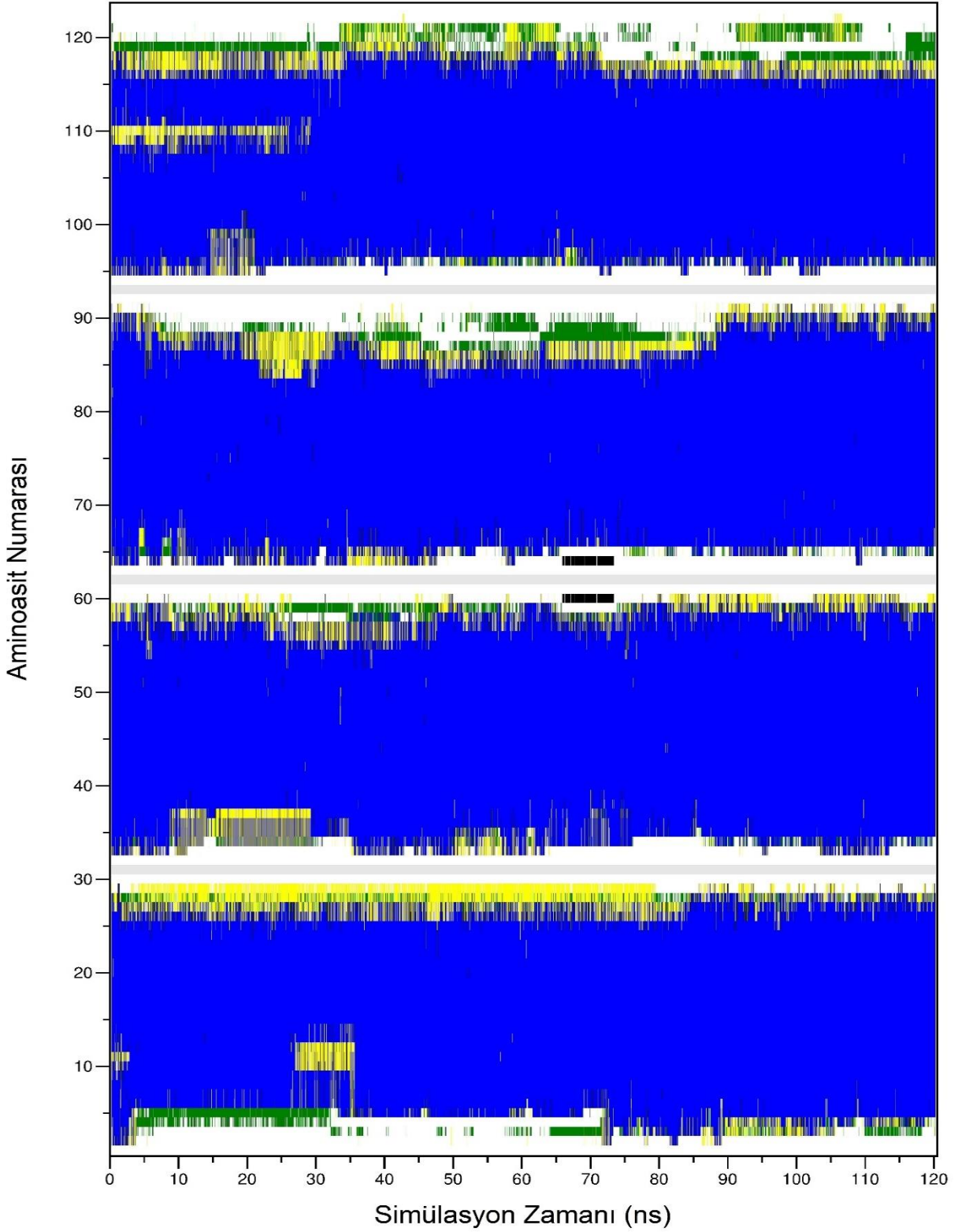
315K



Şekil 5.5 MD simülasyonları boyunca 315 K sıcaklıktaki DSSP analizi.

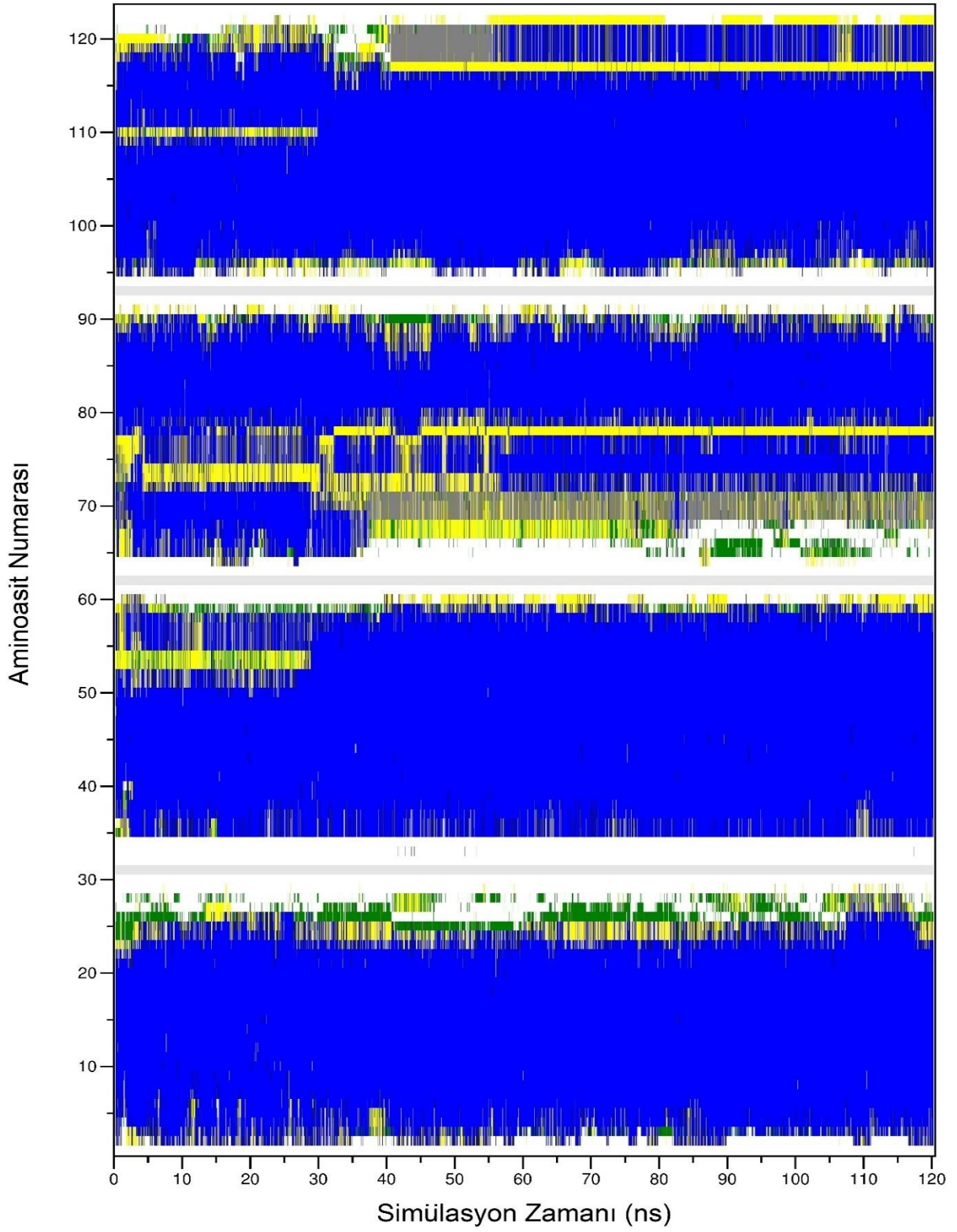
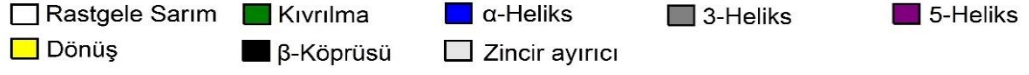
335K

- Rastgele Sarım ■ Kıvrılma ■ α-Heliks ■ 3-Heliks
■ Dönüş ■ β-Köprüsü □ Zincir ayırıcı



Şekil 5.6 MD simülasyonları boyunca 335 K sıcaklıktaki DSSP analizi.

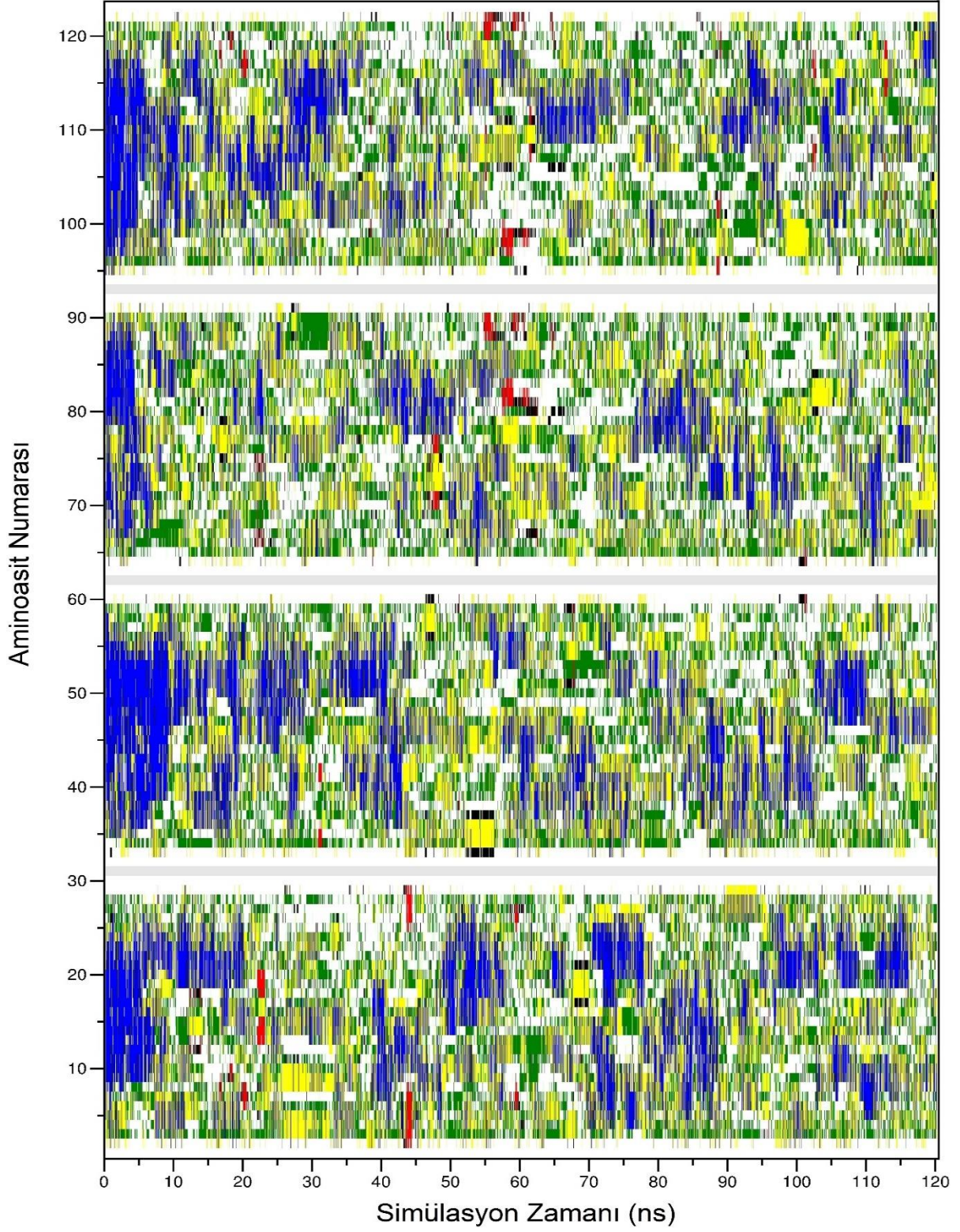
350K



Şekil 5.7 MD simülasyonları boyunca 350 K sıcaklıktaki DSSP analizi.

500K

- | | | | | |
|---|---|---|---|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Rastgele Sarım | <input type="checkbox"/> Kıvrılma | <input type="checkbox"/> α -Heliks | <input type="checkbox"/> 3-Heliks | <input type="checkbox"/> 5-Heliks |
| <input type="checkbox"/> Dönüş | <input type="checkbox"/> β -Köprüsü | <input type="checkbox"/> β -Yaprağı | <input type="checkbox"/> Zincir ayırıcı | |

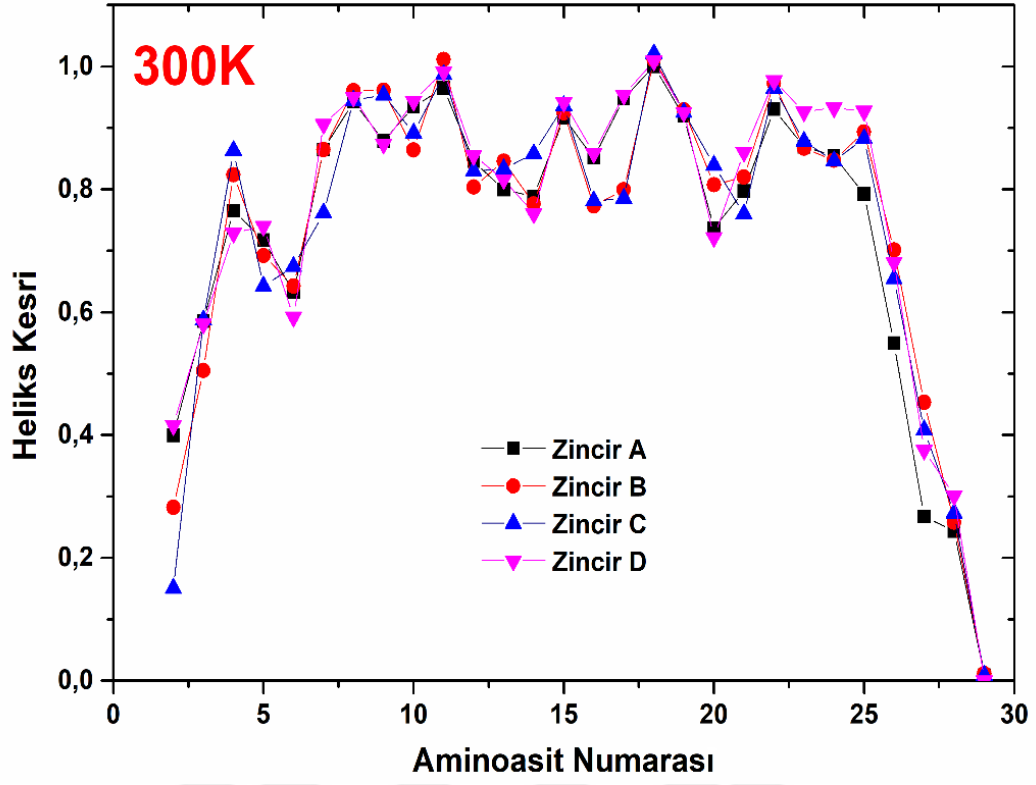


Şekil 5.9 MD simülasyonları boyunca 500 K sıcaklıktaki DSSP analizi.

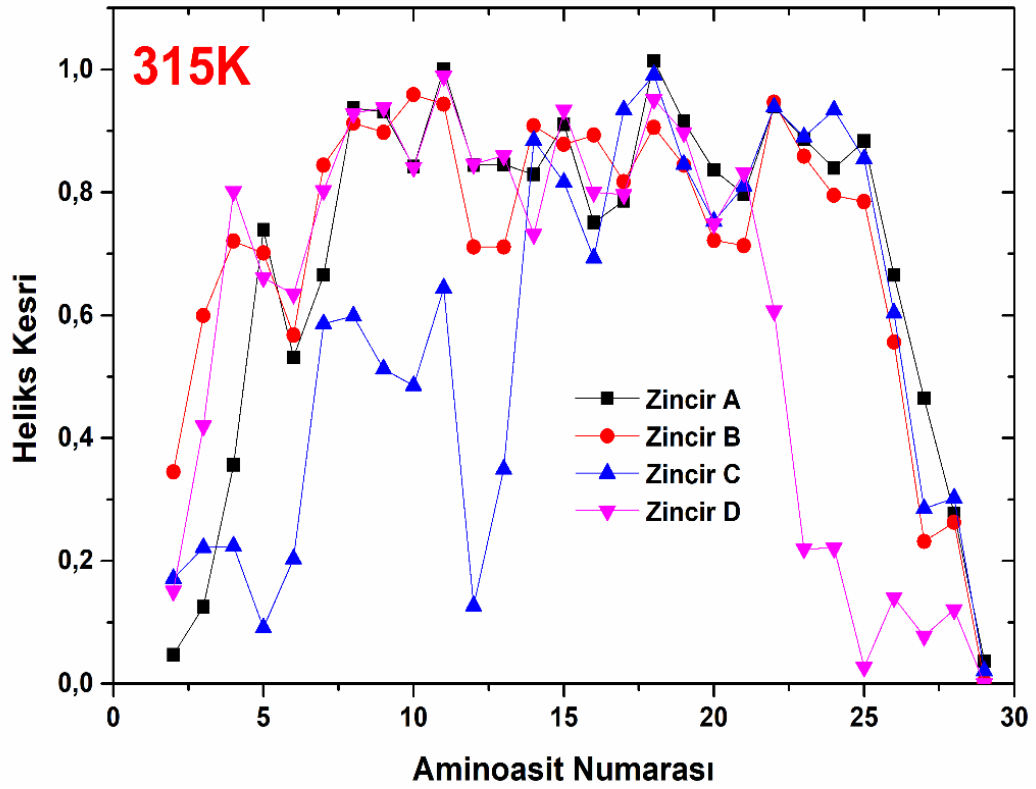
DSSP analizi ile elde edilmiş ve yukarıda verilen sonuçları destekleyen benzer sonuçlar Şekil 5.10-5.15' den de görülebilir. Bu şekiller, ilgilenilen sıcaklıklarda her bir HexCoil-Ala zincirindeki aminoasitlerin simülasyonlar boyunca sahip olduğu ortalama heliks kesirlerini vermektedir. Buradaki kesrin "1" olması, bu sayının karşılığı olan aminoasitler arasındaki heliks oranının ortalama olarak simülasyon boyunca korunduğunu göstermektedir. Şekillerden de anlaşılacağı üzere, tıpkı DSSP analizlerinde olduğu gibi, özellikle zincirlerin uç bölgelerinde yer alan aminoasitlerin sahip olduğu heliks kesir değerleri diğerlerine göre çok düşüktür. Bu da uç bölgelerdeki aminoasitlerin merkez bölgelerindekilere göre daha fazla serbestliğe sahip olması gerçeğine dayanmaktadır. Yine DSSP sonuçlarına benzer şekilde, 315 ve 350 K sıcaklıklarda C ve D zincirlerindeki heliks kesirlerinin düşmeye başladığı gözlemlenmektedir. Artan sıcaklıkla beraber zincirlerdeki heliks kesri değerlerinde hafif bir düşüş olsa da zincirlerin özellikle heliks kesri bakımından 400 K sıcaklığa kadar oldukça kararlı bir yapı sergilediği söylenebilir. Bu analiz sonuçlarımız aynı zamanda, literatürde Roxbury ve arkadaşları tarafından SWCNT varlığında HexCoil-Ala'nın altı zincirli formunun sergilediği davranışlar ile benzerlikler sergilemektedir (Roxbury et al. 2013).

DSSP ve heliks kesri analizleri birlikte değerlendirildiğinde, ilgilenilen tetramerik HexCoil-Ala demetindeki zincirlerin %90 baskın α -heliks ikincil yapı karakterlerini genel olarak 400 K sıcaklığına kadar koruduğu ve bu baskın ikincil yapıların çoğunlukla zincirlerinin uç bölgelerinde farklı ikincil yapılara dönüştüğü söylenebilir. Uçlardaki bu durum da, terminal bölgelerin daha esnek oluşu ve çözeltiyle daha fazla hidrofobik etkileşime girmesinden kaynaklandığı gerçeği ile açıklanabilir. 500 K sıcaklığı için şu ana kadar yapılan analizlerin sonuçları, bu sıcaklıkta zincir yapılarının doğal konformasyonel özelliklerini kaybettiği ve hatta RMSD sonuçlarındaki yüksek değerler, demetin tetramer bütünlüğünün bozulduğu ve dolayısıyla tetramerik yapının kompaktlığını kaybettiği fikrini vermektedir.

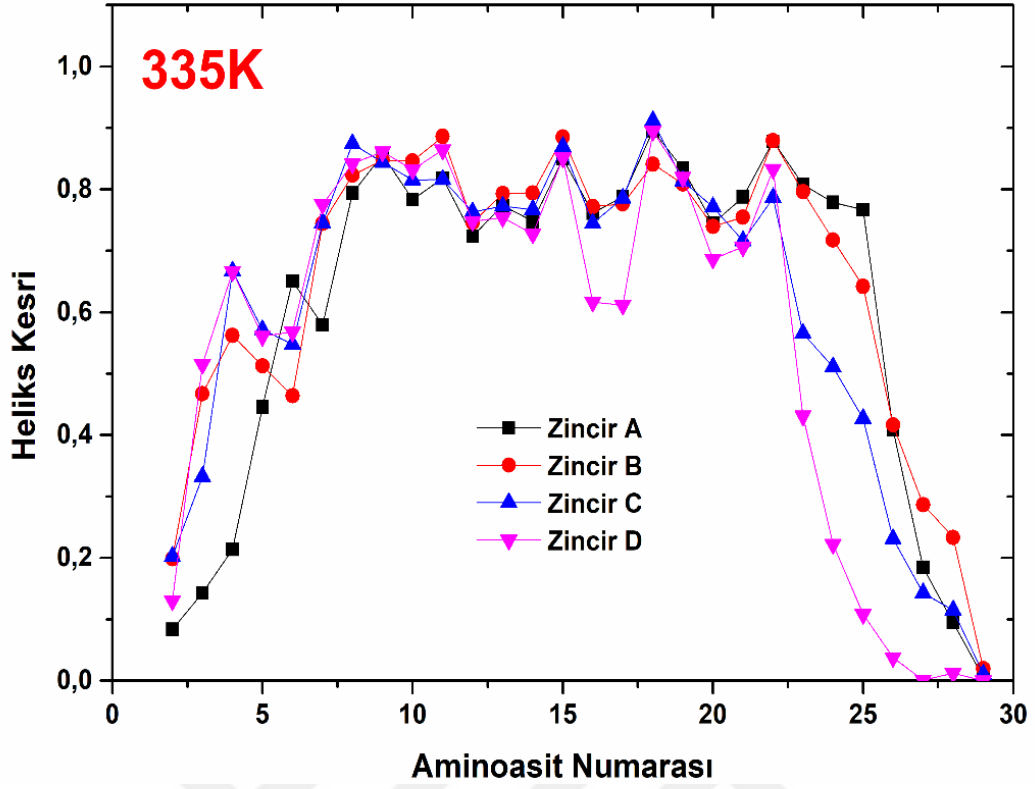
Bu sebeple, yapının konformasyonel kararlılığı ve kompaktlığı hakkında daha ayrıntılı bilgi edinebilmek amacıyla yapılan analizlere ilaveten, jirasyon yarıçapları (radius of gyration), kontak sayıları ve zincirlerin uçtan uca uzunlukları (end to end distance) gibi bazı yapısal parametrelere de bakılmış ve elde edilen bu parametreler ilgilenilen her bir sıcaklık için simülasyon zamanına bağlı olarak incelenmiştir.



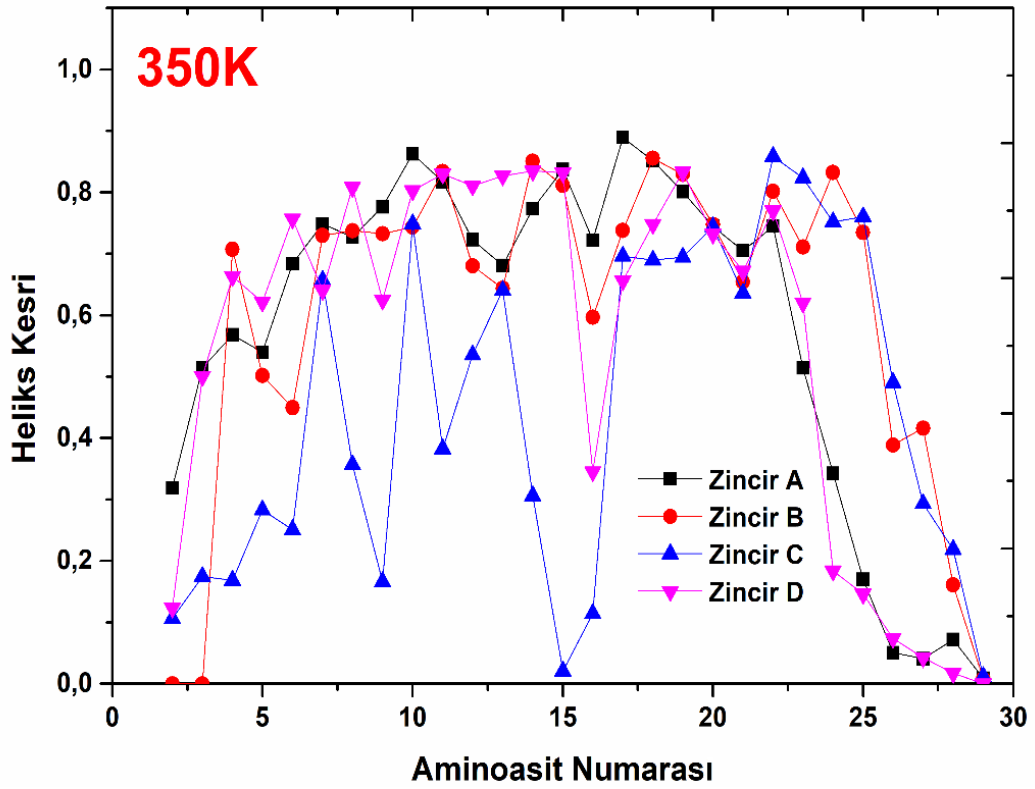
Şekil 5.10 300 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.



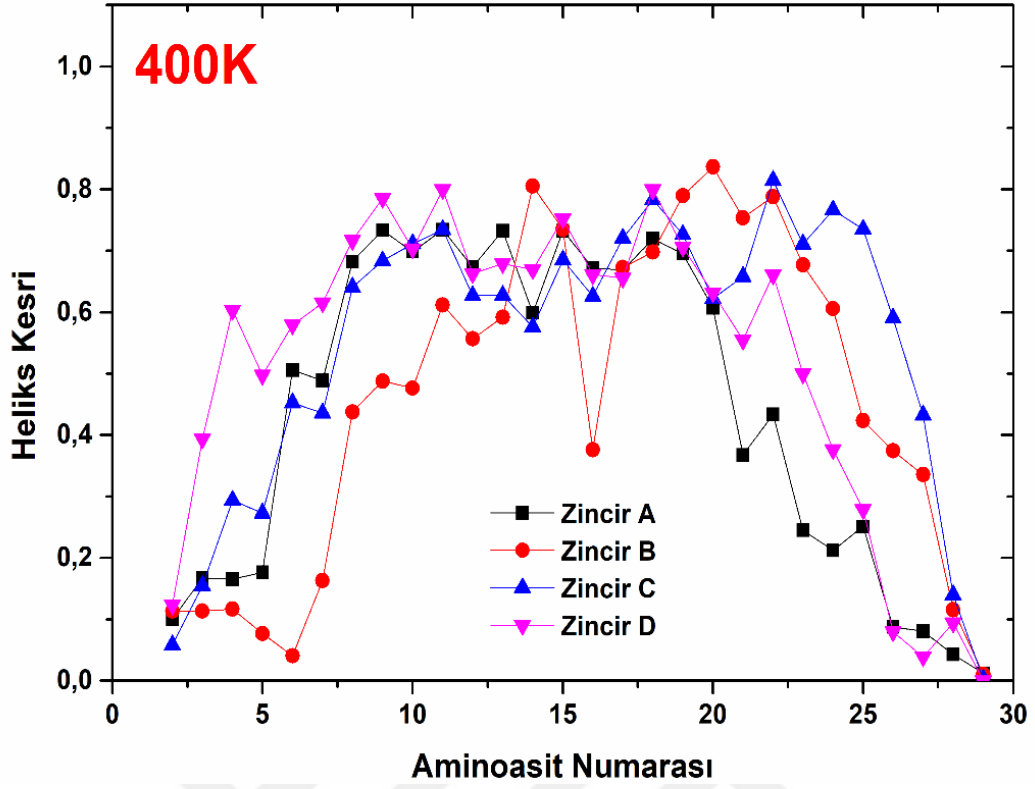
Şekil 5.11 315 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.



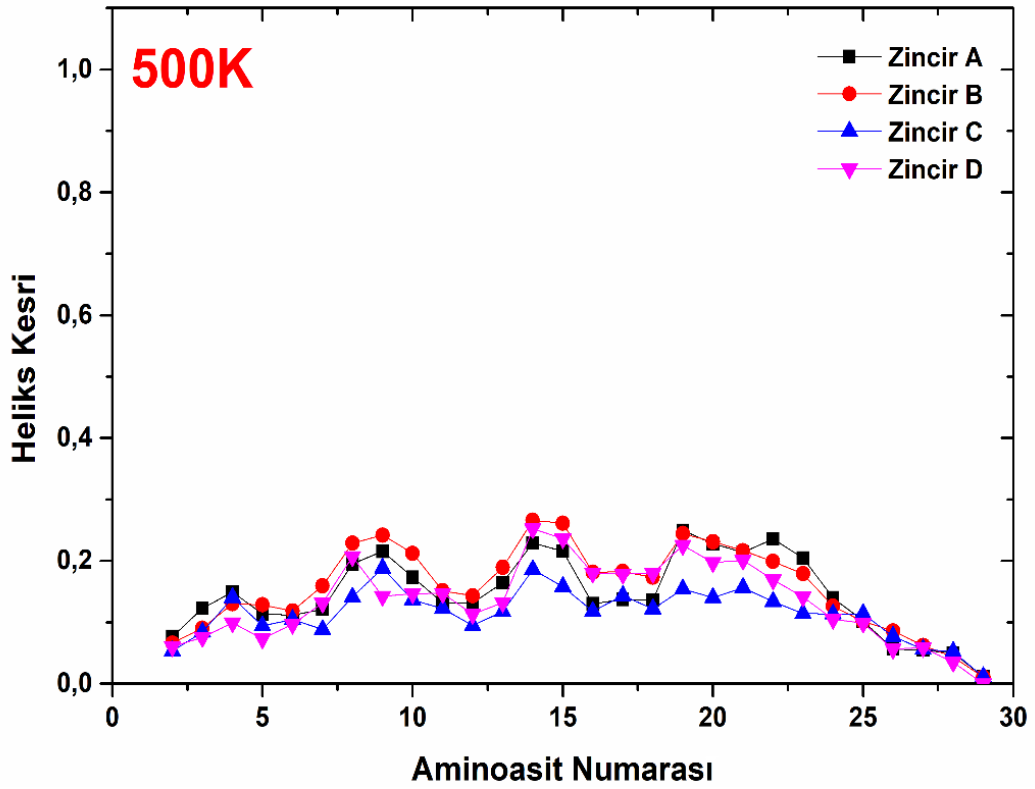
Şekil 5.12 335 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.



Şekil 5.13 350 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.



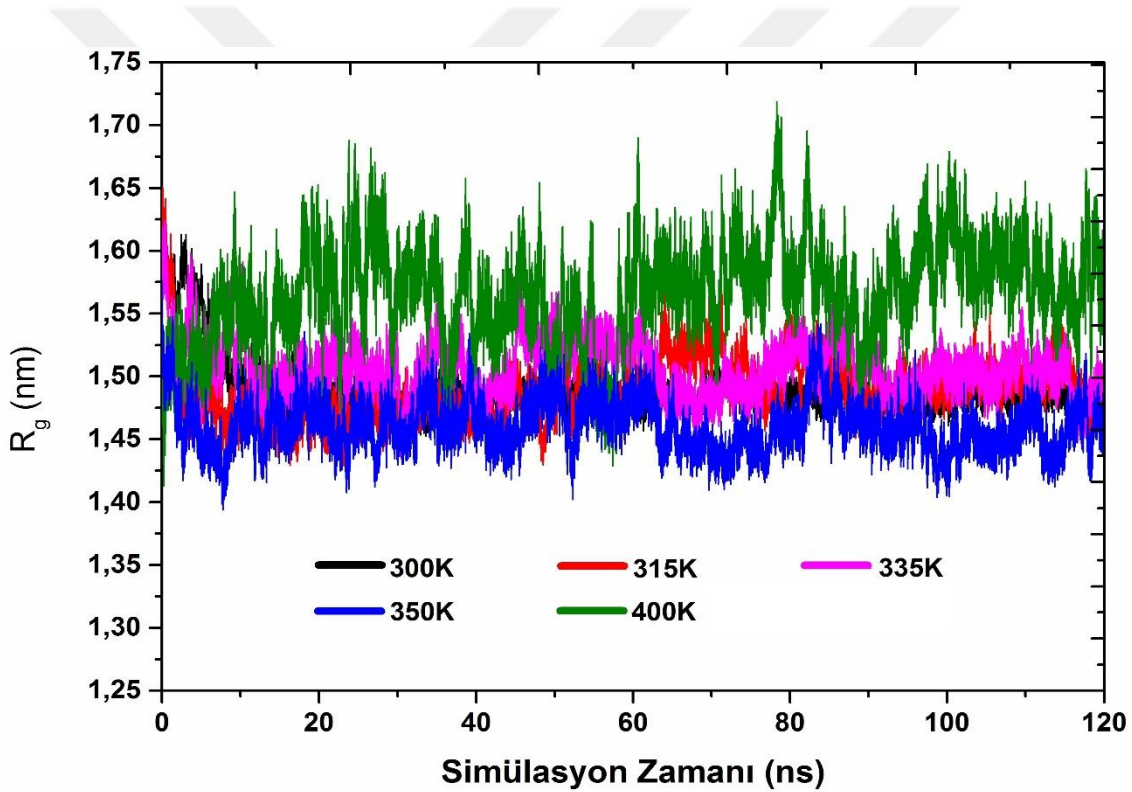
Şekil 5.14 400 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.



Şekil 5.15 500 K' de tetramerik HexCoil-Ala zincirlerindeki aminoasitlerin heliks kesirleri.

Jirasyon yarıçapı (R_g , Radius of gyration) protein sistemindeki her bir atomun, sistemin geometrik olarak merkezine olan uzaklıklarının kare ortalama karekök değerlerini veren ve böylelikle proteinin boyutları hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan bir analiz yöntemidir. Bu yöntemde R_g değerleri, m_i i. atomun kütlesi ve r_i i. atomun konumu olmak üzere Eşitlik (5.2) ile hesaplanabilir. Şekil 5.16' da her bir sıcaklık için simülasyonlar boyunca bu eşitlikle hesaplanan R_g değerleri bir arada gösterilmektedir.

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i}} \quad (5.2)$$



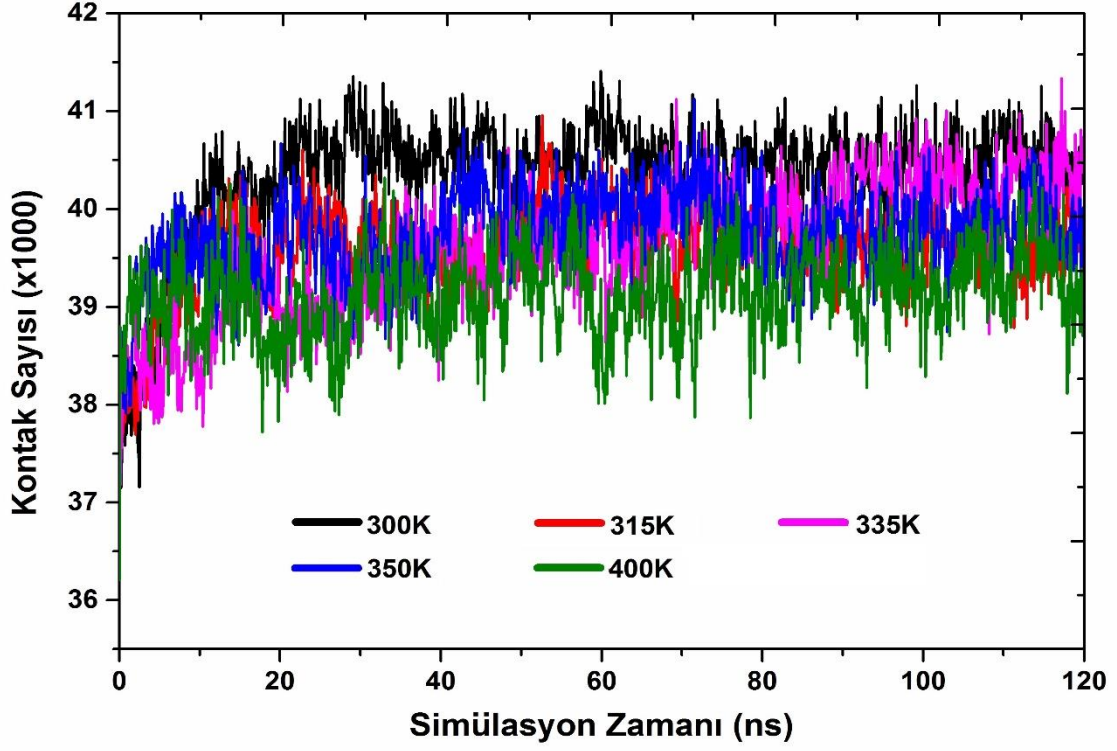
Şekil 5.16 MD simülasyonları boyunca R_g değerlerindeki değişimler.

Şekil 5.16' da verilenlere göre, R_g değerleri, 400 K hariç, diğer sıcaklıklar için 1.45-1.52 nm aralığında olup birbirine oldukça yakındır. Diğer yandan, 400 K sıcaklıktaki ortalama R_g değeri 1.57 nm iken bu değer 500 K' de ~8 nm olarak tespit edildiğinden, tıpkı RMSD sonuçlarında olduğu gibi skala uyumsuzluğundan grafikte sergilenememiştir. Bu sonuçlar, yapımızın özellikle 400 K sıcaklığa kadar kompaktlığını büyük ölçüde koruduğunu, ancak bu sıcaklıktan

sonra R_g değerlerindeki artış ile sistemin boyutsal olarak daha büyük hale geldiği ve dolayısıyla kompaktlığının azaldığını göstermektedir. O halde sıcaklık artışıyla birlikte, özellikle 400 K' den sonra tetramerik HexCoil-Ala demetini oluşturan dörtlü zincirin birbirinden uzaklaşmaya başladığı söylenebilir.

Yapının kompaktlığı hakkında daha fazla bilgi edinebilmek için HexCoil-Ala'nın tetramerik formundaki atomların, birbirleriyle olan kontak sayısı hesaplanmıştır. Kontak sayısı birbiriyle belirli bir etkileşim mesafesi içerisindeki yakın temas halinde olan atomların sayısını ifade etmektedir. Bu hesaplamayı yaparken sistemdeki her bir atom için, ilgilenilen atomu çevreleyen 0.4 nm' lik yarıçapa sahip küresel bir hacim içerisindeki diğer atomların sayısı dikkate alınmış ve bu hacim içerisinde kalan bu atomların ilgilenilen atomla kontak halinde olduğu kabul edilmiştir. Bu işlem sistemdeki her bir atom için gerçekleştirilip sistemin toplam kontak sayısı elde edilmiş ve hesaplama sonuçları Şekil 5.17' de sergilenmiştir. Şekilden anlaşıldığı üzere, sıcaklık artışıyla demeti oluşturan zincirlerin birbirinden uzaklaşmasıyla kontak sayılarında bir miktar düşüşler olmasına rağmen, hesaplanan sayılar hala birbirine yakın ve büyük sayılardır. Bu sayıların büyüklüğü, tetramerik yapıımızda birbiriyle temas halinde olan atomların fazlalığını, dolayısıyla sistemin çoğunlukla kompakt bir yapıda olduğunu göstermektedir. 500 K' de elde edilen kontak sayıları diğerlerine göre çok düşük olduğundan bu grafikte sergilenememiştir. Sayılardaki bu küçüklük, 500 K sıcaklıkta yapının kompaktlığını kaybettiğinin ve dörtlü zincir demetinin ayrıştığıın bir göstergesidir. Diğer yandan, kontak sayıları vasıtasıyla ulaştığımız bu sonuçların R_g değerlerinin verdiği sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Tetramerik zincir demetinin kompaktlığı ve ısısal kararlılığı hakkında bilgi veren R_g ve kontak sayısı analizleri ile konu hakkında belli bir fikir sahibi olduktan sonra, kompaktlığının daha detaylı incelenebilmesi amacıyla, ilgilenilen tüm sıcaklıklarda tetramerik HexCoil-Ala demetini oluşturan zincirlerin uçtan uca mesafeleri ölçülmüş ve bunların simülasyon boyunca ortalama değerleri Çizelge 5.2' de sunulmuştur. Tek bir HexCoil-Ala zincirinin doğal halinin uçtan uca mesafesinin 4.56 nm olduğu göz önünde tutulduğunda, çizelgedeki sonuçlar ışığında, 400 K sıcaklığa kadar bazı küçük değişimler olmakla birlikte, dört zincirli bu yapının her bir zincirinin yaklaşık olarak doğal uzunluklara yakın bir davranış sergilediği ve kompaktlığını koruduğu söylenebilir.



Şekil 5.17 MD simülasyonları boyunca kontak halindeki atomların sayısı.

Çizelge 5.2 Tetramerik yapının her bir zincirinin ortalama uçtan uca uzunlukları.

T[K]	Uçtan uca uzunluklar (nm)				
	Zincir A	Zincir B	Zincir C	Zincir D	Tüm Zincirler
300	4.73 ^a (0.29) ^b	4.77 (0.24)	4.78 (0.23)	4.71 (0.26)	4.75 (0.03)
315	4.85 (0.36)	4.79 (0.27)	4.06 (0.55)	4.42 (0.55)	4.53 (0.36)
335	4.33 (0.74)	4.64 (0.33)	4.63 (0.55)	4.62 (0.59)	4.56 (0.15)
350	4.11 (0.73)	4.11 (0.23)	3.91 (0.65)	4.28 (0.30)	4.10 (0.15)
400	4.32 (0.76)	4.48 (0.60)	3.99 (0.58)	4.16 (0.57)	4.24 (0.21)
500	2.43 (0.94)	2.44 (1.09)	2.50 (1.08)	2.57 (1.06)	2.49 (0.06)

^a Ortalama değer, ^b Standart sapmalar

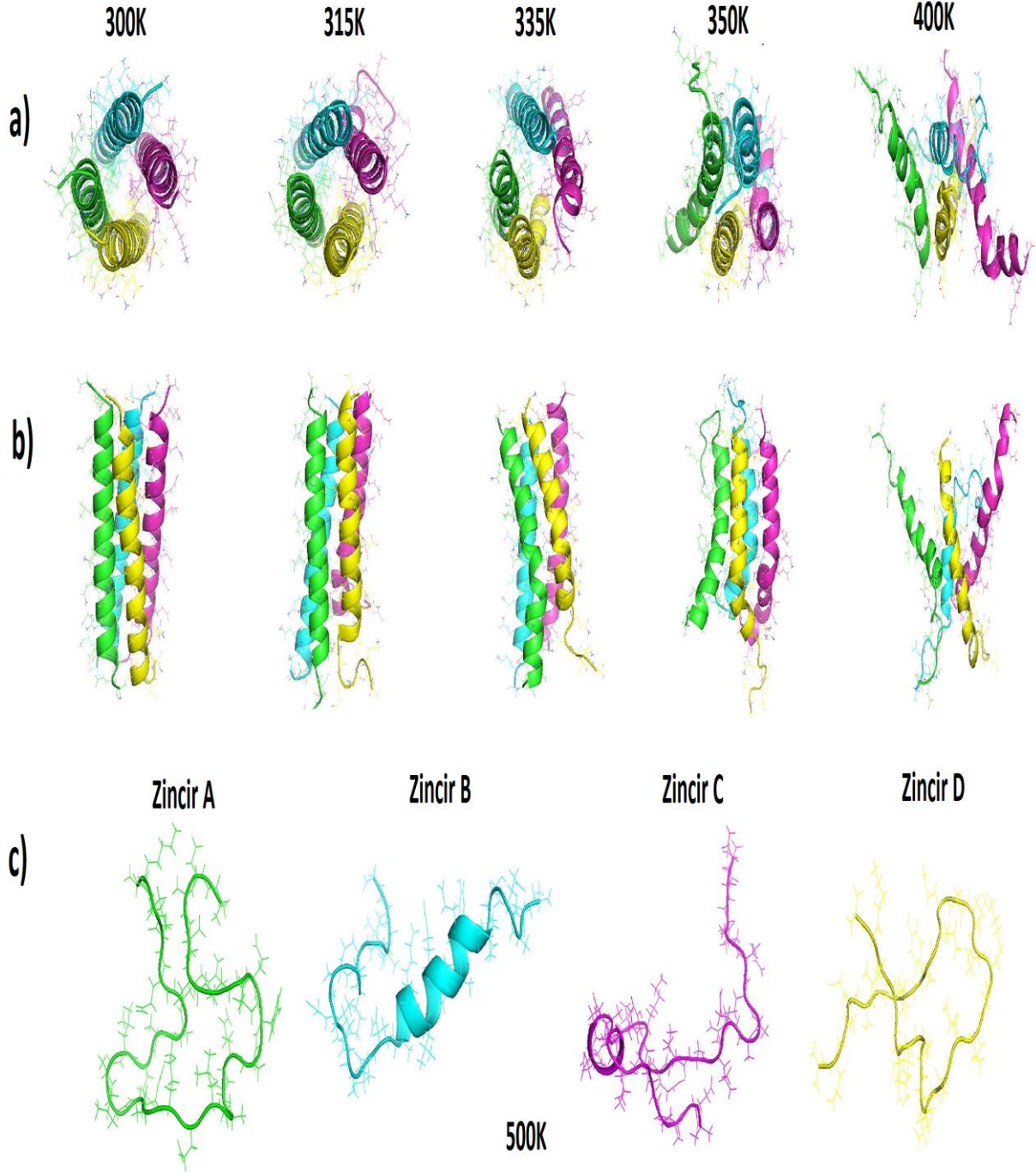
Zincirlerin ortalama uçtan uca mesafeleri daha detaylı olarak incelendiğinde, 300 K sıcaklıkta elde edilen değerlerin doğal yapıya göre biraz fazla olduğu (~0.2 nm), 315 K sıcaklıkta ise bu ortalama mesafenin doğal mesafe değerine daha yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca 335 K’deki ortalama uçtan uca mesafe değerlerinin, doğal uçtan uca mesafe olan 4.56 nm değerinde

ve bundan sonraki sıcaklıklar içinse bu değerlerin, doğal değere göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. 500 K için hesaplanan uçtan uca mesafe değerinin doğal yapı değerinin neredeyse yarısı olması, 500 K’ de zincirlerin uç bölgelerinin birbirine oldukça yaklaştığı ve neredeyse bir doğru eksen boyunca sarılmış şekilde olan helikslerin bozulduğu fikrini vermektedir. Bu sonuç ta yapının güçlü hidrofobik etkileşime sahip uç bölge aminoasitlerine sahip olması ile açıklanabilir. Diğer yandan, HexCoil-Ala’ nın dört zincirli yapısının 500 K’ deki bu davranışı literatürdeki benzer dört zincirli örneklere göre farklılıklar sergilemektedir (Sieradzan et al. 2012; Yaşar et al. 2014). Literatürdeki dört zincirli örneklerde, sıcaklık artışıyla monomerlerin uçtan uca uzunluk mesafeleri artmakta ve dolayısıyla zincirlerin uç bölgeleri birbirinden daha da uzaklaşmaktadır. Bizim incelediğimiz Tetramerik HexCoil-Ala sisteminin farklı sıcaklıklarda kazandığı konformasyonel yapıları görsel olarak sergileyebilmek amacıyla, ilgili sıcaklıklarda simülasyonlar boyunca en çok rastlanan üç boyutlu şekillenimler “küme (cluster) analizi” (Daura et al. 1999) yapılarak tespit edilmiş, bu en çok rastlanan yapılardan herhangi bir tanesi alınarak çizilmiş ve ilgili sıcaklıklarda elde edilen sonuçlar Şekil 5.18’ de bir arada verilmiştir.

Bu görseller incelendiğinde, özellikle 400 K sıcaklığa kadar sistemin tetramerik demet bütünlüğünün ve zincirlerdeki heliksel formun genel olarak korunduğu ve 400 K’ de diğer düşük sıcaklıklara göre, zincirlerin heliksel formunun genel olarak korunmakla birlikte tetramerik demet bütünlüğünün bozulmaya başladığı görülmektedir. Diğer yandan 500 K sıcaklıkta ise tıpkı buraya kadar sunulan analiz sonuçlarından elde edilen tüm bulguların işaret ettiği gibi, zincirlerin ikincil yapı formlarının çoğunlukla değiştirerek uç bölgelerinin birbirine yaklaştığı ve tetramerik demet formundaki HexCoil-Ala zincirlerinin birbirinden ayrılarak demet bütünlüğünün tamamen bozulduğu görülmektedir. Bundan dolayıdır ki Şekil 5.18.c’ de 500 K sıcaklık için HexCoil-Ala zincirleri ayrı ayrı verilmiştir.

Buraya kadarki çalışmalarımızda, Tetramerik HexCoil-Ala demetinin konformasyonel kararlılığı ve kompaktlığına sıcaklığın etkisi çeşitli yollarla araştırılmıştır. Yapılan bu farklı analizlerde elde edilen sonuçlarının ortalama değerleri Çizelge 5.3’ de bir arada sergilenmektedir. Çizelgedeki değerler detaylı incelendiğinde, tetramerik sistemin RMSD ve ortalama heliks popülasyon değerlerinin birbirini destekler şekilde, 400 K sıcaklığına kadar genel olarak tetramerik yapının doğal konformasyonunu koruduğunu göstermektedir. Yapının

kompaktlığının tespiti amacıyla yapılan R_g ve kontak sayıları için elde edilen değerleri de yine birbirini destekleyecek şekilde, 400 K sıcaklığına kadar tetramerik HexCoil-Ala demetinin kompaktlığını koruduğunu işaret etmektedir.



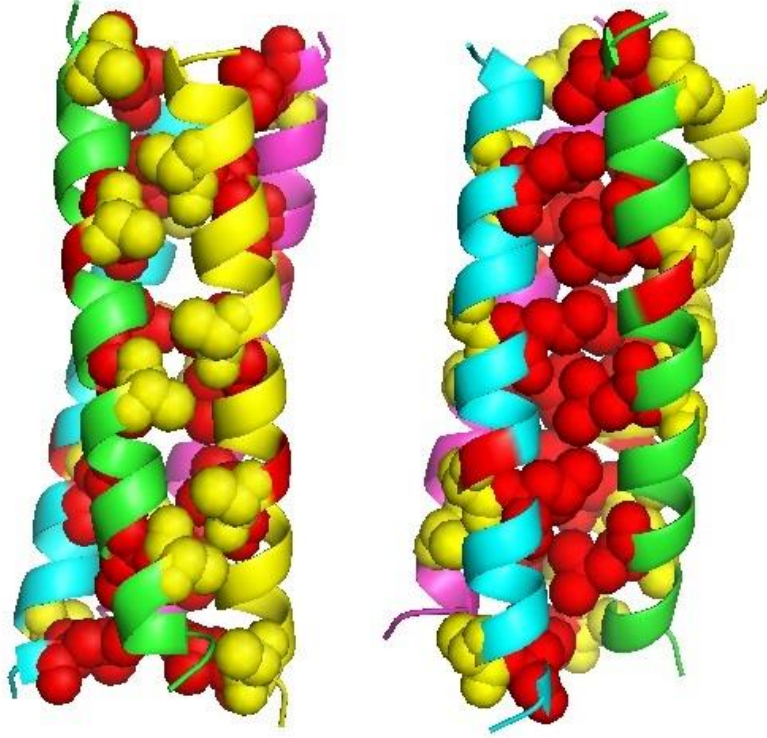
Şekil 5.18 Farklı sıcaklıklarda tetramerik sistemin en çok rastlanan yapılarının a) üstten görünüşü b) yandan görünüşü c) 500 K daki her zincir için konfigürasyonu (dört zincirli form yok). Renklendirme: yeşil, zincir A; mavi, zincir B; pembe, zincir C; sarı, zincir D.

Çizelge 5.3 Tetramerik HexCoil-Ala demeti için elde edilen ortalama değerlerin özeti.

T[K]	RMSD (nm)	Ortalama α -Heliks polülasyonu (%)	R _g (nm)	Kontak sayısı	Ortalama uçtan uca uzunluk (nm)
300	0.303 ^a (0.041) ^b	87.5 (2.8)	1.49 (0.02)	40355 (601)	4.75 (0.03)
315	0.398 (0.033)	85.2 (4.0)	1.50 (0.03)	39613 (465)	4.53 (0.36)
335	0.400 (0.071)	81.4 (5.3)	1.51 (0.02)	39618 (669)	4.56 (0.15)
350	0.603 (0.023)	71.2 (4.9)	1.46 (0.02)	39751 (460)	4.10 (0.15)
400	0.710 (0.034)	66.0 (5.3)	1.56 (0.04)	39133 (451)	4.24 (0.21)
500	7.731 (3.066)	19.8 (6.2)	8.26 (3.12)	15339 (968)	2.49 (0.06)

^a Ortalama değer, ^b Standart sapmalar

Şu ana kadar yapılan tüm analizlerin sonuçları, ilgilendiğimiz yapının 400 K' e kadar konformasyonel yapısını ve tetramerik zincir demeti bütünlüğünü koruduğu, 500 K' de ise zincirlerin konformasyonel kararlılığının değişerek farklı ikincil yapı konformasyonlarının oluştuğu ve artık demetin kompaktlığını kaybettiği fikrini ortaya koymuştur. Yapının tetramerik demet bütünlüğünü daha detaylı araştırmak amacıyla, HexCoil-Ala zincirleri ya da heliksleri arasındaki mesafeler incelenmiştir. Daha önce bahsedildiği üzere HexCoil-Ala zincirleri, sahip olduğu özel sarılmış-sarmal yapısal motifi nedeniyle zincirler arası iki tip heliks-heliks ara yüzeyine sahiptir. Bunlar sarılmış-sarmal motifindeki ortak geometrik "e" pozisyonundaki lösiner tarafından oluşturulan Leu-Zipper ve ortak geometrik "d" pozisyonundaki alaninler tarafından oluşturulan Ala-Coil ara yüzeyleridir. Bunlar HexCoil-Ala zincirlerinin yapısal kararlılığını ve tetramerik demetin bütünlüğünü büyük ölçüde artıran ara yüzlerdir. Bu ara yüzlerdeki atom çiftleri arasındaki ortalama mesafeler ölçülerek tetramerik yapının zincirlerinin birbirine göre uzaklıkları, dolayısıyla tetramerik demetin bütünlüğü hakkında bilgi edinebilir. Dört zincirli yapımızda oluşan bu ara yüzeyler ve ölçüm yapılan atom çiftleri Şekil 5.19' da sergilenmiştir. Leu-Zipper ara yüzleri A+B ve C+D zincirleri arasında, Ala-Coil ara yüzleri ise B+C ve D+A zincirleri arasındadır. Tetramerik yapımızın simülasyonundan elde edilen bu sayısal değerler, literatürdeki HexCoil-Ala' nın dört zincirli formunun kristal yapısı, kuramsal altı zincirli yapısı ve altı zincirli yapının simülasyon sonuçları ile kıyaslanmış ve sonuçlar Çizelge 5.4' de bir arada sergilenmiştir.



Şekil 5.19 HexCoil Ala'nın Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyleri. Renklendirme: yeşil, zincir A; mavi, zincir B; pembe, zincir C; sarı, zincir D, sarı küreler; alanin aminoasit atomları, kırmızı küreler, lösin aminoasit atomları.

Çizelge 5.4' de sunulan, sıcaklığa bağlı olarak simülasyonlar sonucu tetramerik zincirler için elde ettiğimiz değerler literatürle kıyaslandığında, Leu-Zipper ara yüzeyleri için elde edilen değerlerin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Diğer yandan, Ala-Coil ara yüzeyleri için elde ettiğimiz heliksler arası mesafelerin, özellikle 300, 315K ve 335 K düşük sıcaklıklarında, literatürdeki deneysel değerlerden bile küçük olduğu açıktır. Literatürde SWCNT varlığında hekzamerik zincir demeti halinde modellenen yapı için elde edilmiş simülasyon sonuçlarının, aynı yapı için kuramsal olarak hesaplanan ve bizim tetramerik zincir demeti için simülasyon ile hesapladığımız değerlere göre yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni aromatik Tayrosin aminoasidinin SWCNT yüzeyi ile kontak kurmak için Ala-Coil yüzeylerin arasından sızması ve bu yüzeylerdeki karalılığı bozması olarak gösterilmiştir (Roxbury et al. 2013). Çünkü aromatik aminoasitler halkalı yapıda yan zincirlere sahiptirler ve bu halkalı yan zincirler karbon nano tüpün yüzeyi ile etkileşme eğilimindedirler. SWCNT olmadan tasarlanmış tetramerik zincir demeti yapımızın simülasyonundan elde ettiğimiz Ala-Coil ara yüzey mesafelerinin kuramsal değerlerden de düşük çıkması, bu sızma ihtimalini desteklemektedir. İlerde yapılacak muhtemel protein tasarımı ya da biyolojik yapı çalışmalarında, bu ihtimalin göz önüne alınması önemli bir sonuçtur. Yine ilgili çizelge incelendiğinde, 350 ve 400 K' deki Ala-Coil ara yüzeyler için

ortalama mesafe değerlerinin ise literatürdekilerden yüksek olduğu görülmektedir. Bu değerlerin yüksek çıkmasının, özellikle HexCoil-Ala'nın A ve D zinciri arasındaki mesafelerin artmasından kaynaklandığı söylenebilir. Diğer yandan, 500 K sıcaklıkta her iki ara yüzey için elde edilen tüm değerlerin oldukça büyük olması, diğer analiz sonuçlarında da işaret edildiği gibi, HexCoil-Ala zincirlerin birbirinden ayrıldığını ve tetramerik demet bütünlüğünün artık bu sıcaklıkta tamamen kaybolduğunu açıkça göstermektedir.

Çizelge 5.4 HexCoil Ala'nın çok zincirli farklı yapıları için Ala-Coil ve Leu-Zipper ara yüzeyler arası uzaklıklar.

	Ala-Coil Yüzeyler için Heliksler arası mesafeler (nm)			Leu-Zipper Yüzeyler için Heliksler arası mesafeler(nm)		
Tetramer Model	0.855			1.05		
Hekzamer Model	0.867			1.06		
Hekzamer Modelin Simülasyonu ^c	1.30 (B+C)	1.30 (D+E)	0.986(F+A)	1.03 (A+B)	1.12 (C+D)	1.04(E+F)
Tetramer Modelin Simülasyonu	B+C	D+A	Tümü	A+B	C+D	Tümü
300 K	0.662 ^a (0.025) ^b	0.803(0.029)	0.733(0.099)	1.017(0.028)	1.053(0.038)	1.035(0.025)
315 K	0.843(0.036)	0.675(0.028)	0.759(0.119)	1.008(0.033)	1.060(0.046)	1.034(0.037)
335 K	0.860(0.158)	0.701(0.058)	0.781(0.112)	1.044(0.124)	1.075(0.079)	1.060(0.022)
350 K	0.852(0.075)	1.327(0.036)	1.090(0.336)	0.961(0.039)	1.029(0.036)	0.995(0.048)
400 K	1.001(0.033)	1.549(0.056)	1.275(0.387)	0.773(0.045)	1.046(0.057)	0.910(0.193)
500 K	3.460(1.816)	3.868(1.772)	3.664(0.288)	3.825(1.959)	3.187(1.841)	3.506(0.451)

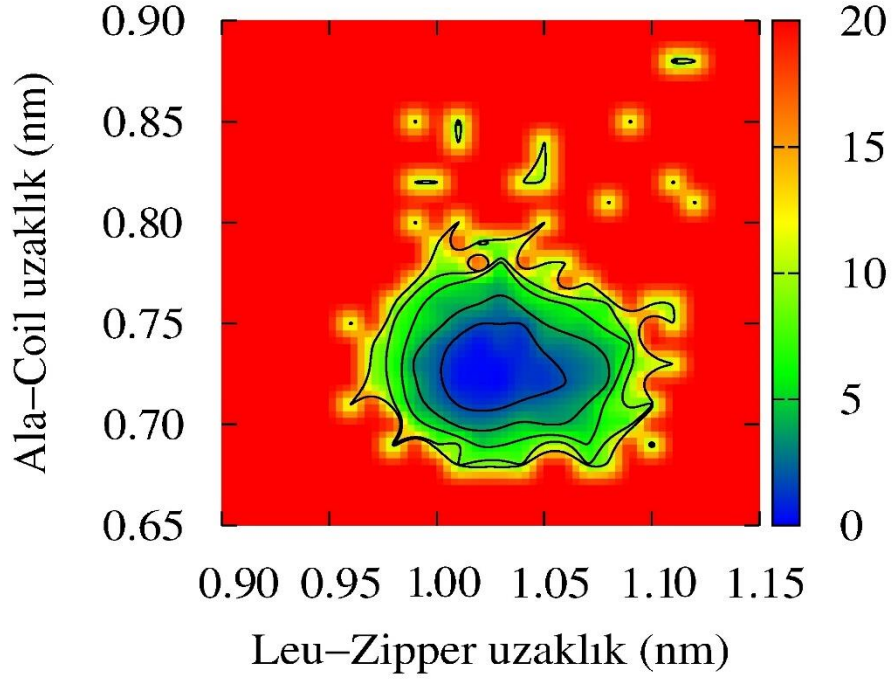
^a Ortalama değerler, ^b Standart sapmalar, ^c Roxbury et al. (2013)' dan alınan değerler.

Protein/peptid yapılarının ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve mekanizmaların ortaya konulmasında yukarıda kullanılan yaklaşımların yanı sıra, yapıların katlanması, topaklanması

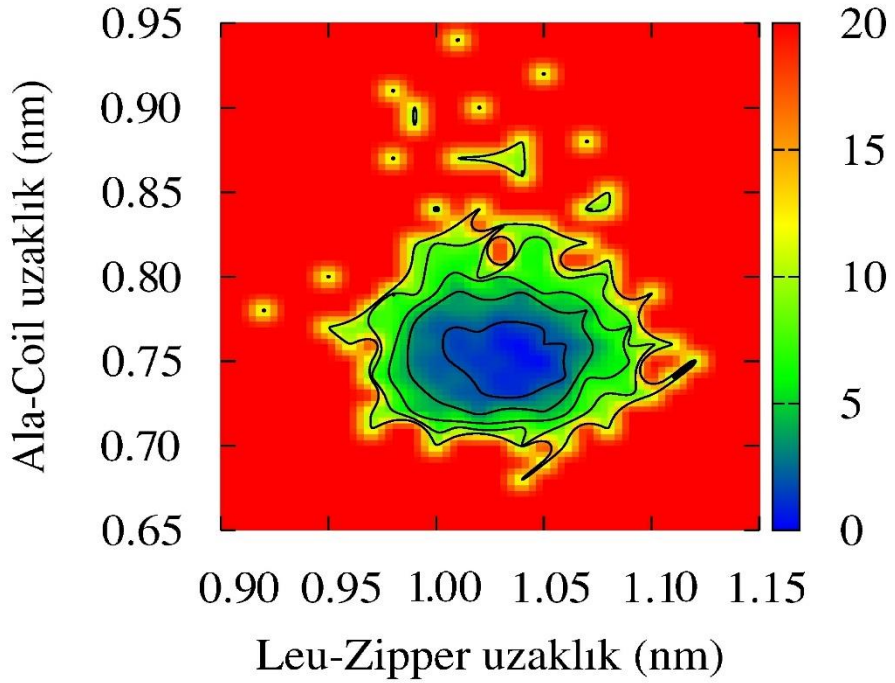
ve kararlılığı hakkındaki bazı bilgiler, sistemlerin serbest enerjisi ile de ortaya çıkarılabilmektedir. Bir sistemin serbest enerji yüzeyleri, Eşitlik (5.3)' de verilen sistemin Gibbs enerjisindeki değişimle elde edilir.

$$\Delta G(R) = -k_B T [\ln P(R) - \ln P_{mak}] \quad (5.3)$$

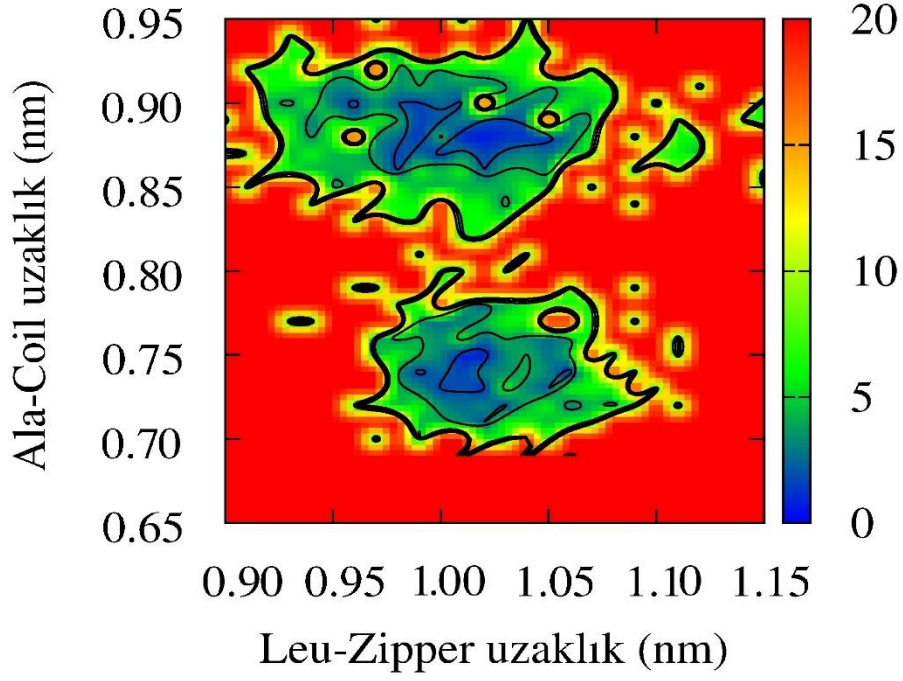
burada k_B Boltzman sabiti, T sıcaklık, P “R” reaksiyon koordinatlarının olasılık dağılımı ve P_{mak} ise $\Delta G=0$ yapacak şekilde seçilen moleküler sistemin maksimum olasılık dağılımıdır. R’lerin yani reaksiyon koordinatlarının literatürdeki popüler seçimleri, genellikle Rg, RMSD, kontak sayısı, hidrojen bağ sayısı gibi incelenecek sistem özelliklerine göre değişmektedir. Bu çalışmada, tetramerik HexCoil-Ala demetinin bütünlüğü hakkında daha detaylı bilgi edinebilmek için Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzeyleri için heliksler arası ortalama mesafelerin reaksiyon koordinatı olarak kullanıldığı serbest enerji yüzeyleri hesaplanmıştır. 300, 315, 335, 350 ve 400 K sıcaklıkları için hesaplanan bu serbest enerji yüzeyleri sırasıyla Şekil 5.20-5.24’ler de sergilenmiştir. Bu serbest enerji yüzeyleri detaylı incelendiğinde, 300 K sıcaklıkta en düşük serbest enerji bölgesinin, Leu-Zipper yüzeyi için 1.00-1.05 nm ve Ala-Coil ara yüzeyi için ise 0.7-0.75 nm değeri aralığında olduğu görülmektedir. 315 K sıcaklık için elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise Leu-Zipper yüzeyi için en düşük serbest enerji bölgesinin 300 K ile aynı bölgede olduğu, fakat Ala-Coil ara yüzeyi için bu bölgenin 0.73-0.77 nm değeri aralığına tekabül ettiği gözlemlenmiştir. 335 K sıcaklıkta ise enerjinin minimum olduğu yüzeyler ayrılmış iki farklı bölgede gözlemlenmektedir. Bunlardan ilki 300 ve 315 K için elde edilen bölgelerle benzer değer aralığında yer alırken, diğer bölge ise Leu-Zipper yüzey için 0.98-1.04 nm ve Ala-Coil ara yüzey için 0.87-0.90 nm değer aralığındadır. Bu da 335 K sıcaklık değerinde heliksler arası uzaklıklara göre 2 farklı kararlı konformasyonun olabileceğini göstermektedir. 350 ve 400 K için hesaplanan değerlere bakıldığında ise enerjinin minimum olduğu bölgelerin daha farklı bölgelere doğru kaydığı açıkça görülmektedir. 350 K sıcaklıktaki en düşük serbest enerji bölgeleri Leu-Zipper ara yüzeyi için 0.97-1.02 nm, Ala-Coil ara yüzeyi için ise 1.04-1.13 nm aralığında iken, 400 K sıcaklıkta bu bölgelerin sırasıyla, 0.87-0.93 nm ve 1.25-1.29 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, kararlı konformasyonel popülasyonların, artan sıcaklıkla beraber daha yüksek Ala-Coil ve daha düşük Leu-Zipper ara yüzey mesafelerinin olduğu bölgeye doğru hareket ettiği söylenebilir.



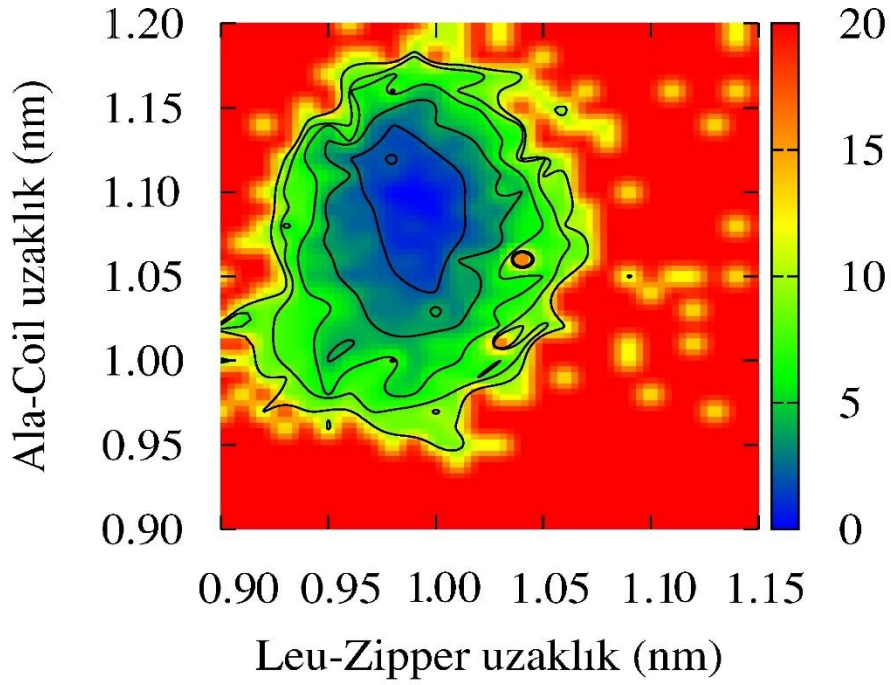
Şekil 5.20 300 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.



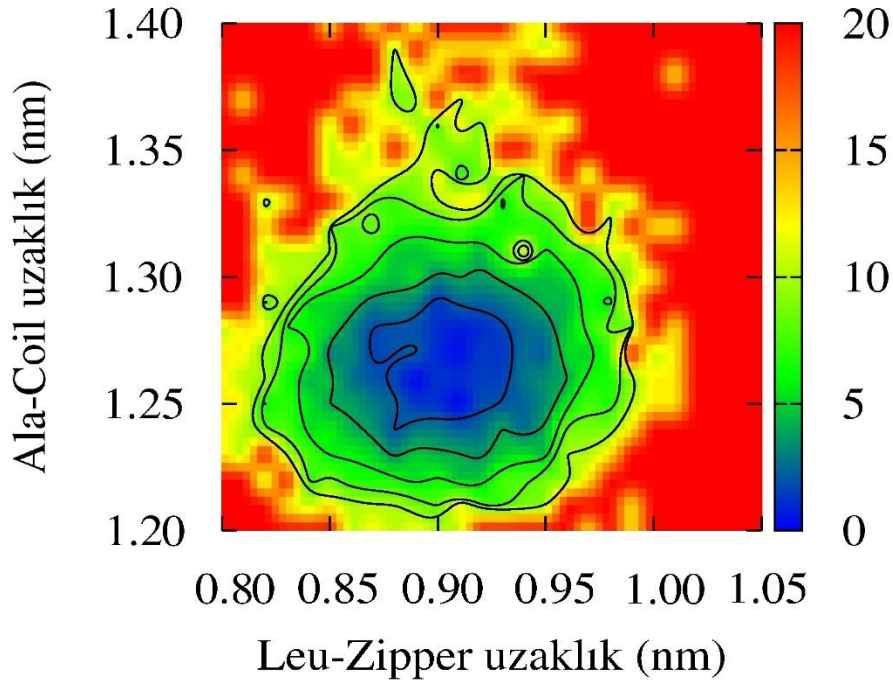
Şekil 5.21 315 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.



Şekil 5.22 335 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.



Şekil 5.23 350 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.



Şekil 5.24 400 K’de tetramerik HexCoil-Ala’nın Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzey uzaklık reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.

Şu ana kadar yapılan tüm analizlerde, 400 K sıcaklığa kadar tetramerik zincir demeti bütünlüğünün ve zincirlerin konformasyonel yapı özelliklerinin çoğunlukla korunduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle DSSP ve heliks kesri analizlerinde, HexCoil-Ala zincirlerinin simülasyonlar boyunca doğal yapısına göre değişimleri izlenmiş ve değişimlerin genellikle zincirlerin uç bölgelerindeki aminoasitlerde fazla olduğu fikrine varılmıştır. Bahsedilen bu değişimlerin sebeplerinin araştırabilmesi amacıyla, çalışmamızda ilaveten kare ortalama karekök yer değiştirme (RMSF, root mean square fluctuations) ve çözeltiliye maruz kalan yüzey alanı (SASA, solvent accessible surface area) analizleri de yapılmıştır. Tetramerik sistemimizin bölgesel kararlılığı hakkında bilgi verebilecek olan RMSF sonuçları Şekil 5.25’ de gösterilmektedir. Bu RMSF değerleri, farklı sıcaklıklar için gerçekleştirilen ve 120 ns süren simülasyonlar boyunca, her bir aminoasidin C_{α} atomlarının konumlarının, simülasyona başlamadan önceki doğal yapıdaki konumlarına göre ortalama değişimlerini ifade etmektedir ve Eşitlik (5.4) ile hesaplanmaktadır.

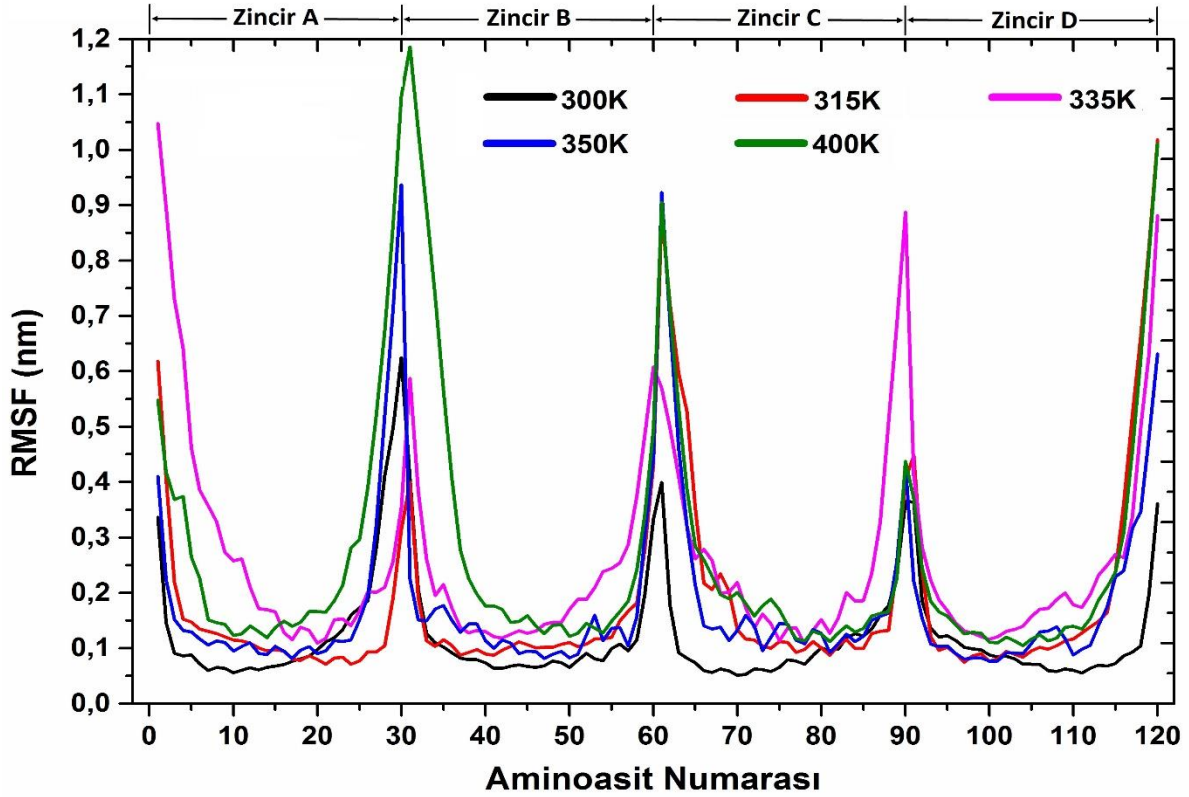
$$RMSF_i = \left[\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2 \right]^{1/2} \quad (5.4)$$

Burada T toplam simülasyon süresi, $r_i(t_j)$ i. atomun j. simülasyon zamanındaki konumu ve r_i^{ref} i. atomun referans yapısındaki konumudur. Şekil 5.25' ten görüleceği üzere, 500 K sıcaklık hariç ilgilenilen tüm sıcaklıklarda RMSF değerleri, zincirlerin merkez bölgesindeki aminoasitler için yaklaşık 0.10-0.17 nm aralığı gibi çok küçük mesafelerde olmasına karşın uç bölgelerdeki aminoasitlerde bu değerler ~1.2 nm gibi yüksek mesafelere ulaşmaktadır. Bu sonuç zincirlerin merkez bölgelerinde bulunan aminoasitlerin önemli derecede kararlı olduğunu ve böylece yapının kompaktlığını koruyabildiğini, ancak zincirlerin uç bölgelerindeki aminoasitlerin doğal yapıya kıyasla konformasyonel olarak farklılıklar gösterdiğini ve dolayısıyla yapısal bozulmaların özellikle bu uç bölgelerden başladığını işaret etmektedir.

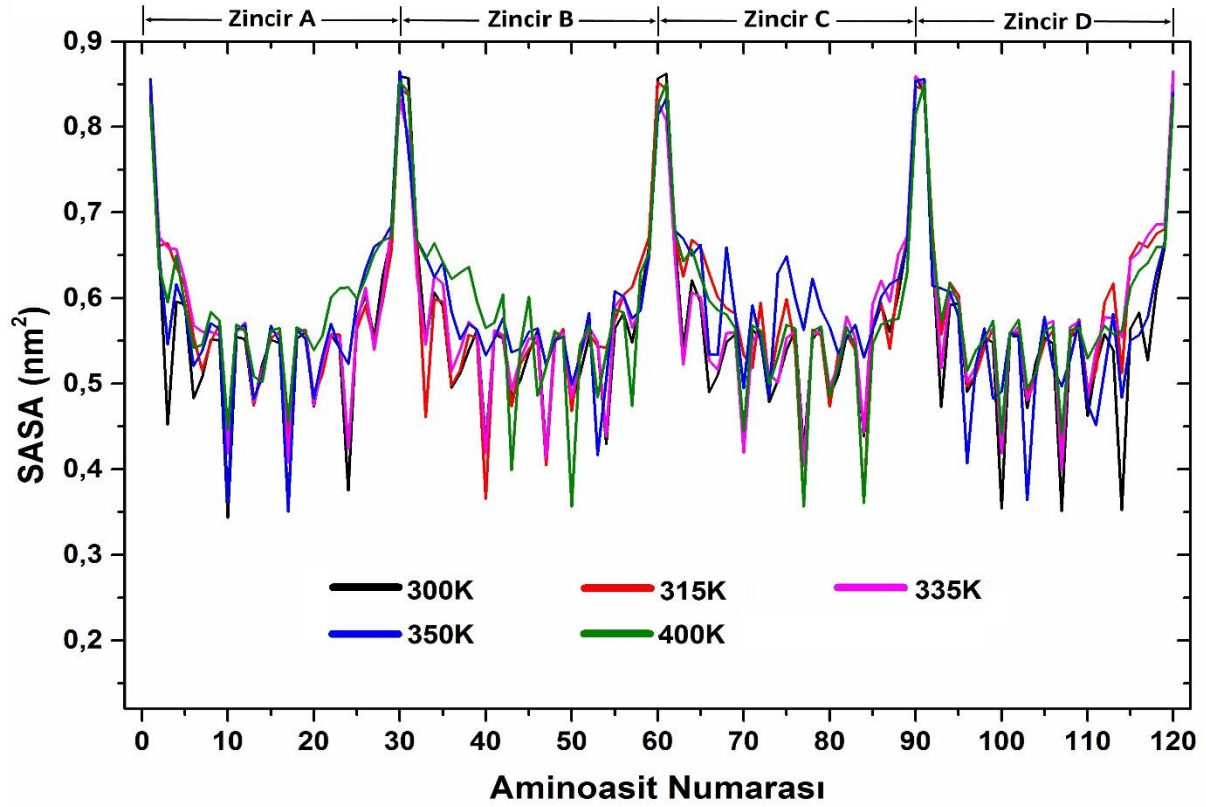
Uç bölgelerdeki RMSF değerlerinin sergilediği bu tutum, bu bölgelerdeki aminoasitlerin yüksek esnekliğe sahip olması yanında çözeltiliye daha fazla maruz kalmasıyla da açıklanabilir. Bu sebeple tetramerik HexCoil-Ala demetini oluşturan dört zincirdeki her bir aminoasidin çözeltiliye maruz kaldığı yüzey alanı ve dolayısıyla hidrofobitesi hakkında bize önemli bilgiler verebilen SASA değerleri belirlenerek bu değerler ilgilenilen sıcaklıklar için Şekil 5.26'da sunulmuştur. Şekildeki SASA sonuçları ile daha önce sunulan DSSP ve heliks kesri sonuçları genel eğilim olarak birbirini desteklemektedir. Bu eğilim, HexCoil-Ala'nın merkez bölgelerindeki aminoasitlerin uç bölgelere göre daha küçük dalgalanmalara sahip olması şeklinde olup, bu davranış literatürde yayınlanan raporlar ile uyumludur (Zheng et al. 2006).

Şekil 5.25 ve 5.26 birlikte değerlendirildiğinde RMSF ve SASA değerlerinin birbirini tamamlar nitelikte, oldukça iyi bir uyum sergilediği görülmektedir. Zincirlerin uç bölgelerinde görülen düşük RMSF ve yüksek SASA değerleri, daha önce de ifade etmeye çalıştığımız, zincirlerin uç bölgelerindeki bozulmalarının nedenin bu bölgedeki aminoasitlerin, merkez bölgedeki aminoasitlere göre daha fazla çözeltiliye maruz kaldığı yönündeki fikrimizi desteklemektedir. Şekil 5.26' da verilen grafiği daha detaylı incelediğimizde, tetramerik HexCoil-Ala demeti şeklindeki yapımızın her bir zincirindeki merkez bölgelerde bulunan aminoasitlerin SASA değerlerinde, RMSF sonuçlarındakilere göre bir miktar fazla dalgalanmalar mevcut olduğu

görülmektedir. Bunun yanında, merkez bölgelerdeki bu aminoasitlerden özellikle A3, A10, A17, A24 olarak kodlanan alanin aminoasitlerinin diğerlerine göre daha düşük SASA değerlerine sahip olduğu da görülmektedir. Bu düşük SASA değerlerinin, bahsedilen alanin aminoasitlerinin Ala-Coil ara yüzeyleri arasındaki bölgede bulunmalarından kaynaklandığı söylenebilir. Başka bir deyişle, bizim simülasyon sonuçlarımızda elde edilen Ala-Coil ara yüzeyi mesafelerinin, özellikle düşük sıcaklıklardaki doğal yapı ve literatürdeki diğer çalışmalara göre daha küçük olması, bu bölgelerdeki yüzey alanının daha da azalmasına dolayısıyla bu bölgede kalan atom çiftlerinin çözelti ile etkileşiminin de azalmasına neden olduğu söylenebilir. Ayrıca merkez bölgedeki E4, E8, E15, S5, Q11, Q12, Q18, Q22, Q26, Y9, R25 ve K16 olarak kodlanan polar aminoasitlerinin ise protein yüzeyinde bulunma eğilimlerinden dolayı çözelti ile etkileşiminin daha fazla olduğu ve bundan dolayı diğer merkez bölgedeki aminoasitlere göre daha yüksek SASA değerlerine sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 5.25 HexCoil-Ala'nın her bir aminoasitininin ilgilenilen sıcaklıklar için simülasyonlar boyunca RMSF değerlerinin ortama değişimleri.

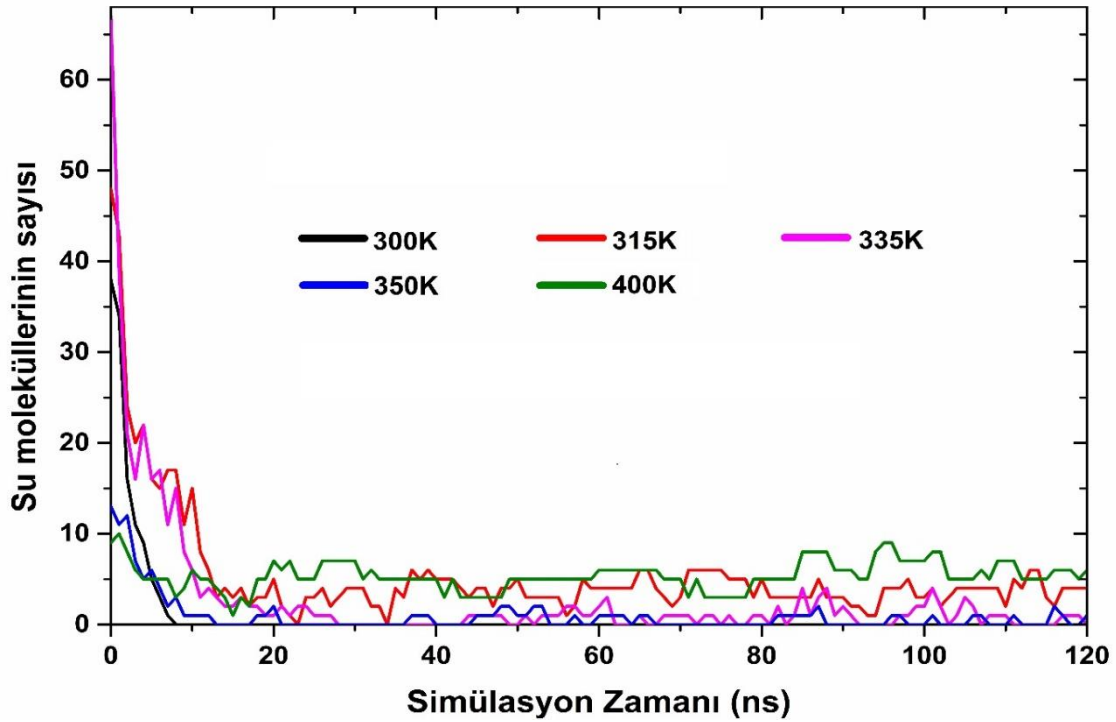


Şekil 5.26 HexCoil-Ala'nın her bir aminoasitininin ilgilenilen sıcaklıklar için simülasyonlar boyunca SASA değerlerinin ortama değişimleri.

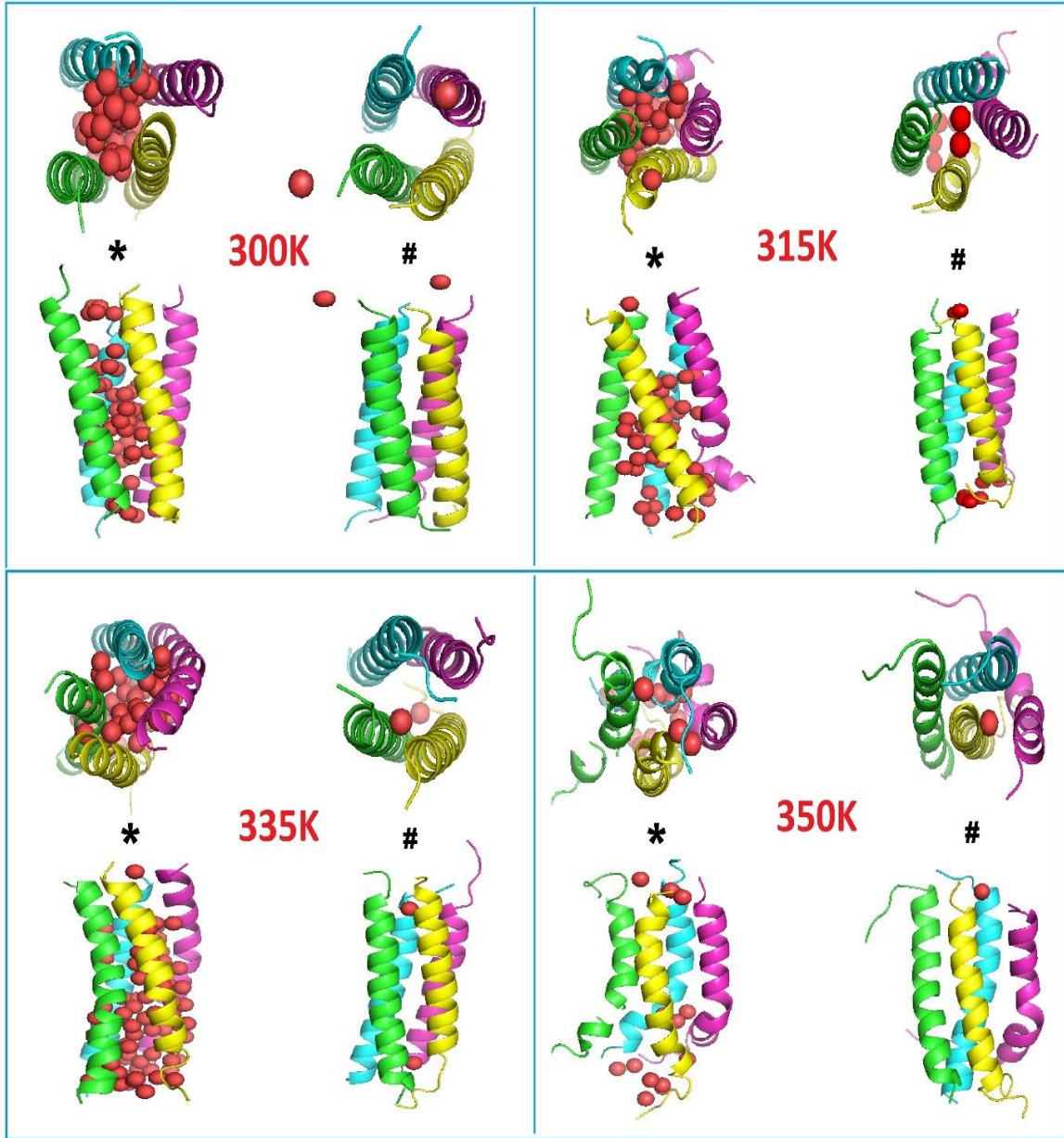
Bu çalışmada yapılan simülasyonlar anlatılırken, bölümün başlarında Şekil 5.2.b' de, incelediğimiz ve anti-paralel yerleştirilmiş dört adet HexCoil-Ala zincirinden oluşan demet yapısının yandan ve üstten görüşleri daha dikkatli incelendiğinde, bu tetramerik HexCoil-Ala zincir demetinin aslında bir kanala veya tüpe benzediği söylenebilir. Bu kanal benzeri yapının içinde kalan su moleküllerinin simülasyonlar boyunca davranışının incelenmesiyle, bu yapının bir su kanalı olup olamayacağı sorusuna en azından kaba bir cevap aranabilir. Bu amaçla 300, 315, 335, 350 ve 400 K sıcaklıkları için tetramerik HexCoil-Ala demet yapısının sadece içerisinde bulunan su moleküllerinin sayısı, her bir simülasyon zamanındaki anlık görüntülerden (120 adet snapshots) sayılarak elde edilmiş ve sonuçlar simülasyon zamanına bağlı olarak Şekil 5.27' de sergilenmiştir.

Farklı sıcaklıklar için elde edilen bu sonuçlara göre, simülasyonların başlangıcında kanal yapısı içerisinde ortalama olarak 30 ile 60 adet arasında su molekülü bulunmasına karşın, simülasyonların yaklaşık ilk 10 ns' e kadar olan kısmında bu sayı hızlı bir şekilde azalmakta ve

hatta ileriki simülasyon zamanlarında, kanaldaki su molekülleri neredeyse tamamen kanalı terk etmekte ve kanalın içerisinde sadece bir kaç su molekülü kalmamaktadır. İlgili anlık görüntülerden bu kalan su moleküllerinin de sadece kanalın uç bölgelerde olduğu tespit edilmiştir. 300, 315, 335 ve 350 K sıcaklıkları için kanal içindeki su moleküllerinin bu davranışı, simülasyonların başlangıcından ve herhangi bir anından alınmış anlık görüntülerle, yapının üstten ve yandan görünüşleri çizilerek Şekil 5.28’ de görselleştirilmiştir. 400 K sıcaklıkta daha önce de ifade edildiği gibi, dörtlü zincir demetinin bütünlüğü bozulmaya başladığından kanal benzeri yapı da ortadan kalkmıştır ve bu sebeple su moleküllerinin davranışı görselleştirilmemiştir. Anlık görüntüler kullanılarak elde edilen bu sonuçlar, RMSF ve SASA sonuçlarındaki uç bölgelerdeki gözlemlenen yüksek değerlerin sebebinin uç bölgedeki aminoasitlerin daha fazla su molekülleri ile temas halinde olması gerçeğini desteklemektedir. Diğer yandan ilgilendiğimiz yapının zamanla kanal içerisindeki su moleküllerini iterek dışarı çıkartması ve daha sonra içeriye su molekülü almaması, kanalın bir su kanalı görevi üstlenemeyeceğini işaret etmektedir. RMSF, SASA ve su molekülü sayısı analizleri birlikte değerlendirildiğinde, 400 K’ e kadar sıcaklığın iç bölgelerdeki aminoasitlerin konumlarını ve çözeltiye maruz kaldıkları yüzey alanlarını çok fazla etkilemediği sonucunun bir kez daha ortaya çıktığı görülmektedir.



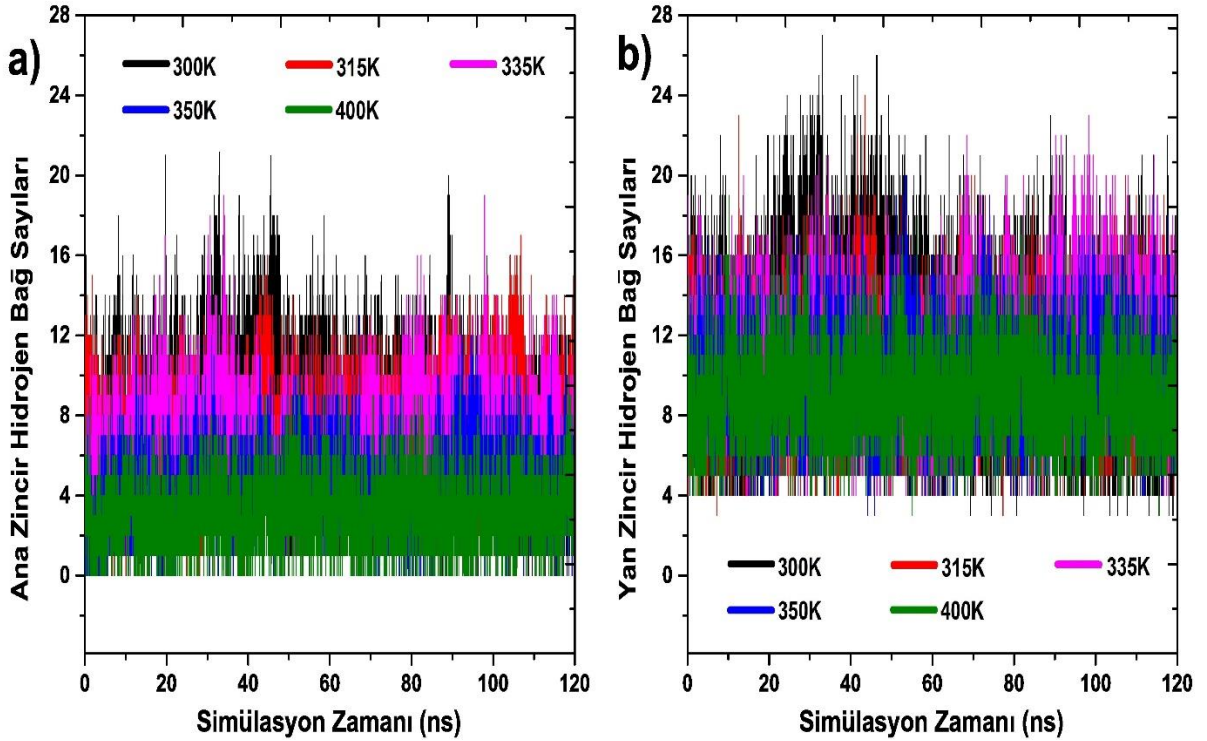
Şekil 5.27 HexCoil-Ala'nın tetramer formunun bazı sıcaklıklar için içerisindeki su moleküllerinin sayısının simülasyonlar boyunca değişimi.



Şekil 5.28 Tetramerin içindeki su moleküllerinin bazı sıcaklıklar için üstten ve yandan görsel temsilleri. Burada; * bahsi geçen sıcaklıklardaki simülasyon başlangıcından görüntü, # bahsi geçen sıcaklıklardaki simülasyonun herhangi bir anındaki görüntü.

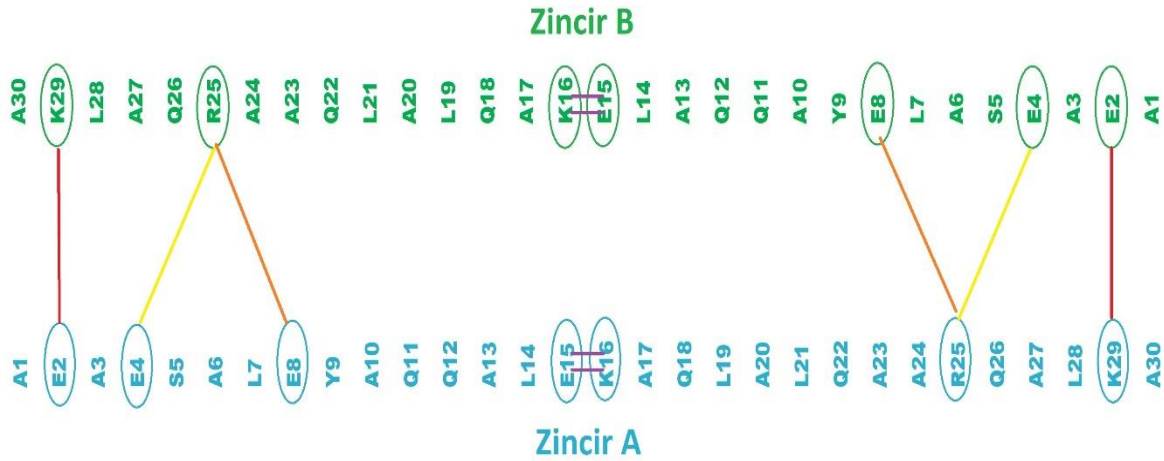
Tetramerik HexCoil-Ala demeti formunda gözlemlenen yüksek kararlılık sebebiyle, dört zincirli bu yapıda zincirleri bir arada tutan etkileşimler araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle yapıdaki hidrojen bağlarının sayısı incelenmiştir. Bilindiği gibi hidrojen bağları proteinle su molekülleri arasında kolayca oluşabilmektedir ancak bu bağlar zayıf olduklarından sıcaklıkla kolaylıkla kopabilmektedirler. Bunun için biz bu çalışmamızda, proteinin su molekülleri ile yaptığı ve zayıf kabul edilen hidrojen bağları ile değil de, sadece ana zincir atomlarının kendi aralarında ve yan zincir atomlarının kendi aralarında yaptığı hidrojen bağları ile ilgilenilmiştir.

İlgili sıcaklıklarda ana zincir ve yan zincirler için elde edilen hidrojen bağı sayıları simülasyon zamanına bağlı olarak Şekil 5.29 a-b' de gösterilmiştir. Bu bağ sayıları incelenirken, proteinin ana zincirindeki yani omurgasındaki atomların kendi aralarında yaptığı hidrojen bağlarının HexCoil-Ala omurgalarının kararlılığını artırdığı, HexCoil-Ala'nın yan zincirleri arasında oluşan hidrojen bağlarının ise sistemin dörtlü zincir bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Hidrojen bağ sayısının yapıldığı bu hesaplamalarda, literatüre uygun şekilde, alıcı ve verici atom arasındaki açı için kesim açısı (cut-off angle) 30.0° ve kesim mesafesi (cut-off distance) 0.35 nm olarak seçilmiştir ((Berhanu et al. 2012; 2013a; Berhanu et al. 2013b)). Şekil 5.29' dan görüleceği üzere, beklenildiği şekilde artan sıcaklıkla birlikte hidrojen bağ sayılarında azda olsa bir düşüş vardır. Ayrıca yan zincirlerin kendi aralarında yaptıkları hidrojen bağ sayıları ana zincirdeki atomların kendi aralarındaki hidrojen bağ sayısına göre fazladır. Bunun sebebi ise yan zincirlerdeki atomların daha fazla kontak halinde olmasıdır.



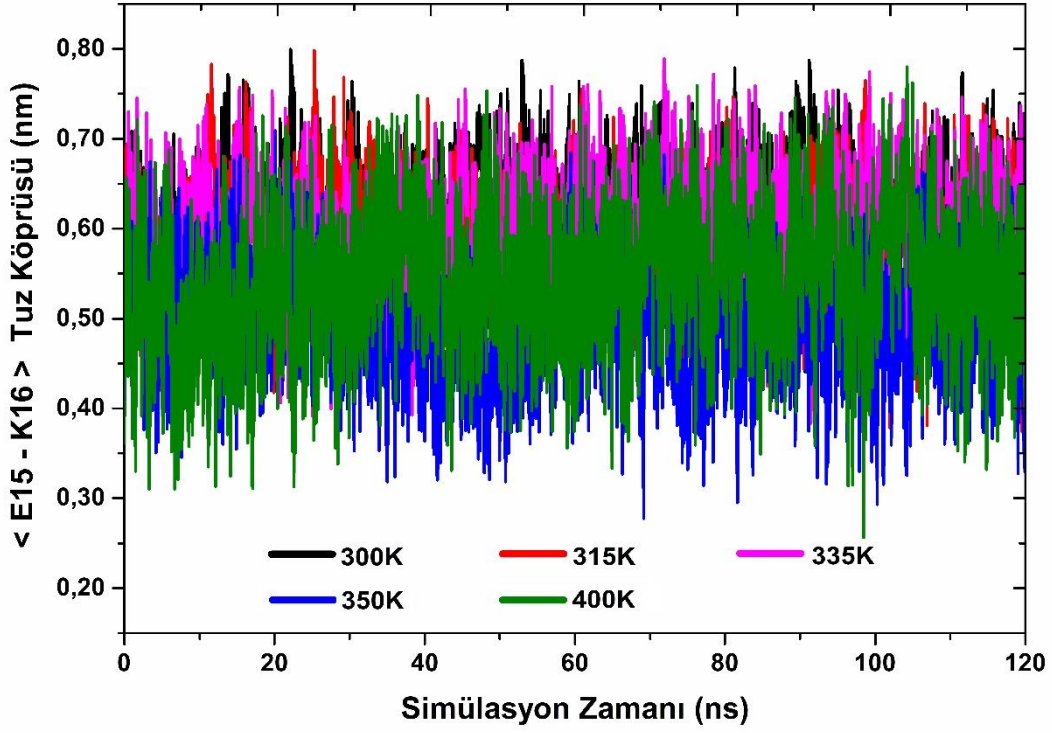
Şekil 5.29 Tetramerik HexCoil-Ala'nın a) Ana zincir atomlarının ve b) Yan zincir atomlarının kendi aralarında yaptığı hidrojen bağ sayısı.

Tetramerik HexCoil-Ala demetini 400 K sıcaklığa kadar bir arada tutan güçlü etkileşimleri daha detaylı inceleyebilmek için, aynı zamanda olası tuz köprüleri mesafeleri de hesaplanmıştır. Tuz köprüleri özellikle yüksek sıcaklığa dayanıklı yapılarda rastlanan önemli bir etkileşim türüdür. Bu etkileşim yapının hem konformasyonel hem de termal kararlılığı hakkında çok önemli bilgiler veren hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimin bir birleşimidir. Literatürde, 0.43 nm den daha küçük etkileşim mesafelerine “doğrudan tuz köprüleri” ve 0.43-0.70 nm aralığındaki etkileşim mesafelerine ise “dolaylı tuz köprüleri” denilmektedir (Dzubiella 2008). Bundan dolayı hesaplamalarımızda yalnızca bu etkileşim mesafelerini içerebilecek muhtemel tuz köprülerine odaklanılmıştır ve sonuç olarak, dört adet muhtemel tuz köprüsü etkileşimi belirlenmiştir. Bunlar, tetramerik HexCoil-Ala demetindeki her bir zincirin kendi omurgası içerisinde E15-K16 aminoasitleri arasında oluşan zincir-içi tuz köprüsü ve zincirler arasında E8-R25, E4-R25 ve E2-K29 aminoasitleri arasında meydana gelen zincirler-arası tuz köprüleridir. Örnek olması açısından, anti paralel olarak yerleştirilmiş A ve B diye adlandırılan HexCoil-Ala zincirleri arasında meydana gelen etkileşimler, temsili olarak Şekil 5.30’ da gösterilmiştir. Burada, her bir tuz köprüsü etkileşimi farklı renkte çizgiler ile ifade edilmiştir. Bu iki zincir arasındaki her bir tuz köprüsü etkileşiminden karşılıklı olarak 2 şer adet bulunduğundan hesaplamalarda tüm zincirler üzerinden ortalama alınmıştır.

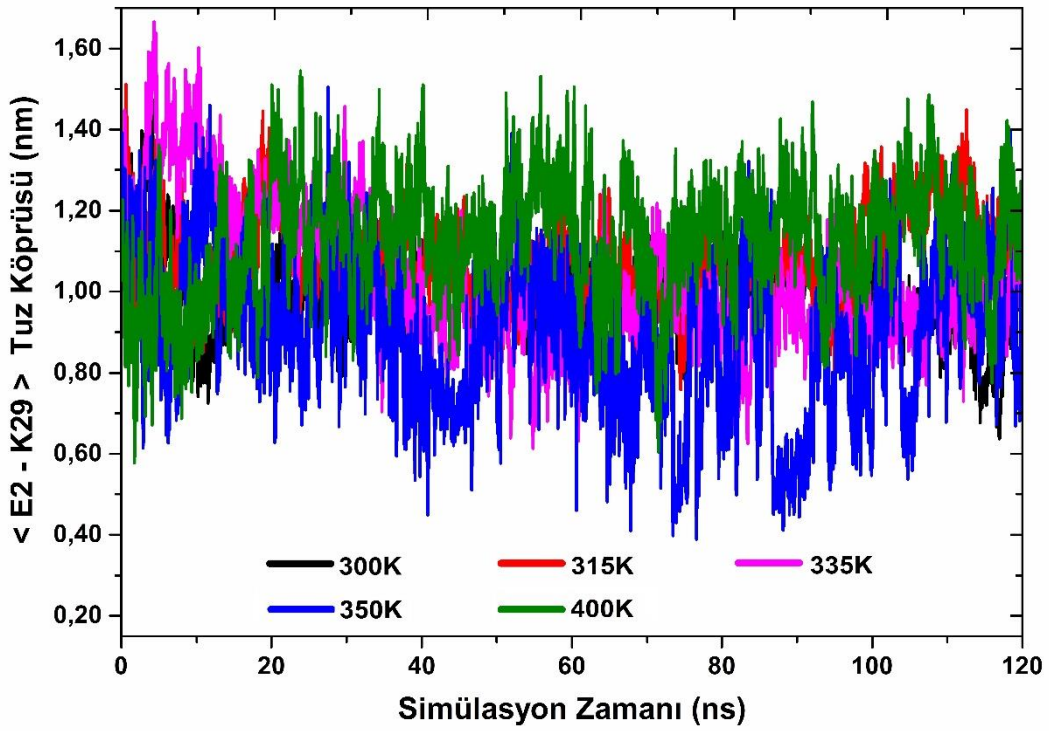


Şekil 5.30 Tetramerik HexCoil-Ala’ nın A ve B zincirleri arasındaki tuz köprüsü etkileşimlerinin görsel temsili.

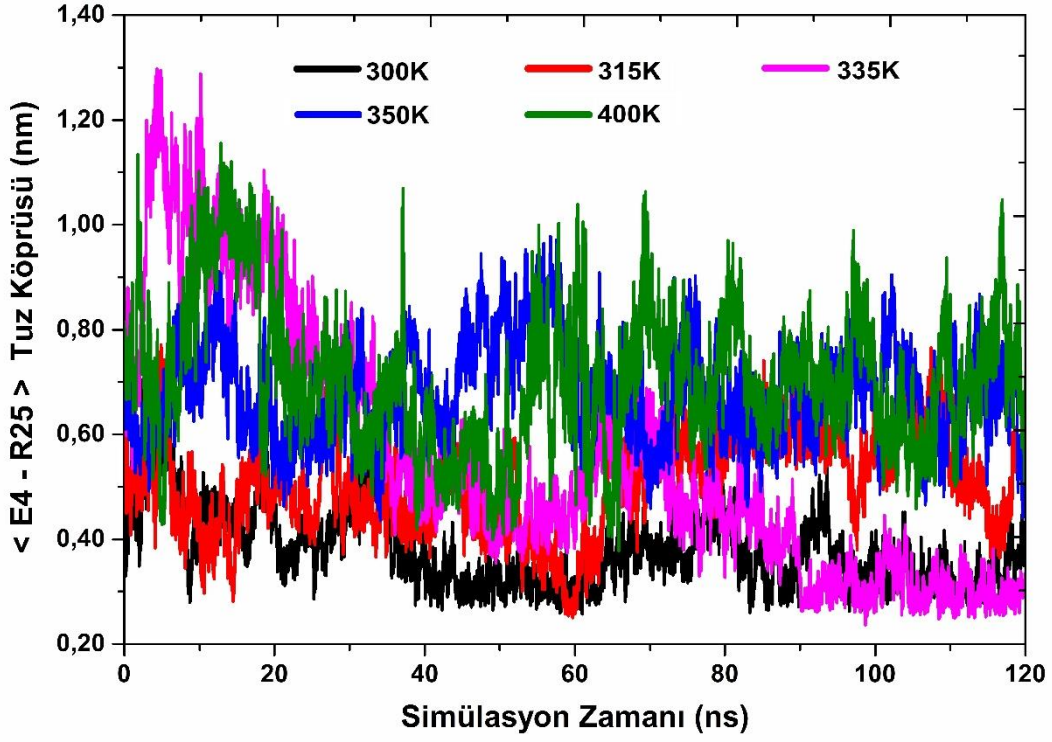
Bahsedilen tuz köprüleri için ilgili sıcaklıklarda hesaplanan etkileşim mesafelerinin, simülasyon zamanına bağlılığı Şekil 5.31-5.34' te verilmiştir. Beklen bir sonuç olarak, sıcaklık artışıyla tüm tuz köprülerinin sahip olduğu etkileşim mesafelerindeki dalgalanmaların da arttığı şekillerden açıkça görülmektedir. İlgilendiğimiz tetramerik demetin kristal yapısı için zincirler-arası tuz köprüleri etkileşim mesafeleri E4-R25 için 0.94 nm, E8-R25 için 1.24 nm, E2-K29 için 1.35 nm ve zincir-içi tuz köprüsü E15-K16 için 1.40 nm' dir. Bizim simülasyon sonuçlarımızda ise HexCoil-Ala'nın E15-K16 aminoasitleri arasında meydana gelen zincir-içi tuz köprüleri etkileşimindeki ortalama mesafeler 0.40-0.70 nm aralığında olup, bu mesafe bahsedilen etkileşimlerin dolaylı tuz köprüsü etkileşimi oluşturduğunu göstermektedir. HexCoil-Ala zincirlerinin merkez bölgelerinde meydana gelen bu zincir-içi etkileşim değerinin doğal konformasyondakine (kristal yapı) göre daha küçük olması, sulu ortamda dörtlü demet halinde bulunan her bir zincirin kristal yapıya göre çok daha kararlı bir omurgaya sahip olduğunu işaret etmektedir. Bu zincir-içi etkileşimin aynı zamanda zincirlerin merkez bölgelerinde bulunan aminoasitlerin ikincil yapılarının fazla bozulmamasının da nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, üç adet olan zincirler-arasındaki tuz köprüleri incelendiğinde ise bu etkileşimlerin genellikle Leu-Zipper ara yüzeylerinde meydana geldiği görülmüştür. Farklı iki HexCoil-Ala zincirindeki E4-R25 aminoasitleri arasında meydana gelen zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri 300 ve 315 K' de yaklaşık 0.40-0.70 nm aralığında olup, bu değerler etkileşimlerin “dolaylı tuz köprüsü” oluşturduğunu göstermektedir. 315 K üzerindeki sıcaklıklarda ise bu etkileşim mesafelerin arttığı gözlemlenmektedir. E8-R25 arasında oluşan zincirler-arası etkileşim mesafeleri de 315 K üzerindeki sıcaklıklar için “dolaylı tuz köprüsü” mesafesi içerisinde iken, 300 ve 315 K' de bu değer 0.25-0.35 nm aralığındadır. Bu düşük değerler, 300 ve 315 K sıcaklıklarında E8-R25 arasında kurulan bağın “doğrudan tuz köprüsü” ve dolayısıyla etkileşimin de en kuvvetli etkileşim olduğunu göstermektedir. Öte yandan en zayıf zincirler-arası etkileşim E2-K29 aminoasitleri arasında olup, bunlar için ortalama mesafeler 0.80-1.40 nm aralığında değişmektedir. Bu düşük bağ mesafelerinden ötürü, özellikle HexCoil-Ala zincirleri arasında kurulan tuz köprülerinin, dört zincirli yapıyı bir demet halinde tutan en önemli ve güçlü etkileşimler olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple yukarıda sergilemeye çalıştığımız tüm özelliklerin yanı sıra, kuvvetli tuz köprülerinin de, gelecekteki muhtemel kararlı çok zincirli protein tasarımlarında göz önünde bulundurulması gereken en önemli özellik olduğu açıktır.



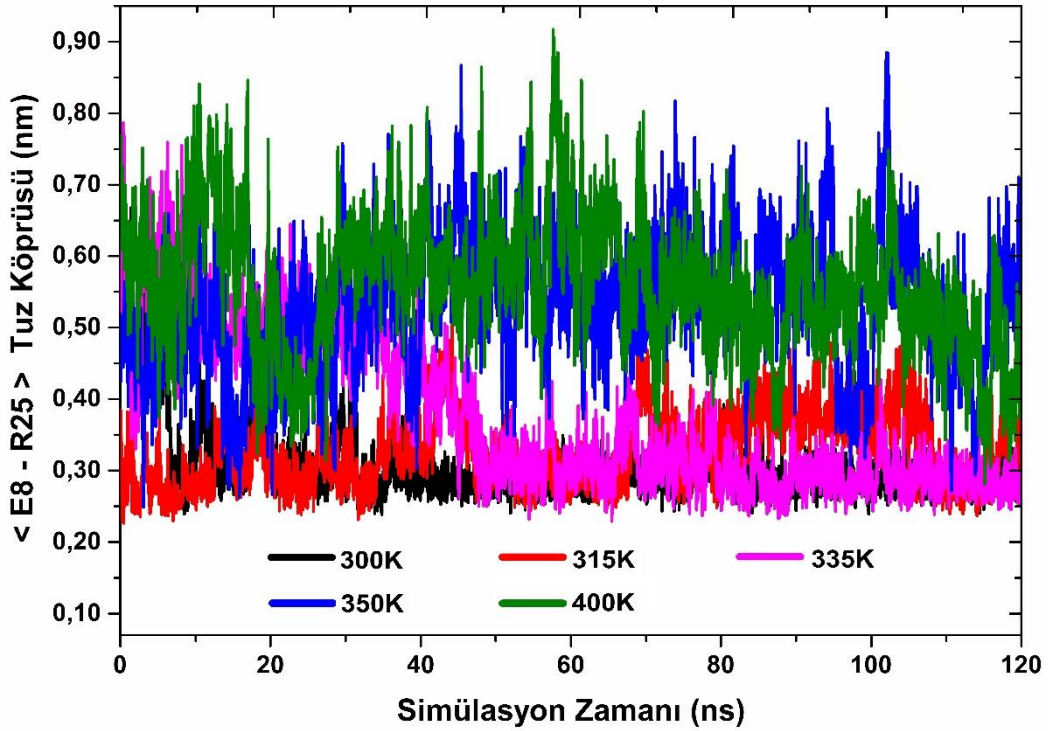
Şekil 5.31 E15-K16 aminoasitleri arasındaki ortalama zincir-içi tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.



Şekil 5.32 E2-K29 aminoasitleri arasındaki ortalama zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.



Şekil 5.33 E4-R25 aminoasitleri arasındaki ortalama zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.



Şekil 5.34 E8-R25 aminoasitleri arasındaki ortalama zincirler-arası tuz köprüsü etkileşim mesafeleri.

BÖLÜM 6

SONUÇ

Genetik bilimi, tıp, ilaç tasarımı ve endüstriyel alanlarda sahip olduğu önemli rollerden dolayı, proteinlerin yapı ve aktivitelerinin incelenmesi günümüzde oldukça ilgi çeken bir araştırma konusu olmuştur. Proteinlerin bu biyolojik fonksiyon ve aktiviteleri, her birinin kendine has özel konformasyonel yapılarına ve katlanma mekanizmalarına bağlıdır. Bundan dolayı proteinlerin kararlı üç boyutlu yapılarının ve termodinamik özelliklerinin anlaşılması özellikle sağlık ve ilaç endüstrisi alanlarında çok önemli gelişmeler sağlamaktadır.

Gelişen teknoloji ile birlikte endüstriyel alanlarda da artık bu biyolojik yapıların kullanılmaya başlanması, bu yapıların hesaplamalı tasarım yöntemleri kullanılarak tasarlanıp sentetik olarak üretilmesini gerektirmiştir. Hesaplamalı tasarım yöntemleri ile dizayn edilen bu biyolojik yapılar doğada rastlanmayacak fonksiyon ve özelliklerle donatılabilirler. Bu yapılar, doğal proteinlere göre özellikle daha iyi katlanmış ikincil yapılar, konformasyonel kararlılık ve topaklanma özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Ayrıca sentetik proteinlerin biyoteknoloji, nanometaryal ve ilaç tasarımı gibi önemli uygulama alanlarında kullanılabilmesi için yüksek termal ve kimyasal sağlamlığa sahip olmaları gerektiği bilinmektedir. Bu sebeplerden dolayı tasarlanan biyolojik yapılarının, bilim ve endüstriyel alanlarda kullanımında önce bu tür yapılarında termodinamik özelliklerinin incelenmesi çok önemlidir.

Proteinlerin kararlı üç boyutlu yapılarının ve termodinamik özelliklerinin belirlenmesinde ilk başvurulacak yöntem deneylerdir. Ancak bir proteinin dinamik davranışının incelenmesinde ya da katlanma mekanizmasının anlaşılmasında yeterli bilgi deneysel yöntemlerden elde edilemeyebilir. Ayrıca, sentezlenen herhangi bir peptid veya protein kristalleştirilemeyebilir ya da yaşam ömrü kısa olması nedeniyle deneysel yöntemleri kullanma imkânı olmayabilir. Deneysel olarak karşılaşılan bu gibi durumlarda bu türden sistemlerin anlaşılması için kuramsal

yöntemlere başvurulması kaçınılmaz olur. Ancak, çok sayıda serbestlik derecesine sahip bu tür sistemlerin kuramsal açıdan anlaşılması ve çözümlenmesi de oldukça zordur, hatta neredeyse imkânsızdır. Bir çok matematiksel yaklaşımlar yapılarak kuramsal açıdan bu amaca ulaşılacak istense de, en önemli bilgilerin gelişen bilgisayar teknolojisi ve yazılımları ile birlikte simülasyon çalışmalarından elde edilebildiği bilinmektedir.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda, bir “de novo” tasarım peptidi olan HexCoil-Ala’ nın anti-paralel olarak yerleştirilmiş tetramerik bir formunun konformasyonel karlılığına, sıcaklığın etkisi MD simülasyon tekniği kullanılarak test edilmiştir. 300, 315, 335, 350, 400 K ve 500 K olmak üzere altı farklı sıcaklık için yapılan bu simülasyonlar ile tetramerik sistemin yapısal ve termodinamik özellikleri ve bunları etkileyen faktörler sistematik olarak araştırılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle sistemin yapısal kararlılığı hakkında bilgi veren RMSD analizleri yapılmış ve hesaplamalar, tetramerik HexCoil-Ala demeti şeklindeki yapımızın, özellikle 400 K sıcaklığa kadar konformasyonel kararlılığa sahip olduğunu ancak bu sıcaklıktan sonra, özellikle 500 K’ de gözlenen yüksek RMSD değeri, yapının doğal konformasyonunu kaybettiğini göstermiştir. Doğal yapısı %90 heliks içeren bu tetramerik demetin her zincirindeki aminoasitlerin simülasyonlar boyunca sahip olduğu ikincil yapı tipleri ise DSSP analizi ve heliks kesri hesaplamaları ile takip edilmiş ve sonuçlar 400 K sıcaklığa kadar baskın heliks oranının korunduğunu ve bu sıcaklıktan sonra heliks yapı tiplerinin farklı diğer ikincil yapı tiplerine dönüştüğünü göstermiştir. Bir birini destekleyen bu üç analiz bir arada değerlendirildiğinde, genelde yüksek termal kararlılık gösteren yapımızda, sıcaklık artışıyla özellikle zincirlerin uç bölgelerindeki aminoasitlerin ikincil yapı değişimlerinin arttığı sonucuna varılmıştır.

Daha sonra ise, bir demet şeklinde olan tetramerik HexCoil-Ala sistemimizin kompaktlığı hakkında ayrıntılı bilgi edinebilmek amacıyla, çalışmamızda R_g , kontak sayıları ve zincirlerin uçtan uca uzunluk değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda 400 K sıcaklığa kadar sıcaklık artışıyla bu değerlerde önemli değişimlerin olmadığı, ancak bu sıcaklıktan sonra R_g değerlerinde artış, kontak sayılarında ve uçtan uca uzunluklarda ise anlamlı azalmalar olduğu gözlemlenmiştir. Buraya kadar elde edilen ortalama değerlerin bir arada sunulduğu Çizelge 5.3

ve yapının farklı sıcaklıklardaki baskın konformasyonel davranışını görsel olarak yansıtan Şekil 5.18' den de açıkça anlaşılacağı üzere, sistemimiz 400 K sıcaklığa kadar tetramerik demet formunu koruyabildiği, ancak bu sıcaklıktan sonra ikincil yapı tiplerinin de değişmesiyle birlikte sistemin kompaktlığının da azalarak tetramerik demet bütünlüğünün bozulduğu gözlemlenmiştir.

Özel sarılmış-sarmal yapısal motifine sahip olarak tasarlanmış HexCoil-Ala sistemimizin tetramerik demet bütünlüğü hakkında daha ayrıntılı bilgi edinebilmek amacıyla mevcut heliksel ara yüzey mesafeleri incelendiğinde, sistemimizin Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzeyleri olarak adlandırılan 2 çeşit ara yüzeye sahip olduğu ve Çizelge 5.4' ten Leu-Zipper ara yüzeyler için hesaplanan ortalama mesafe değerlerinin literatürdeki değerlere çok yakın, Ala-Coil ara yüzeyleri değerlerinin ise özellikle 300, 315 K ve 335 K sıcaklıklarda deneysel değerlerden bile küçük olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında tetramerik sistemimizdeki Leu-Zipper ara yüzeyleri arasında görülen güçlü etkileşimlerin, yapının bu ara yüzey bölgelerindeki kararlılığına 400 K' a kadar önemli derecede katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Ala-Coil ara yüzeyleri için ise 335 K' a kadar deneysel kristal yapıdan bile küçük çıkan değerler, bu bölgelerin bu sıcaklığa kadar literatürde verilen diğer teorik ve hatta deneysel yapılarınkinden bile daha kararlı olduğunu göstermiştir. Bilindiği gibi tayrosin gibi aromatik aminoasitler, karbon nanotüp yüzeyi ile temas etme eğilimindedirler. Çok zincirli HexCoil-Ala sistemlerindeki tayrosin aminoasitleri, nanotüpün karbon atomları ile etkileşime girmek için sistemdeki Ala-Coil ara yüzeyleri arasından bir penetrasyon hareketi yaparak bu yüzeyin kararlılığını bozmaya teşebbüs edebilmektedirler. Bu sebeple Ala-Coil ara yüzeyleri için literatürdekilerden daha küçük mesafe değerlerinin bulunmasının, ilgilendiğimiz sistemde karbon nanotüp bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Elde edilen bu bilgiler ışığında gelecekte karbon nanotüp varlığında yapılacak protein tasarımlarında, aromatik aminoasitlerin sergilediği bu özelliğin de dikkate alınmasının gerekliliği önemli bir sonuç olarak ortaya çıkmıştır. Tetramerik demetin bütünlüğü hakkında bilgi edinebilmek için yapılan ara yüzey mesafeleri ölçümleri yanında Leu-Zipper ve Ala-Coil ara yüzeyleri için heliksler arası ortalama mesafelerin reaksiyon koordinatı olarak kullanıldığı serbest enerji yüzeyleri de çizilmiş ve yukarıdakilere benzer sonuçlar bu analizlerden de görülmüştür.

Yukarıdaki analizler ışığında 400 K sıcaklığa kadar genel olarak konformasyonel kararlılığını ve tetramerik demet bütünlüğünü koruduğunu gözlemlediğimiz sistemimizde, farklı sıcaklıklardaki simülasyon zamanları boyunca zincirlerde ortaya çıkan bölgesel konformasyonel değişimleri inceleyebilmek ve bu değişimlerin sebeplerini araştırmak amacıyla ilk etapta RMSF analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde elde edilen bilgiler daha önce bahsedilen DSSP ve heliks kesri analiz sonuçlarını destekler nitelikte olup, sıcaklık artışıyla HexCoil-Ala zincirlerinde gözlenen doğal yapıdan sapmaların çoğunlukla zincirlerin uç bölgelerindeki aminoasitlerinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu durum uç bölgelerin diğer bölgelere göre daha esnek bir yapıya sahip olmasına ve bu bölgelerin daha fazla çözelti etkisine maruz kalmasına atfedilmiştir. Bu sebeple ikinci olarak, zincirlerdeki her bir aminoasidin çözeltiliye maruz kaldığı yüzey alanları SASA analizi yapılarak araştırılmış ve elde edilen sonuçların RMSF sonuçlarını desteklediği görülmüştür. Daha sonra demet halinde bulunan ve kanala benzeyen tetramerik yapımızın içinde kalan su moleküllerinin simülasyonlar boyunca davranışları anlık görüntülerle incelenmiş ve yapılan bu incelemede ilgilenilen sıcaklıklarda başlangıçta tetramerik sistemin içerisinde bulunan ortalama 30-60 adet su molekülünün, ilerleyen simülasyon zamanlarında hidrofobik etkileşimler nedeniyle kanal benzeri yapının dışına itildiği ve sonrasında zincirlerin uç bölgeleri hariç hiçbir su molekülünün yapı içinde kalmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, RMSF ve SASA analizlerinde uç bölgelerde gözlemlenen yüksek değerlerin sebebinin uç bölgedeki aminoasitlerin daha fazla su molekülleri ile temas halinde olması gerçeğini desteklemiştir.

Çalışmamızın son kısmında yapımızın konformasyonel kararlılığı ve tetramerik demet bütünlüğünün korunmasında önemli olduğunu düşündüğümüz etkileşimlerden biri olan hidrojen bağı etkileşimi araştırılmıştır. Yan zincirlerin kendi aralarında yaptığı hidrojen bağı sayılarının ana zincirlerin kendi atomları ile yaptığı bağı sayısından fazla olması yan zincir atomlarının birbirlerine daha yakın kontak halinde olmasından dolayı beklenen bir sonuç olmuştur. Diğer bir sonuçta yine beklenildiği gibi artan sıcaklıkla birlikte hidrojen bağı sayısındaki azalmadır. Yapımızın konformasyonel kararlılığı ve demet bütünlüğünün korunmasında önemli olduğu düşünülen diğer etkileşim ise sistemimizde zincir-içi ve zincirler-arası kurulan tuz köprüleridir. Yapılan analizlerde HexCoil-Ala zincirinin merkez bölgesindeki E15-K16 aminoasitleri arasında meydana gelen zincir-içi tuz köprülerinin monomer omurgasının kararlılığına önemli derecede katkıda bulunduğu ortaya konmuştur. HexCoil-Ala zincirleri arasında genellikle Leu-Zipper ara yüzeyinde oluşan 3 adet tuz köprüsü

incelendiğinde ise özellikle E8-R25 aminoasitleri arasında meydana gelen etkileşimin en kuvvetli tuz köprüsü etkileşimi olduğu görülmüştür. Literatürde de yüksek sıcaklığa dayanıklı biyolojik yapılarda bu türden tuz köprüsü ağına rastlandığından, tetramerik sistemimizde E8-R25, E2-K29 ve E4-R25 aminoasitleri arasında kurulan zincirler-arası tuz köprülerinin, Leu-Zipper ara yüzeylerinin kararlılığının dolayısıyla demet bütünlüğünün korunmasında başlıca etkileşimler olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç gelecekte tasarlanacak muhtemel yüksek termal kararlılığa sahip biyolojik yapı çalışmalarında aminoasit dizilimleri belirlenirken, özellikle tuz köprüsü etkileşimi yapabilecek aminoasitlerin seçiminin önemini ortaya koymuştur.

MD simülasyon yöntemi ile yaptığımız bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki diğer teorik ve deneysel sonuçlarla oldukça iyi bir uyum sergilemesi, bu tip yapıların araştırılmasında MD simülasyon tekniği kullanılmasının uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir. Deneysel yöntemlerle ortaya konması zor olan, literatürde HexCoil-Ala monomerlerinin çoğunlukla tetramerik yapı oluşturma eğilimde olduğu yönündeki raporlar, MD tekniğinin sunduğu avantajlar ile çalışmamızda nedenleri ile birlikte açıklanabilmiştir.

Çalışmamızın, bu haliyle ileride yapılacak olan protein tasarım çalışmalarına ve teorik diğer çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

Alder B and Wainwright T (1957) Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, 27 (5): 1208-1209.

Alred E J, Scheele E G, Berhanu W M and Hansmann U H (2014) Stability of Iowa mutant and wild type A β -peptide aggregates. *The Journal of Chemical Physics*, 141 (17): 175101.

Andersen H C (1980) Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *The Journal of Chemical Physics*, 72 (4): 2384-2393.

Anthonsen H W, Baptista A, Drabløs F, Martel P and Petersen S B (1994) The blind watchmaker and rational protein engineering. *Journal of Biotechnology*, 36 (3): 185-220.

Antikainen N M and Martin S F (2005) Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (8): 2701-2716.

Arnold F (1993) Engineering proteins for nonnatural environments. *The FASEB Journal*, 7 (9): 744-749.

Baysal C and Meirovitch H (1999) Free energy based populations of interconverting microstates of a cyclic peptide lead to the experimental NMR data. *Biopolymers*, 50 (3): 329-344.

Berendsen H, Grigera J and Straatsma T (1987) The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry*, 91 (24): 6269-6271.

Berendsen H J, Postma J P, van Gunsteren W F and Hermans J (1981) Interaction models for water in relation to protein hydration, *In Intermolecular forces*. B.Pullmann (Ed.), Springer, Dordrecht, 331-342.

Berendsen H J, Postma J v, van Gunsteren W F, DiNola A and Haak J (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81 (8): 3684-3690.

Berhanu W M, Alred E J and Hansmann U H (2015) Stability of Osaka Mutant and Wild-Type Fibril Models. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119 (41): 13063-13070.

Berhanu W M and Hansmann U H (2012) Side-chain hydrophobicity and the stability of A β 16–22 aggregates. *Protein Science*, 21 (12): 1837-1848.

Berhanu W M and Hansmann U H (2013a) The stability of cylindrin β -barrel amyloid oligomer models—A molecular dynamics study. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81 (9): 1542-1555.

- Berhanu W M, Yaşar F and Hansmann U H** (2013b) In silico cross seeding of a β and amylin fibril-like oligomers. *ACS Chemical Neuroscience*, 4 (11): 1488-1500.
- Bussi G, Donadio D and Parrinello M** (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126 (1): 014101.
- Chakrabartty A, Kortemme T and Baldwin R L** (1994) Helix propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides without helix-stabilizing side-chain interactions. *Protein Science*, 3 (5): 843-852.
- Coddington P D** (1994) Analysis of random number generators using Monte Carlo simulation. *International Journal of Modern Physics C*, 5 (03): 547-560.
- Cornell W D, Cieplak P, Bayly C I, Gould I R, Merz K M, Ferguson D M, Spellmeyer D C, Fox T, Caldwell J W and Kollman P A** (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117 (19): 5179-5197.
- Correia B E, Ban Y-E A, Holmes M A, Xu H, Ellingson K, Kraft Z, Carrico C, Boni E, Sather D N and Zenobia C** (2010) Computational design of epitope-scaffolds allows induction of antibodies specific for a poorly immunogenic HIV vaccine epitope. *Structure*, 18 (9): 1116-1126.
- Darden T, York D and Pedersen L** (1993) Particle mesh Ewald: An N · log (N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98 (12): 10089-10092.
- Daura X, Gademann K, Jaun B, Seebach D, van Gunsteren W F and Mark A E** (1999) Peptide folding: when simulation meets experiment. *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (1-2): 236-240.
- DeLano W L** (2002) The PyMOL molecular graphics system. <http://pymol.org>.
- Demir K, Alici H and Yaşar F** (2017) Conformational Stability of the Tetrameric De Novo Designed HexCoil-Ala Helical Bundle. *Chinese Journal of Physics*, 56 (1): 46-57.
- Dzubiella J** (2008) Salt-specific stability and denaturation of a short salt-bridge-forming α -helix. *Journal of the American Chemical Society*, 130 (42): 14000-14007.
- Eisenberg D and McLachlan A D** (1986) Solvation energy in protein folding and binding. *Nature*, 319 (6050): 199-203.
- Ercolessi F** (1997) A molecular dynamics primer, *Spring college in computational physics*, ICTP, Trieste, 19.
- Ewald P P** (1921) Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der Physik*, 369 (3): 253-287.
- Gibson J, Goland A N, Milgram M and Vineyard G** (1960) Dynamics of radiation damage. *Physical Review*, 120 (4): 1229.
- Golynskiy M V and Seelig B** (2010) De novo enzymes: From computational design to mRNA display. *Trends in Biotechnology*, 28 (7): 340-345.

Greenfield N J (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1 (6): 2876.

Grigoryan G, Kim Y H, Acharya R, Axelrod K, Jain R M, Willis L, Drndic M, Kikkawa J M and DeGrado W F (2011) Computational design of virus-like protein assemblies on carbon nanotube surfaces. *Science*, 332 (6033): 1071-1076.

Gupta M N (1992) Enzyme function in organic solvents. *The FEBS Journal*, 203 (1-2): 25-32.

Haile J (1992) *Molecular Dynamics Simulation*. 1st edition, ISBN: 0-471-81966-2, John Wiley and Sons, Chichester, 489.

Hansmann U H and Okamoto Y (1993) Prediction of peptide conformation by multicanonical algorithm: New approach to the multiple-minima problem. *Journal of Computational Chemistry*, 14 (11): 1333-1338.

Hao M-H and Scheraga H A (1994) Monte Carlo simulation of a first-order transition for protein folding. *The Journal of Physical Chemistry*, 98 (18): 4940-4948.

Hehre W J (1986). *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. 1st edition, ISBN: 978-0-471-81241-8, Wiley Interscience, New York, 576.

Hess B, Bekker H, Berendsen H J and Fraaije J G (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18 (12): 1463-1472.

Hockney R W (1970) Potential Calculation And Some Applications. *Methods Computational Physics*, 9: 135-211.

Hoover W G (1985) Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31 (3): 1695.

Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A and Simmerling C (2006) Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65 (3): 712-725.

Huang P-S, Boyken S E and Baker D (2016) The coming of age of de novo protein design. *Nature*, 537 (7620): 320.

Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, Impey R W and Klein M L (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79 (2): 926-935.

Jorgensen W L, Maxwell D S and Tirado-Rives J (1996) Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of The American Chemical Society*, 118 (45): 11225-11236.

Kabsch W and Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 (12): 2577-2637.

Kart H, Tomak M, Uludoğan M and Çağın T (2005) Thermodynamical and mechanical properties of Pd–Ag alloys. *Computational Materials Science*, 32 (1): 107-117.

Kaya H and Chan H S (2003) Solvation effects and driving forces for protein thermodynamic and kinetic cooperativity: how adequate is native-centric topological modeling? *Journal of Molecular Biology*, 326 (3): 911-931.

King N P, Sheffler W, Sawaya M R, Vollmar B S, Sumida J P, André I, Gonen T, Yeates T O and Baker D (2012) Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy. *Science*, 336 (6085): 1171-1174.

Kirkpatrick S, Gelatt C D and Vecchi M P (1983) Optimization by simulated annealing. *Science*, 220 (4598): 671-680.

Knuth D (1969) *The art of programming, vol. 2. Semi-numerical Algorithms*. 3rd edition, ISBN: 0-201-89684-2, Addison-Wesley Logman Publishing Co., Boston, 784

Kresge N, Simoni R D and Hill R L (2006) The thermodynamic hypothesis of protein folding: the work of Christian Anfinsen. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (14): e11-e11.

Kuhlman B, Dantas G, Ireton G C, Varani G, Stoddard B L and Baker D (2003) Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science*, 302 (5649): 1364-1368.

Landau D P and Binder K (2014). A guide to Monte Carlo simulations in statistical physics. (Cambridge university press).

Leaver-Fay A, Tyka M, Lewis S M, Lange O F, Thompson J, Jacak R, Kaufman K, Renfrew P D, Smith C A and Sheffler W (2011) ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods in Enzymology*, 487: 545.

Levy Y, Jortner J and Becker O M (2001) Solvent effects on the energy landscapes and folding kinetics of polyalanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (5): 2188-2193.

MacKerell A D, Brooks B, Brooks C L, Nilsson L, Roux B, Won Y and Karplus M (1998) CHARMM: the energy function and its parameterization. *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, John Wiley and Sons, Chichester, 1271-1277

MacKerell Jr A D, Bashford D, Bellott M, Dunbrack Jr R L, Evanseck J D, Field M J, Fischer S, Gao J, Guo H and Ha S (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102 (18): 3586-3616.

Mahoney M W and Jorgensen W L (2000) A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *The Journal of Chemical Physics*, 112 (20): 8910-8922.

McCammion J A, Gelin B R and Karplus M (1977) Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267 (5612): 585-590.

Meirovitch H and Meirovitch E (1997) Efficiency of monte carlo minimization procedures and their use in analysis of nmr data obtained from flexible peptides. *Journal of Computational Chemistry*, 18 (2): 240-253.

Metropolis N, Rosenbluth A W, Rosenbluth M N, Teller A H and Teller E (1953) Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21 (6): 1087-1092.

Miklos A E, Kluwe C, Der B S, Pai S, Sircar A, Hughes R A, Berrondo M, Xu J, Codrea V and Buckley P E (2012) Structure-based design of supercharged, highly thermoresistant antibodies. *Chemistry & Biology*, 19 (4): 449-455.

Negron C and Keating A E (2013) Multistate protein design using CLEVER and CLASSY. *Methods Enzymol*, 523: 171-190.

Nosé S (1984) A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81 (1): 511-519.

Onat T, Emerk K ve Sözmen E Y (2002) *İnsan Biyokimyası*. ISBN: 9799758624200, Palme yayıncılık, Ankara 666.

Ooi T, Oobatake M, Nemethy G and Scheraga H A (1987) Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (10): 3086-3090.

Parrinello M and Rahman A (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52 (12): 7182-7190.

Pauling L, Corey R B and Branson H R (1951) The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37 (4): 205-211.

Pauling L and Wilson E B (2012). *Introduction to quantum mechanics with applications to chemistry*, Reprint of the McGraw-Hill 1935 edition, ISBN: 978-0-486-64871-2, Courier Corporation, 496.

Pirogova E and Istivan T (2013) Toward development of novel peptide-based cancer therapeutics: computational design and experimental evaluation. *In Bioinformatics of Human Proteomics*, Springer, New York, 103-126.

Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts M R, Smith J C, Kasson P M and van der Spoel D (2013) GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29 (7): 845-854.

Rahman A (1964) Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Physical Review*, 136 (2A): A405.

Roxbury D, Zhang S-Q, Mittal J, DeGrado W F and Jagota A (2013) Structural Stability and Binding Strength of a Designed Peptide–Carbon Nanotube Hybrid. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117 (49): 26255-26261.

Ryckaert J-P, Ciccotti G and Berendsen H J (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23 (3): 327-341.

Scheeff E D and Fink J L (2005) Fundamentals of protein structure. *Structural Bioinformatics*: 15-39.

Schlick T (2010). *Molecular Modeling And Simulation: An Interdisciplinary Guide*. 2nd edition, ISBN: 978-1-4419-6350-5, Springer Science & Business Media, New York, 723.

Shannon R E R E (1975) *Systems simulation; the art and science*. Prantice-Hall, New York, 387

Shiba K (2004) MolCraft: a hierarchical approach to the synthesis of artificial proteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28 (4): 145-153.

Siegel J B, Zanghellini A, Lovick H M, Kiss G, Lambert A R, Clair J L S, Gallaher J L, Hilvert D, Gelb M H and Stoddard B L (2010) Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science*, 329 (5989): 309-313.

Sieradzan A K, Liwo A and Hansmann U H (2012) Folding and self-assembly of a small protein complex. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8 (9): 3416-3422.

Sievers S A, Karanicolas J, Chang H W, Zhao A, Jiang L, Zirafi O, Stevens J T, Münch J, Baker D and Eisenberg D (2011) Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature*, 475 (7354): 96-100.

Sippl M J, Nemethy G and Scheraga H A (1984) Intermolecular potentials from crystal data. 6. Determination of empirical potentials for OH... O= C hydrogen bonds from packing configurations. *The Journal of Physical Chemistry*, 88 (25): 6231-6233.

Smadbeck J, Peterson M B, Khoury G A, Taylor M S and Floudas C A (2013) Protein WISDOM: a workbench for in silico de novo design of biomolecules. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (77).

Son H S, Hong B H, Lee C-W, Yun S and Kim K S (2001) A new type of helix pattern in polyalanine peptide. *Journal of the American Chemical Society*, 123 (3): 514-515.

Thompson J and Dowsland K A (1995) General cooling schedules for a simulated annealing based timetabling system. *In International Conference on the Practice and Theory of Automated Timetabling*, Springer-Verlag, Edinburg, 345-363.

Ulmer K M (1983) Protein engineering. *Science*, 219 (4585): 666-671.

Van der Sloot A M, Kiel C, Serrano L and Stricher F (2009) Protein design in biological networks: from manipulating the input to modifying the output. *Protein Engineering, Design & Selection*, 22 (9): 537-542.

Van Gunsteren W F, Billeter S R, Eising A A, Hünenberger P H, Krüger P, Mark A E, Scott W R and Tironi I G (1996) *Biomolecular simulation: the {GROMOS96} manual and user guide*. Zurich, 1042

Verlet L (1967) Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review*, 159 (1): 98.

Whitford D (2005) Protein expression, purification and characterization. *Proteins: Structure and Function*, Wiley, Hoboken 325-326.

Wood C W, Bruning M, Ibarra A Á, Bartlett G J, Thomson A R, Sessions R B, Brady R L and Woolfson D N (2014) CCBUILDER: an interactive web-based tool for building, designing and assessing coiled-coil protein assemblies. *Bioinformatics*, 30 (21): 3029-3035.

Yaşar F, Sieradzan A K and Hansmann U H (2014) Folding and self-assembly of a small heterotetramer. *The Journal of Chemical Physics*, 140 (10): 03B613_611.

Zheng J, Ma B, Tsai C-J and Nussinov R (2006) Structural stability and dynamics of an amyloid-forming peptide GNNQQNY from the yeast prion sup-35. *Biophysical journal*, 91 (3): 824-833.





ÖZGEÇMİŞ

Hakan ALICI 1987' de Ankara' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladıktan sonra, 2004 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'ne girdi. 2008'de lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2010 yılında ZKÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak göreve başladı ve ZKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına girdi. 2012 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı'nda doktora programına başlamıştır.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Bülent Ecevit Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

Tel: (+90) 372 291 11 00 (1212)

E-posta: hakanalici@hotmail.com.tr