

**BAZI PEPTİD LİGANDLARININ MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**Nesrin KILIÇ**

**Bülent Ecevit Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Fizik Anabilim Dalında  
Doktora Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ZONGULDAK  
Temmuz 2012**

**KABUL:**

Nesrin KILIÇ tarafından hazırlanan “BAZI PEPTİD LİGANDLARININ MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir. 06/07/2012

Başkan : Prof. Dr. M. Halûk GÜVEN (BEÜ)



Üye : Prof. Dr. Fatih YAŞAR (HÜ)



Üye : Prof. Dr. Vildan ADAR (HÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Kadir DEMİR (BEÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Yunus Emre YANDI (BEÜ)

---

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../.../2012



Prof. Dr. Özden ÖZEL GÜVEN  
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.”*

  
Nesrin KILIÇ

## ÖZET

**Doktora Tezi**

### **BAZI PEPTİD LİGANDLARININ MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**Nesrin KILIÇ**

**Bülent Ecevit Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Fizik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Kadir DEMİR**

**Temmuz 2012, 159 sayfa**

Proteinlerin ikincil yapılarının yanı sıra katlanma dinamikleri ve mekaniğini anlama, bilim dünyasında önemli problemlerden biri olmayı sürdürmektedir. Bilgisayar simülasyonları da bu problemi anlamada mikroskobik zaman ve uzunluk boyutuyla laboratuvarın makroskobik dünyası arasında bir köprü gibi davranırlar. Moleküler Dinamik (MD) ise karmaşık makromoleküler sistemlerin dinamiği ve yapısına ışık tutmak için güçlü bir araçtır. Diğer taraftan, özellikle düşük sıcaklıklarda standart MD simülasyonlar ile çözünmüş peptid ya da proteinlerin konformasyon uzayını tam anlamıyla taramasını engelleyen yerel minimumlardan birine takılıp kalması söz konusudur. Bu problemin üstesinden gelmek için önerilen çözümlerden uygulaması en kolay ve zaman maliyeti en düşük olan “Replica Exchange Molecular Dynamics (REMD)” simülasyon yöntemidir. Bu yöntemde, birçok farklı sıcaklıklardaki simülasyonlar birbirinden etkilenmeyecek biçimde paralel olarak çalıştırılır ve konfigürasyonlar arasında periyodik olarak değiş tokuş girişiminde bulunulur.

## ÖZET (devam ediyor)

Bu tez çalışmasında, Staphylococcal enterotoxin B'ye (SEB) bağlanma afinitesi gösteren ve deneysel olarak sentezlenmiş üç farklı peptidin ve bunların tekrarlı dizilimlerinin sulu ortam içindeki konformasyonel durumları hem MD hem de REMD simülasyonları tarafından örneklenmiştir. Simülasyonlar süresince peptidlerin sahip olduğu üç boyutlu konformasyonlarının ikincil yapı değişimleri zamanın fonksiyonu olarak elde edilmiştir. Bunun yanında “Principal Component Analysis (PCA)” yöntemiyle, peptidlerinin ikincil yapılarının sıcaklıkla nasıl değiştiğini anlamak amacıyla her peptidin serbest enerji yüzeyleri (Free Energy Landscape, (FEL) ) belirlenmiştir. REMD analiz sonuçlarından ise tüm peptidler için hidrofobik, hidrofilik çözeltili erişim yüzey alanları (SASA) ve yaptıkları hidrojen bağ sayıları hesaplanmıştır.

MD ve REMD simülasyonlarından elde edilen bu bilgiler, peptid dizilimlerinin ağırlıklı ikincil yapılarının rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü formlarında olduğunu ve simülasyonun başlangıç yapısı ve sıcaklıkla bu ikincil yapıların değiştiğini ortaya koymuştur. Bunun yanında peptidlerin hidrofobik segmentlerinin kıvrılma ve beta dönüşü formlarını alma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bulunan sonuçlar literatürdeki deneysel sonuçlarla karşılaştırılmış ve uyum içinde oldukları gözlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** MD, REMD, ikincil yapılar, peptid ligand, PCA, serbest enerji yüzeyi

**Bilim Kodu:** 404.04.01

## **ABSTRACT**

**Ph.D. Thesis**

# **INVESTIGATION OF SOME PEPTIDE LIGANDS BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION METHODS**

**Nesrin KILIÇ**

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

**Thesis Advisor: Assist. Prof. Kadir DEMİR**

**July 2012, 159 pages**

Understanding the dynamics and mechanism of protein folding as well secondary structure continues to be the central problems in bioscience. Computer simulations act as a bridge between microscopic length and time scales and the macroscopic world of the laboratory. Molecular dynamics simulations represent a powerful tool to gain insight into the structure and dynamics of complex macromolecular systems. On the otherhand, with standard MD simulations at low temperatures, an explicitly solvated protein or peptide generally becomes trapped in any of many local energy minima, prohibiting a representative sampling of the entire range of conformations. Of a few suggested solutions, REMD is least time-consuming, easiest to implement, and theoretically sound. In this method, a number of simulations are performed at different temperatures in parallel, and exchanges of configurations are tried periodically.

## **ABSTRACT (continued)**

In this thesis, the conformational states of three different peptide sequences that bind to Staphylococcal enterotoxin B (SEB) and of their repeating sequences were sampled by Molecular Dynamics (MD) and Replica-exchange molecular dynamic simulations (REMD) in explicit water. During simulations, changes in the secondary structure having peptides have been obtained. We have also obtained the free-energy landscapes (FEL) of each peptide by principal component analysis, to understand how the secondary structural properties change according to temperature. From the analysis of REMD results, we also calculated hydrophobic and hydrophilic solvent accessible surface areas (SASA) and the number of hydrogen bonds for all peptides.

The information obtained MD and REMD simulations exhibit that the peptide sequences have mostly random coil, bend and turn structures and these structures change with temperature and the initial conditions of simulations. Additionally, it has been observed that the hydrophobic segments of the peptides tend to form bend or turn structures. The results obtained were compared with the experimental results in the literature and it has been seen these results are consistent with each other.

**Key Words:** MD, REMD, secondary structures, peptide ligand, PCA, free energy landscape

**Science Code:** 404.04.01

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca gösterdiği her türlü destek, öneri ve yardımları ve sağladığı motivasyondan dolayı tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Kadir DEMİR' e (BEÜ) sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezde kullanılan bilgisayar yazılımlarının temini, çalıştırılmasındaki teknik desteği ve çalışma süresince yapıcı önerileri, gösterdiği ilgi ve hoşgörüsünden dolayı tez izleme komitesi ve jüri üyelerinden Prof. Dr. Fatih YAŞAR' a (HÜ) çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında gösterdiği yapıcı ve yönlendirici önerileri için tez izleme komitesi ve jüri üyelerinden Rektör Yardımcısı Prof. Dr. M. Halûk GÜVEN' e (BEÜ) çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme ve yine gösterdikleri hoşgörü ve destekleri için fizik bölümü araştırma görevlisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasına “2009-13-03-03” nolu proje kapsamında maddi destekte bulunan Bülent Ecevit Üniversitesi' ne ve “901.602.003” nolu proje kapsamında alınmış yüksek işlemci sayısına sahip bilgisayarların tarafımızca kullanımını sağlayan Hacettepe Üniversitesi' 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 BİYOMOLEKÜLLER.....	5
2.1 GİRİŞ .....	5
2.2 AMİNOASİTLER VE PROTEİNLER .....	5
2.3 PROTEİNLERİN YAPI VE İŞLEVLERİ .....	8
2.3.1 Protein Yapıları.....	9
2.3.2 Protein Yapılarına Hidrojen Bağ Etkisi .....	11
2.4 PROTEİN YAPILARININ BELİRLENMESİ .....	14
2.5 BİYOSENSÖRLER .....	15
BÖLÜM 3 MOLEKÜLER MODELLEME VE KUVVET ALANLARI .....	19
3.1 GİRİŞ .....	19
BÖLÜM 4 SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ .....	27
4.1 GİRİŞ .....	27

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.2 MONTE CARLO (MC) SİMÜLASYON YÖNTEMİ.....	27
4.3 MOLEKÜLER DİNAMİK (MD) SİMÜLASYON YÖNTEMİ.....	29
4.3.1 Enerji Minimizasyonu.....	29
4.3.2 Moleküler Dinamik.....	32
4.3.3 İntegrasyon Algoritmaları.....	33
4.3.4 Topluluklar.....	35
4.3.5 Moleküler Dinamikte Sınırlar.....	37
4.3.6 Sınırlandırma Dinamiği.....	39
4.3.7 Benzetilmiş Tavlama (Simulated Annealing).....	41
4.3.8 Moleküler Dinamikte Sıcaklık-Basınç Kontrolü.....	41
4.3.8.1 Hız Ölçeklendirmesi Metodu.....	42
4.3.8.2 Berendsen Sıcaklık Çiftlenimi.....	42
4.3.8.3 Genişletilmiş Sistem Metodu.....	43
4.3.8.4 Parinello-Rahman Basınç Çiftlenimi.....	44
BÖLÜM 5 KOPYA DEĞİŞ TOKUŞ MOLEKÜLER DİNAMİK METOT (REMD).....	47
BÖLÜM 6 SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI.....	53
6.1 GİRİŞ.....	53
6.2 TEKLİ PEPTİD DİZİLİMLERİNİN MD SİMÜLASYONLARI.....	54
6.2.1 Metot.....	54
6.2.2 Simülasyon Detayları.....	55
6.2.3 Sonuç ve Analizler.....	57
6.3 TEKLİ PEPTİD DİZİLİMLERİNİN REMD SİMÜLASYONLARI.....	67
6.3.1 Metot.....	67
6.3.2 Simülasyon Detayları.....	67
6.3.3 Sonuç ve Analizler.....	68
6.3.3.1 İkincil Yapı Analizi.....	70
6.3.3.2 Hidrojen Bağları ve Çözücü Erişim Yüzey Alanları (SASA).....	85
6.3.3.3 Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA).....	88

## İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
6.3.3.4 Serbest Enerji Yüzeyleri .....	93
6.4 TEKRARLI PEPTİD DİZİLİMLERİNİN MD SİMÜLASYONLARI .....	96
6.4.1 Metot.....	97
6.4.2 Sonuç ve Analizler.....	97
6.4.2.1 İkincil Yapı Analizleri .....	97
6.4.2.2 Temel Bileşen Analizi .....	123
6.5 TEKRARLI PEPTİD DİZİLİMLERİNİN REMD SİMÜLASYONLARI .....	129
6.5.1 Metot.....	129
6.5.2 Sonuç ve Analizler.....	130
6.5.2.1 İkincil Yapı Analizi .....	131
6.5.2.2 Hidrojen Bağı ve Çözelti Erişim Yüzey Alanları (SASA) .....	141
6.5.3.3 Temel Bileşen Analizi (PCA).....	144
BÖLÜM 7 SONUÇ.....	149
KAYNAKLAR.....	155
ÖZGEÇMİŞ .....	159



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	Aminoasitlerin genel yapısı. ....	6
2.2	İki aminoasit molekülünün bir peptid bağı ile birleşmesi.....	8
2.3	Protein yapıları.....	10
2.4	Hidrojen bağları ile alfa heliks yapının oluşumu.....	12
2.5	Hidrojen bağları ile $\beta$ -yaprağı yapısının oluşumu .....	13
3.1	Lennard-Jones Potansiyeli. ....	23
3.2	Literatürdeki bazı su modellerinin şematik gösterimleri. ....	25
4.1	Periyodik Sınır Şartları. ....	38
6.1	PeptidI için zamana göre ikincil yapı değişimi.....	58
6.2	PeptidII için zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	59
6.3	PeptidIII için zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	60
6.4	PeptidI için zamana bağlı kare ortalama karekök yer değiştirme. ....	63
6.5	PeptidII için zamana bağlı kare ortalama karekök yer değiştirme.....	63
6.6	PeptidIII için zamana bağlı kare ortalama karekök yer değiştirme. ....	64
6.7	PeptidI için molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı.....	65
6.8	PeptidII için molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı. ....	66
6.9	PeptidIII için molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı.....	66
6.10	PeptidI için a. Her bir kopya için potansiyel enerji histogramı b. Sıcaklık İndeksi. ....	69
6.11	PeptidII için a. Her bir kopya için potansiyel enerji histogramı b. Sıcaklık İndeksi. ....	69
6.12	PeptidIII için a. Her bir kopya için potansiyel enerji histogramı b. Sıcaklık İndeksi. ....	69
6.13	PeptidI için 280 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	72
6.14	PeptidI için 300 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	73
6.15	PeptidI için 319 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	74
6.16	PeptidI için 501 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	75
6.17	PeptidII için 280 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	76
6.18	PeptidII için 300 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	77
6.19	PeptidII için 319 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	78
6.20	PeptidII için 501 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi. ....	79
6.21	PeptidIII için 280 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
6.22 PeptidIII için 300 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.....	81
6.23 PeptidIII için 319 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.....	82
6.24 PeptidIII için 501 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.....	83
6.25 Her üç peptid için hidrofobik SASA.....	86
6.26 Her üç peptid için hidrofilik SASA. ....	86
6.27 Her üç peptid için toplam SASA. ....	87
6.28 Her üç peptid için moleküller arası hidrojen bağ yapma olasılığı. ....	87
6.29 PeptidI için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları. ....	90
6.30 PeptidII için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları. ....	91
6.31 PeptidIII için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları. ....	92
6.32 PC1 ve sıcaklığa göre serbest enerji yüzeyleri a) PeptidI b) PeptidII ve c) PeptidIII. ...	93
6.33 Farklı sıcaklıklarda PC1' e göre iki boyutlu serbest enerji yüzeyleri a) PeptidI b) PeptidII ve c) PeptidIII. ....	94
6.34 PeptidIIM2 için S1 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	98
6.35 PeptidIIM2 için S2 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	99
6.36 PeptidIIM2 için S3 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	100
6.37 PeptidIIM2 için S4 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	101
6.38 PeptidIIM2 için S5 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	102
6.39 PeptidIIM2 için S6 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	103
6.40 PeptidIIM2 için S7 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	104
6.41 PeptidIIM2 için S8 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	105
6.42 PeptidIIM3 için S1 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	106
6.43 PeptidIIM3 için S2 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	107
6.44 PeptidIIM3 için S3 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	108
6.45 PeptidIIM3 için S4 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	109
6.46 PeptidIIM3 için S5 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	110
6.47 PeptidIIM3 için S6 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	111
6.48 PeptidIIM3 için S7 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	112
6.49 PeptidIIM3 için S8 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.....	113
6.50 PeptidIIIM2 için S1 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	114
6.51 PeptidIIIM2 için S2 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	115
6.52 PeptidIIIM2 için S3 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	116

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
6.53 PeptidIIM2 için S4 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	117
6.54 PeptidIIM2 için S5 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	118
6.55 PeptidIIM2 için S6 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	119
6.56 PeptidIIM2 için S7 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	120
6.57 PeptidIIM2 için S8 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi. ....	121
6.58 PeptidIIM2 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları. ....	126
6.59 PeptidIIM3 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları. ....	127
6.60 PeptidIIM2 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları. ....	128
6.61 a) PeptidIIM2 b) Peptid IIM3 için potansiyel enerji histogramları. ....	130
6.62 PeptidIIM2 için 280 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	132
6.63 PeptidIIM2 için 300 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	133
6.64 PeptidIIM2 için 319 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	134
6.65 PeptidIIM2 için 518 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	135
6.66 PeptidIIM3 için 280 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	136
6.67 PeptidIIM3 için 300 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	137
6.68 PeptidIIM3 için 319 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	138
6.69 PeptidIIM3 için 511 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi. ....	139
6.70 a. PeptidIIM2 b. PeptidIIM3 için tüm kopya sıcaklıklarının molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı. ....	142
6.71 PeptidIIM2 için a. hidrofobik SASA b. hidrofilik SASA c. toplam SASA d. moleküller arası ortalama hidrojen bağ sayısı. ....	143
6.72 PeptidIIM3 için a. hidrofobik SASA b. hidrofilik SASA c. toplam SASA d. moleküller arası ortalama hidrojen bağ sayısı. ....	145
6.73 PeptidIIM2 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımı. ....	145
6.74 PeptidIIM3 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımı. ....	146





## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Aminoasitlerin standart kodları.....	7
3.1 Çeşitli su modellerinin karşılaştırılması.....	25
6.1 Peptidlerin ikincil yapı yüzdeleri. ....	64
6.2 Peptidlerin 280 K, 300 K ve 501 K sıcaklıktaki ikincil yapı yüzdeleri. ....	84
6.3 Her üç peptid için yerel minimumlara ait ortalama yapı popülasyonları. ....	95
6.4 Tekrarlı peptid dizilimlerinin S1-S8 simülasyonları sonucu elde edilen ikincil yapıların ortalaması. ....	123
6.5 PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 için 4 farklı sıcaklıktaki ikincil yapı yüzdeleri. ....	141



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### KISALTMALAR

MC	: Monte Carlo
MD	: Moleküler Dinamik
MM	: Moleküler Mekanik
REMD	: Replica Exchange Molecular Dynamics
RMSD	: Root Mean Square Displacement
FEL	: Free Energy Landscape
SEB	: Staphylococcal enterotoxin B
PCA	: Principal Component Analysis
PC1	: Principal Component 1
PC2	: Principal Component 2



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Moleküler Modelleme, model oluşturma ve hesaplama aracılığıyla moleküler yapı ve fonksiyon çalışma bilimi ve sanatıdır. ‘Oxford English’ sözlüğe göre model, hesaplamaları ve tahminleri kolaylaştırmak için tasarlanan bir sistem ya da sürecin basitleştirilmiş ya da idealize edilmiş tanımı olarak tanımlanır (Leach 2001).

Özellikle bilgisayarla moleküler sistemlerin modellenmesi, çeşitli disiplinlerden bilim adamlarının artarak devam eden ilgisine sahiptir. Özellikle protein, nükleik asit ve lipitler gibi büyük biyolojik polimerlerin modellenmesi tam birçok disiplinler arası girişim gerektirir.

Proteinler, aminoasitlerin zincir halinde birbirine bağlanmasından oluşan biyopolimerlerdir. Proteinlerin katlanarak aldığı üç boyutlu konformasyonları ise onların işlevleri hakkında önemli bilgiler verirler. Bu sebeple ikincil ve daha üst yapıların çeşitli yöntemlerle belirlenmesi tıpta ilaç dizaynı için önemli bir katkı sağlayacağı gibi endüstriyel kullanımı en yaygın olan polimerlerden, biyosensörlere, gıda güvenliği ve teknolojisine kadar geniş bir alanda değerlendirme olanağı sağlamaktadır.

Bir proteinin termodinamik özellikleri ile kararlı yapılarının belirlenmesinde deneysel yöntemler önemli bir yer tutar. Özellikle 3 boyutlu yapılarının belirlenmesinde X-ışınları, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi değişik spektral yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber, herhangi bir peptid veya proteinin dinamik davranışı ya da meydana gelen katlanma olayının anlaşılmasında yeterli bilgi deneysel yöntemlerden elde edilemeyebilir. Ya da, sentezlenen herhangi bir peptid veya proteinin yaşam ömrü kısa olması durumunda deneysel yöntemleri kullanma imkânı olmayabilir. Bu gibi durumlarda sistemin anlaşılması için kuramsal yöntemlere başvurulması kaçınılmaz olur. Protein yapılarının oldukça yüksek esnekliğe sahip olması, anormal sayıda mümkün konformasyonlara neden olmaktadır. Çok sayıda serbestlik derecesine sahip bu tür sistemlerin kuramsal açıdan

anlaşılması 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 nedendir ki son otuz yıldır proteinlerin düşük enerjili konformasyonları simülasyon teknikleri ile örneklenmeye çalışılmaktadır (Meirovitch and Meirovitch 1997, Baysal and Meirovitch 1997).

Biyomoleküllerin dinamik simülasyonları bugün 3 temel uygulama alanına sahiptir. Birinci olarak, Moleküler Dinamik (MD) simülasyonlar farklı zaman skalalarında çözücünde biyomoleküllerin doğal dinamikleri ile ilgili fikir sahibi olmak için kullanılabilirler. Diğer yandan, ergodik hipoteze göre, bir zaman periyodu içinde bulunduğu ortamla birlikte tek bir molekül simüle edilebilir ve zaman ortalaması alınarak deneysel olarak ölçülebilen topluluk ortalamalarına yaklaşan moleküler özellikler elde edilebilir. Bundan dolayı ikinci olarak, moleküler özelliklerin termal ortalamaları bu simülasyonlarla elde edilebilir. Son olarak, MD yöntemi ile bir molekülün ya da kompleksin termal olarak ulaşılabilen konformasyonları belirlenebilir. Bu teknik örneğin ligand-docking uygulamalarındaki gibi konformasyon uzayını belirlemek için kullanılabilir.

İlk MD simülasyonlar katı küre potansiyeli gibi çok basit potansiyeller kullanılarak yapılmıştır. Bu potansiyelde parçacıkların davranışı bir bilardo topunun davranışına benzer ve parçacıklar çarpışmalar arasında sabit bir hızla doğrusal hareket ederler. Çarpışmalar, mükemmel elastiktir ve bir çift küre arasındaki uzaklık onların yarıçapları toplamı olduğunda meydana gelirler. Bir çarpışmadan sonra çarpışan kürelerin yeni hızları, lineer momentum korunum prensibi kullanılarak hesaplanabilirler. Katı küre modeli, pek çok faydalı sonuç sağlamış olmasına rağmen, atomik ya da moleküler sistemleri simüle etmek için gerçekçi bir model değildir. Lennard-Jones gibi potansiyellerde, iki atom ya da molekül arasındaki kuvvet uzaklıkla sürekli olarak değişmektedir. Daha gerçekçi potansiyellerin doğası, hareket denklemlerinin çok kısa zaman adımlarına bölünerek hesaplanmasını gerektirir (Leach 2001) .

Bir simülasyon için temel nokta fiziksel sistem için bir model oluşturmaktır. Moleküler Dinamik için bu, atomların belli konfigürasyon diziliminde sistemin potansiyel enerjisini temsil edebilecek bir potansiyel enerji fonksiyonu (force field) seçimine karşılık gelir. Protein veya peptid dizilimlerinin hem termodinamik yapıları hem de katlanma özelliklerini çalışmak için literatürde oluşturulmuş birçok kuvvet alanı bulunmaktadır. Bunların en çok bilinenleri

AMBER (Cornell et al. 1995), CHARMM (MacKerrell et al. 1998), GROMOS (van Gunsteren et al. 1996) ve ECEPP (Sippl et al. 1984) potansiyel enerji fonksiyonlarıdır.

Protein katlanma (folding) simülasyonlarında, düşük sıcaklıkta, simülasyonlar çok sayıda yerel minimum enerji durumlarından birine takılma eğilimi gösterdiğinden, klasik simülasyon metotlarıyla tam bir kanonik dağılım elde etmek zordur. Bu çoklu-minimumlar (multiple-minima) problemini çözenin bir yolu, non-Boltzmann olasılık ağırlık çarpanlarına dayalı simülasyonlar yapmaktır. Böylece enerji uzayında rastgele bir yürüyüş (random walk) gerçekleştirilebilir. Rastgele yürüyüşler, simülasyonun herhangi bir enerji bariyerini geçmesine izin verir ve böylece klasik metotlardan çok daha geniş bir faz uzayı örneklenebilir. Bu tip metotlardan biri olan “Multikanonik Algoritma” enerji uzayında 1 boyutlu rastgele yürüyüş sağlarken, bir diğer metot olan “Simulated Tempering” ise sıcaklık uzayında 1 boyutlu rastgele yürüyüş sağlar. Bu tip ağırlık çarpanlarından dolayı enerji uzayında rastgele yürüyüş sağlayabilen metotlara genel olarak “Genelleştirilmiş Topluluk Algoritmaları” denir (Sugita and Okamoto 1999).

Genelleştirilmiş topluluk metotları güçlü olmasına karşın, Multikanonik ve Simulated Tempering metotta olasılık ağırlık çarpanları önceden bilinemediğinden kısa ön simülasyonlar ile belirlenmek zorundadırlar. Bu sebeple süreç çok zordur ve can sıkıcı olabilir. Bunların üstesinden gelen genelleştirilmiş topluluk algoritmasına dayalı başka bir metot ise “Replica Exchange” metottur. Bu metotta ağırlık çarpanı zaten bilinmelidir ve belirlenmesinde hiçbir sıkıntı yoktur.

Replica Exchange Molecular Dynamics (REMD) metotta, farklı sıcaklıklardaki kopyalar (replica) birbirinden bağımsız bir biçimde simüle edilmektedir (Copps et al 2008). Simülasyon sürecinde belli zaman aralıklarında komşu sıcaklıklara ait simülasyonların yörünge koordinatları ya rastgele ya da sıcaklık ve iki sistemin anlık potansiyel enerjilerinin fonksiyonu olan bir olasılık denkleminin bağlı olarak değiş tokuş edilir ya da edilmez. Kopyaların değiş tokuşu bir yerel minimuma takılıp kalabilecek olan sistemin, bu minimumdan kaçabilmeye yetecek enerjiye ulaşmasına olanak sağlamaktadır.

REMD simülasyonlarla peptid hareketine atomik boyutta bir bakış ve serbest enerji yüzeyinin bir temsili elde edilebilir. Simülasyonlardan serbest enerji yüzeyini elde etmek için bir reaksiyon koordinat setine ihtiyaç vardır. Bu setle farklı konformasyonel alt setleri ayırabilme



olanağı sağlanır. Reaksiyon koordinatları “Temel Bileşen Analizi” yöntemi (Principle Component Analysis, PCA) ile elde edilebilir. PCA, yaygın olarak protein dinamiğini incelemek için kullanılan bir metottur ve birkaç temel bileşen vasıtasıyla konformasyonel örnekleme hakkında bilgi sağlayan bir araçtır. Bu metodu kullanarak MD yörüngeleri az sayıda değişkenle açıklanabilir (Papaleo 2009).

Bu tez çalışmasında “Staphylococcal enterotoxin B (SEB)” toksinine yüksek afinite gösteren üç peptid diziliminin ve bu peptid dizilimlerinin ikili ve üçlü tekrarlanmasıyla oluşturulmuş yeni peptid dizilimlerinin termodinamik özellikleri ile doğal konformasyonlarının MD ve REMD simülasyon yöntemleriyle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tezin ikinci bölümünde, biyomoleküller başlığı altında proteinlerin yapı ve işlevleri hakkında genel bilgiler verilerek biyosensör kavramı anlatılmıştır. Üçüncü bölümde ise, moleküler modelleme kavramı, 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 bahsedilmiş ve bu simülasyon tekniklerinin birbirlerine göre farklılıkları ortaya konulmuştur. Ayrıca, bu bölümde MD tekniğinin temellerini oluşturan istatistik fizikteki küme kavramları, küme ortalaması, moleküler dinamikte sınır koşulları, kullanılan algoritmalar, sıcaklık ve basınç kontrol yöntemleri gibi konular anlatılmıştır. Beşinci bölümde, tez çalışması kapsamında kullanılan REMD simülasyon metodunun ayrıntıları ve formalizmi verilmiştir. İncelenen peptid dizilimlerinin tekli formlarının MD ve REMD simülasyon çalışmaları ile birlikte aynı peptidlerin uçuca eklenmesiyle elde edilmiş ikili ve üçlü tekrarlı formlarının MD ve REMD simülasyon sonuçları ise altıncı bölümde verilmiştir. Son bölümde, elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş, REMD ve MD simülasyon teknikleri arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur. Ayrıca peptid dizilimlerinin ikincil yapı eğilimlerinin ligand bağlanma afinitesine etkisi ve afiniteyi artırmak için önerilen tekrarlı dizilimlerin bunu ne şekilde etkilediği yorumlanmıştır.

## BÖLÜM 2

### BİYOMOLEKÜLLER

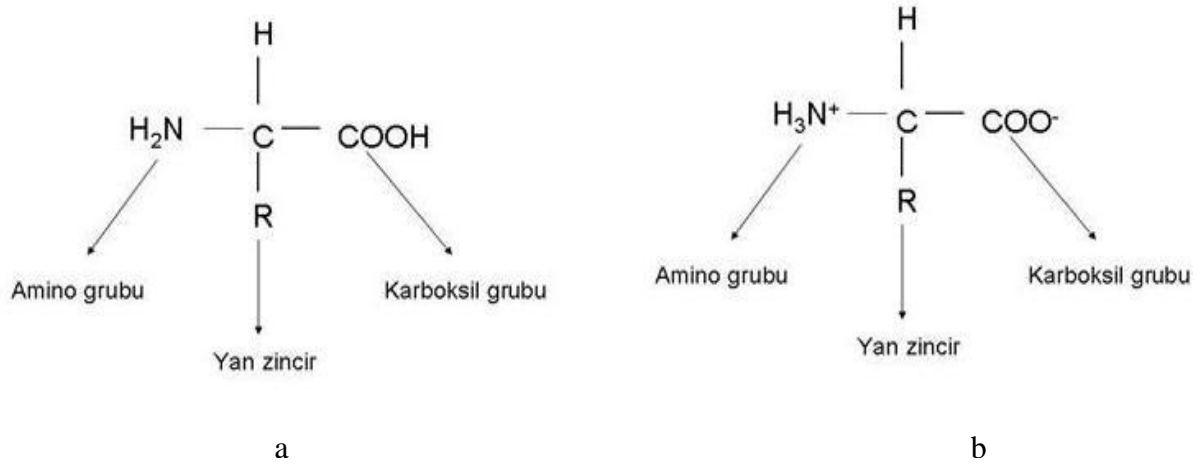
#### 2.1 GİRİŞ

Dört temel biyolojik makromolekülden üçü polimer yapıdadır. Polimerler, aynı türden ve bağıl olarak küçük olan moleküllerin ardışık diziliminden oluşurlar. Biyomoleküllerden proteinler aminoasitlerin, nükleik asitler (DNA ve RNA) nükleotidlerin, polisakkaritler ise şekerlerin polimerleridir. Dördüncü tür biyolojik makromolekül olan lipitler ise polimer yapıda değildirler. Nükleik asitler informasyonel moleküllerdir, canlının yapı ve işlevleri ile ilgili temel bilgiyi nükleotidlerin dizilimine kodlanmış olarak taşırlar. Lipitler, hücre zarlarının ana iskeletini oluştururlar. Proteinler, diğer makromoleküllere benzer biçimde, canlı organizmaların temel bileşenlerindedir ve hücrelerin içindeki her süreçte yer alırlar.

#### 2.2 AMİNOASİTLER VE PROTEİNLER

Proteinlerin yapı taşları olan aminoasitler,  $\alpha$ -karbonu ( $C_{\alpha}$ ) olarak adlandırılan merkezi karbon atomuna bağlı bir karboksil grubu [COOH] ile bir amino grubu [NH<sub>2</sub>] içerirler. Genel şeması Şekil 2.1' de görülen aminoasitlerin yapılarında bulunan ve rezidü (R) adı verilen molekül grubunun farklılığına göre doğada 20 çeşit aminoasit vardır ve bu aminoasitler isimlerini sahip olduğu rezidülerden alırlar. Literatürde tüm aminoasit isimleri Çizelge 2.1' de sunulan 3-harfli veya 1-harfli standart kodlamalar şeklinde gösterilmektedirler.

Aminoasitler ortamın pH değerine göre pozitif veya negatif bir yüke sahip olabilirler. Net yükleri, pH' ının izoelektrik nokta (pI) olarak adlandırılan kritik bir değerinde sıfırdır. Ancak sulu ortamda izoelektrik noktada bile hem amino grubu hem de karboksil grubu iyonlaşmış olarak bulunur. Sulu ortamdaki dipolar iyon veya zwitterion olarak adlandırılan bu durumu nedeni ile bir aminoasidi Şekil 2.1b' deki gibi göstermek daha uygun olmaktadır (Pehlivan 1997).



Şekil 2.1 Aminoasitlerin genel yapısı.

Yan zincirdeki farklılıklar, proteine kendine özgü oldukça değişik yapılar ve aktiviteler kazandırır. Tüm aminoasitler yan zincirleri bir arada düşünüldüğünde, artı veya eksi yükünden hidrofobiye kadar oldukça fazla çeşitli yapısal özellikler gösterirler. Yan zincirlerinin karakteristiklerine bağlı olarak aminoasitler, apolar, polar yüksüz, polar asidik ve polar bazik aminoasitler şeklinde gruplandırılabilirler.

Apolar aminoasitler, yan zincirlerinde hidrofobik özellik gösteren radikal grup bulundururlar. Hidrojen bağları yapamayan aminoasitlerdir. Yan zincirlerinde, genellikle oksijen veya azot yoktur. Öncelikli olarak bir proteindeki özel bir boşluğa hangi aminoasidin en iyi şekilde uyabileceğini belirleyen büyüklük ve şekillerine göre ayrılırlar. Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler sayesinde bir arada tutunurlar. Glisin, Alanin, Valin, Lösin, İzolösin, Fenilalanin, Triptofan, Metiyonin ve Prolin apolar aminoasitler grubundadır.

Polar yüksüz aminoasitler, nötral ortamda tamamen yüksüzdürler. Bu gruptaki aminoasitlerin yan zincirleri zayıf asit ve bazlardır. Fizyolojik ortamda ise yine tamamen yüklü değildir, ancak kısmi artı (+) ve eksi (-) yükler içerirler. Bu sebeple, su dahil olmak üzere diğer moleküllerle hidrojen bağı yapabilirler. Genelde oldukça reaktif olan bu grupta Serin, Treonin, Asparagin, Sistein, Glutamin ve Prolin gibi aminoasitler yer almaktadırlar.

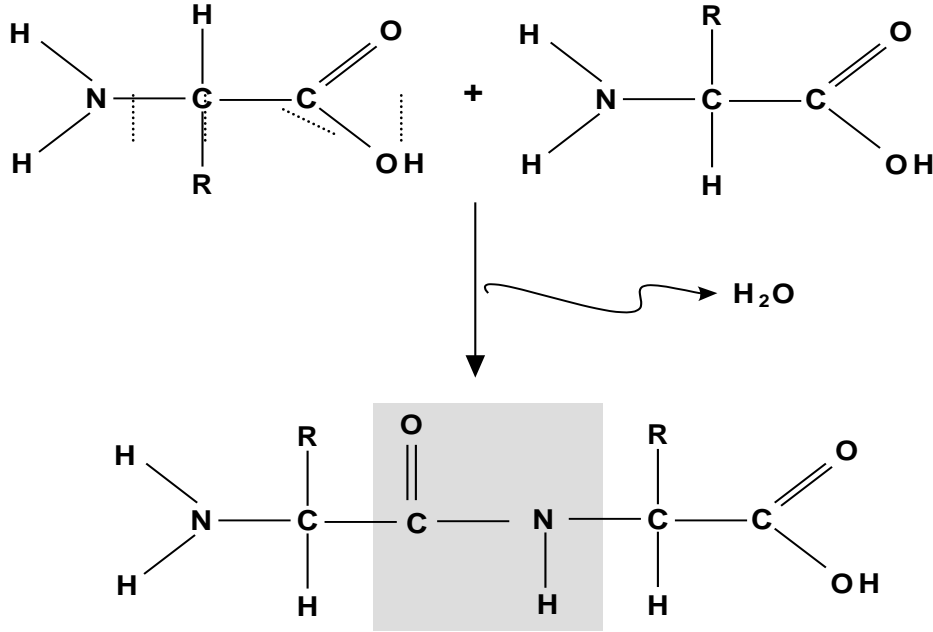
Çizelge 2.1 Aminoasitlerin standart kodları.

AMİNOASİT	KISALTMA		AMİNOASİT	KISALTMA	
Glisin	Gly	G	Treonin	Thr	T
Alanin	Ala	A	Sistein	Cys	C
Valin	Val	V	Metiyonin	Met	M
Lösin	Leu	L	Asparajin	Asn	N
İzolosin	Ile	I	Glutamin	Gln	Q
Prolin	Pro	P	Aspartat	Asp	D
Fenialanin	Phe	F	Glutomat	Glu	E
Tirozin	Tyr	Y	Lizin	Lys	K
Triptofan	Trp	W	Arjinin	Arg	R
Serin	Ser	S	Histidin	His	H

Polar asidik aminoasitler, fizyolojik ortamda negatif yüklüdürler ve asidik özellik gösterirler. Aspartik asit ve Glutamik asit aminositleri bunlara örnektir. Diğer yandan polar bazik aminoasitlerin yan zincirlerinde proton alıcı moleküller bulunduğundan, fizyolojik ortamda pozitif yüklüdürler ve bazik özellik gösterirler. Lizin, Arginin ve Histidin aminoasitleri ise bu grup içinde yer alırlar.

Peptidler aminoasitlerin birbirleriyle peptid bağları adı verilen kovalent bağlarla birleşmeleri sonucu oluşurlar (Şekil 2.2). Peptid bağı bir aminoasidin karboksil grubu ile ikinci bir aminoasidin amino grubu arasından bir H<sub>2</sub>O molekülünün açığa çıkması sonunda meydana gelir. Peptid bağı, çift kovalent bağ özelliklerini taşır. Bu özellikler C-N bağının ekseni boyunca dönüş yeteneğini büyük ölçüde kısıtlar ve bağı oluşturan öğelerin bir düzlem üzerinde yer alması ile sonuçlanır. Ancak diğer birimlerde C-C ve C-N bağları etrafında dönmeler olanaklıdır ve bu dönmeler proteinin üç boyutlu yapısında önemli rol oynamaktadırlar. Böyle peptid bağları ile ardışık sıralanmış bir aminoasit dizisinin oluşturduğu polipeptid zincirinin bir ucunda serbest bir amino grubu (-NH<sub>2</sub>) ve diğer ucunda serbest bir karboksil grubu (-COOH) bulunur. Serbest amino grubunun bulunduğu uca

proteinin amino (N-terminal) ve serbest karboksil grubunun bulunduğu uca da karboksil (C-terminal) ucu adı verilir.



Şekil 2.2 İki aminoasit molekülünün bir peptid bağı ile birleşmesi ( Oğuz 2011).

### 2.3 PROTEİNLERİN YAPI VE İŞLEVLERİ

Geçen yüzyılın sonunda Berzellius tarafından belirlenmiş olan adlarının (birinci) da vurguladığı gibi proteinler, makromoleküller arasında çok öncelikli bir konuma sahiptir. Proteinlerin bazıları hücrenin oluşumunda sadece bir yapıtaşı olarak işlev görürken (yapısal proteinler) bazı proteinler ise özgün üç boyutlu yapıları sayesinde molekülleri tanıma, onlarla etkileşerek hücredeki olaylara yön verme etkinliğine sahiptir. Bu ikinci sınıfa giren (etkin ya da aktif) proteinlerin ortak özelliği, ligand adı verilen kendilerine özgü maddeleri bağlama yetenekleridir. Bağladıkları ligandın özelliklerine göre, bu proteinler de Enzimler, İmmünproteinler, protein hormonlar, düzenleyici proteinler, taşıyıcı proteinler ve kontraktıl proteinler gibi çeşitli gruplara ayrılabilirler.

**Enzimler:** Proteinlerin en iyi bilinen rolü kimyasal tepkimelerin katalizleyicisi olarak enzim görevleridir. Enzimler genelde bir veya birkaç tepkimeyi hızlandıran çok özgül

katalizörlerdir. Enzimler metabolizma ve katabolizma ile ilgili çoğu tepkimeye etki eder, ayrıca DNA çoğalması ve onarımı gibi olaylarda yer alırlar. Bazı enzimler çevrim sonrası değişim adı verilen bir süreç ile başka proteinler üzerine etki ederler, kimyasal gruplar ekler ya da çıkarırlar. Enzimler tarafından bağlanan ve etki gören moleküller substrat olarak adlandırılırlar.

**İmmunproteinler:** Bu proteinler antijen adı verilen makromoleküler nitelikli ligant yapıları geri dönüşümsüz bir etkileşim ile bağlayarak sabitleştirirler.

**Protein hormonlar:** Etkilerini gösterdikleri hücrelerin membranlarındaki kendilerine özgü proteinlere (reseptörlere) geri dönüşümlü olarak bağlanırlar.

**Düzenleyici proteinler:** Ligantlarına bağlanmaları geri dönüşümlü olup bu bağlanma ligantın biyolojik etkinliğinin değişmesiyle sonuçlanır.

**Taşıyıcı proteinler:** Kendilerine özgü ligandı geri dönüşümlü olarak bağlayıp, canlı sistemin bir bölümünden diğer bölümüne taşımakla görevlidirler.

**Kontraktıl proteinler:** Liganda bağlanmaları mekanik işin gerçekleşmesiyle sonuçlanır (Anon 1994).

### 2.3.1 Protein Yapıları

Çoğu protein katlanarak kendine has üç boyutlu bir yapıyla şekil alır. Proteinin doğal olarak oluşturduğu şekle onun “native” hali denir. Bir protein zincirindeki aminoasitlerin dizilimi proteinin “**birincil yapısı**” olarak adlandırılırlar. Dizilim anlaşılabilir olarak amino ucundan başlatılır, karboksil ucunda sonlandırılır. Çok sayıda proteinin birincil yapısı çözülmüştür.

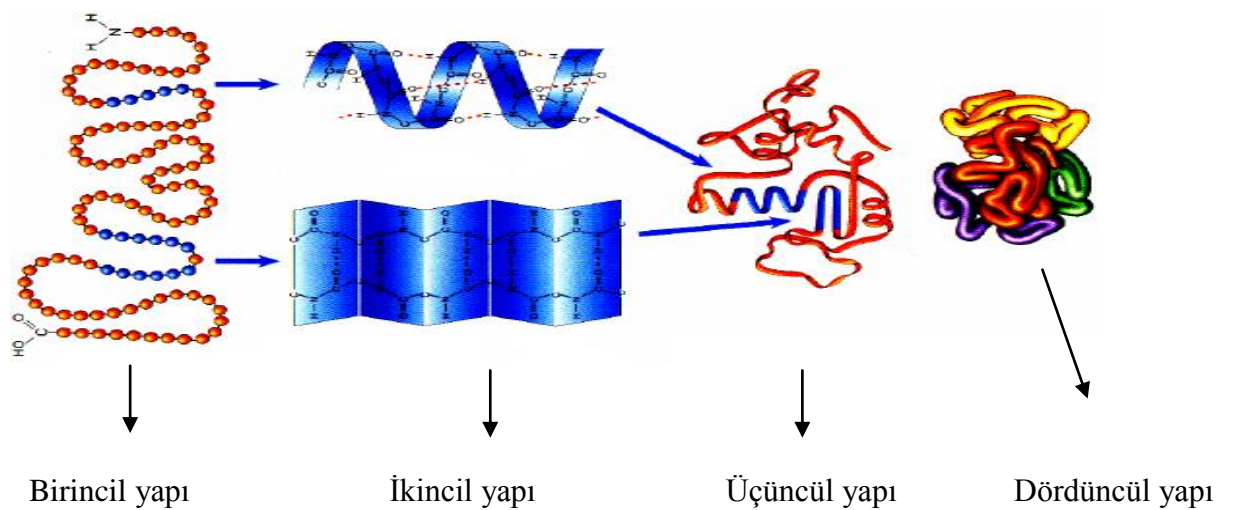
Proteinlerin “**ikincil yapıları**”, protein zincirinin uzaydaki organizasyonu ile ilgilidir. Bu güne değin birçok farklı türde ikincil yapının varlığı anlaşılabilir. En çok rastlanan ikincil yapılar  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -yaprağı ve rastgele sarım yapılarıdır.

Protein zinciri, yapı ve özellikleri farklı halkalardan oluştuğundan, bütün zincir boyunca tek düze bir ikincil yapı göstermemektedir. Halkalar arasında, hidrojen bağları, hidrofobik

etkileşimler ve iyonik bağlar gibi çoğu zayıf etkileşimler ve Sistein aminoasitleri arasında kurulan disülfid bağları (S-S) nedeni ile protein zinciri katlanıp paketlenerek, molekül küre (global) biçimini alabilmektedir. Bu üst yapıya ise **“üçüncül yapı”** denmektedir. Bu üç boyutlu geometrik şekiller, enzim gibi biyolojik yapıların fonksiyonları açısından çok büyük önem taşırlar. Bu nedenle enzimlerin üç boyutlu yapılarının ve bu yapıyı etkileyen faktörlerin bilinmesi enzimlerin çalışma mekanizmalarını anlamakta büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin yapı ve işlevlerinde suyun da çok önemli etkisi vardır. Yirmi aminoasitten bir kısmı polar veya hidrofilik, bir kısmı ise hidrofobik özelliğe sahiptir. Bu sebeple, bükülebilir bir protein zinciri hidrofobik etkileşimlerle katlanır. Bu sırada, hidrofobik aminoasitler su ile temas etmeyecek bir şekilde, oluşan küresel yapının merkezine doğru toplanırlar. Böylece su üçüncül yapının oluşumunu büyük ölçüde etkilemiş olmaktadır. Sonuç olarak ikincil yapı peptid bağları arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmasına rağmen üçüncül yapı yan zincirlerin kendi aralarında ve çevre ile etkileşimlerinden kaynaklanır.

Molekül ağırlığı çok büyük olan bazı proteinler, birincil, ikincil ve üçüncül yapıları birbirinden farklı birçok polipeptid zinciri içerebilmektedirler. Bu alt birimler arasında, muhtemelen yüzey yüklerinden kaynaklanan elektrostatik etkileşimlerle ortaya çıkan bir diğer üst yapı **“dördüncül yapı”** olarak adlandırılmaktadır. Örneğin, hemoglobin dört protein molekülünden oluşur. Hemoglobinin dördüncül yapısı işte bu proteinlerin hepsinin bir arada bulunması ve geometrik bir şekil oluşturması ile ortaya çıkar.

Proteinlerin bütün bu yapılarının şematik gösterimleri Şekil 2.3’ de bir arada verilmektedir.



Şekil 2.3 Protein yapıları.

Proteinlerin katlanma sürecini ve şeklini belirleyen diğer bir kural hidrofobik (polar olmayan ve suyu sevmeyen) grupların katlanmış yapı içinde, hidrofilik (polar ve suyu seven) grupların ise yapı yüzeyinde konumlanmasına dayanır. Ancak, bu kural suyun çözücü olarak bulunduğu ortam için geçerlidir. Normalde, yalın bir yapı düzenine sahip bir polipeptid zincirinin kendi içinde katlanarak özgün bir yapıya dönüşmesi olasılığı düşük bir olaydır (negatif entropi). Ancak, kurulan zayıf bağlar sonucu açığa çıkan enerji ve hidrofobik grupların polar su fazından uzaklaşarak aralarında kurdukları van der Waals bağları (pozitif entropi) katlanma sürecini olanaklı kılar.

### 2.3.2 Protein Yapılarına Hidrojen Bağ Etkisi

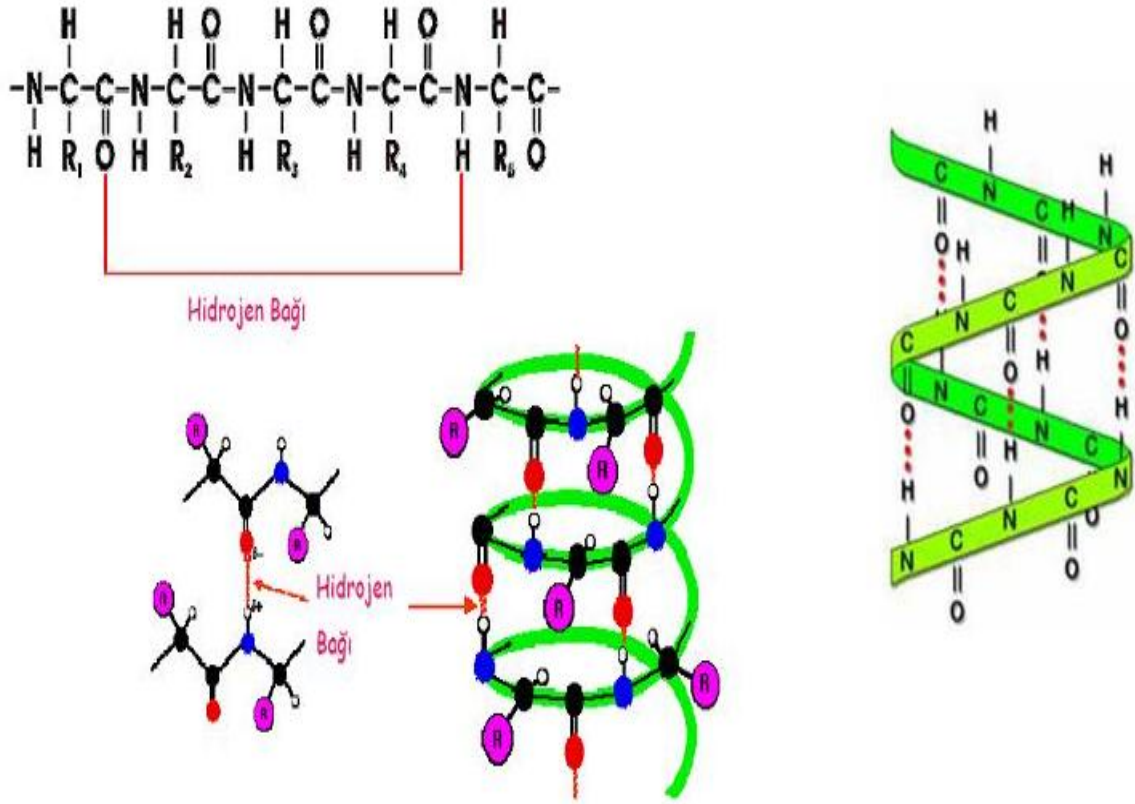
Biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için proteinler uzay içinde belli bir biçim alacak şekilde katlanırlar. Bu katlanmayı yönlendiren güçler, protein atomları arasındaki hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, Van Der Waals güçleri ve hidrofobik istiflenme gibi, kovalent olmayan etkileşimlerdir. Bu etkileşimlerden ikincil yapıların oluşumuna katkı sağlayan en önemlisi hidrojen bağıdır. Hidrojen bağı, bir moleküldeki oksijen, azot veya flor gibi elektronegatif bir atoma bağlı hidrojenin kısmi artı yüküyle yüklenmesi sonucu, başka veya aynı moleküldeki elektronegatif atom ile yaptığı kuvvetli bağıdır.

Bir polipeptid zinciri içindeki ( $=N-H$ ) ve ( $=C=O$ ) grupları arasında molekül içi (alfa sarmal yapı) veya moleküller arası ( $\beta$ -yaprağı yapısı) hidrojen bağlarının oluşumu sonucunda meydana gelen düzenlenime protein molekülünün "*ikincil yapısı*" denir. Peptid bağının  $=N-H$  grubunun ortaklanmamış elektron çiftleri ile  $=C=O$  grubu arasındaki mezomeri nedeniyle C-N bağı (peptid bağı) kısmen çift bağ özelliği gösterir ve bu nedenle de peptid grubu bir düzlem üzerinde bulunur. Polipeptid zinciri bu çift bağın etrafında serbestçe dönemez. Polipeptid zinciri  $C_\alpha$  karbon (alfa karbon) atomu etrafından peptid grubunun her iki tarafına serbestçe dönebilir. Sonuç olarak bazıları diğerlerine oranla daha kararlı olan çeşitli polipeptid oluşumu mümkün olabilir. Bunlar arasında en dayanıklı olanları ( $=N-H$ ) grupları ile ( $=C=O$ ) gruplarına hidrojen bağı ile bağlı olanlarıdır. Bu şekilde iki çeşit düzenlenme olabilir:

Bir polipeptid zincirin kendi  $=N-H$  ve  $=C=O$  grupları arasında (molekül içi) hidrojen bağlarının oluşumu ile polipeptid zinciri düşey bir eksenin etrafında helezon tarzında kıvrılır. Bu düzenlenime  $\alpha$ -heliks ( $\alpha$ -helix) yapı denir. Hidrojen bağları, sarmaldaki birinci peptid

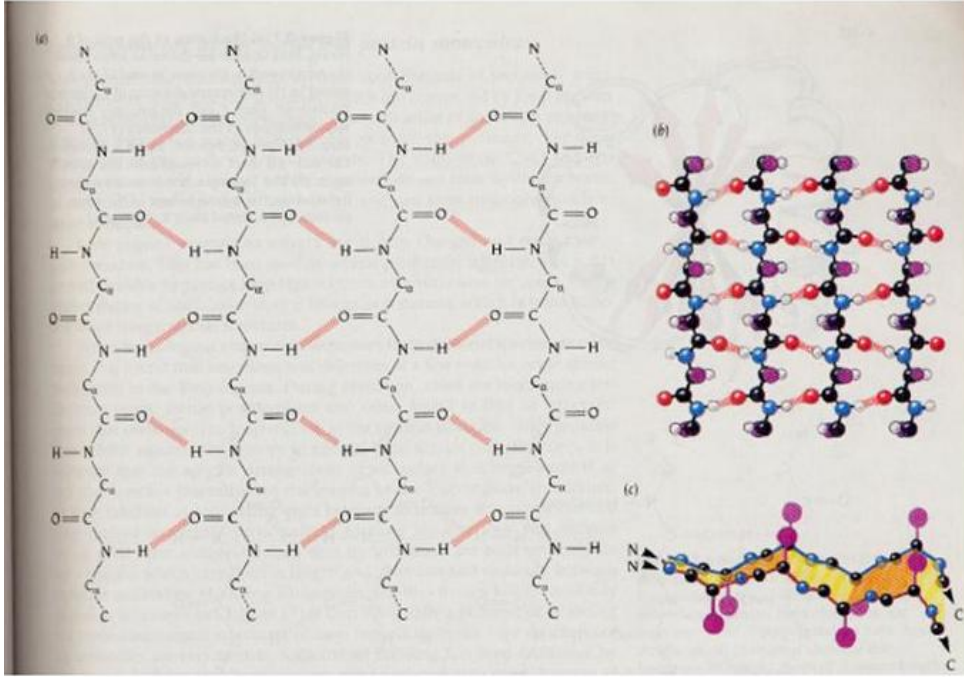


bağını dördüncüye, ikinci peptid bağını beşinciye ... sıralamasıyla bağlayarak sarmalın halkalarını sabitleştirir. Peptid bağlarına ait dipol momentler aynı yönde ve sarmal eksenine paraleldir.  $\alpha$ -heliks yapının her sarmalında 3.6 aminoasit kalıntısı bulunur. Bu şekil düz bir zincir halinde devam etmez, yer yer bükülmeler gösterir. Ala, Leu, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, His, Asn, Gln, Val aminoasitleri sarmal yapıyı sağlamlaştırılan aminoasitler olmasına karşın Ser, İle, Thr, Glu, Asp, Lys, Arg, Gly aminoasitleri ise yapıyı zayıflatırlar. Prolin ve hidroksprolin ise  $\alpha$ -heliks yapıyı kıran aminoasitlerdir (URL-1 2012 ).



Şekil 2.4 Hidrojen bağları ile alfa heliks yapının oluşumu (URL-2 2012).

Birkaç polipeptid zinciri arasında hidrojen bağlarının meydana gelmesiyle ve  $C_{\alpha}$  atomundaki R gruplarının aynı veya zıt yönde sıralanmasıyla ya birbirine paralel veya anti paralel düzenlenimler meydana gelir ki buna ikincil yapının “ $\beta$ -yaprağı” ( $\beta$ -sheet) veya kırmalı tabaka yapısı denir.



Şekil 2.5 Hidrojen bağları ile  $\beta$ -yaprağı yapısının oluşumu (URL-2 2012).

“Rastgele sarım” (random coil) olarak adlandırılan bir diğer yapı kolay değişebilirlik ve bükülebilirlik göstermektedir. Ortamın sıcaklığı veya iyonik içeriği değiştirilirse proteinlerin ikincil yapısı, özellikle  $\alpha$ -heliks yapısı bozulmaktadır.

Proteinler hidrojen bağları açısından zengindir. Proteinlerin üç boyutlu yapısını belirleyen güçler, protein omurgasındaki peptid atomları ve yan zincir grupları arasında şekillenen etkileşimler sonucu meydana gelir. Proteinlerin aktif üç boyutlu yapılarını kazanmalarında çözücü sistemin (su ve içinde çözülmüş bulunan bileşiklerin) de önemli bir rolü vardır.

Biyolojik sistemlerde tüm bu geri-dönüşümlü moleküler etkileşimler başlıca 3 güçle sağlanır:

1. Hidrojen bağları
2. Elektrostatik bağlar (tuz bağı ya da iyonik bağlar)
3. van der Waals çekmeleri

Hidrojen bağları, ana zincirin  $=NH$  ve  $-C=O$  grupları arasında  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -yaprağı yapıları oluştururlar. Ayrıca, 20 temel aminoasitten 11' inin yan zinciri de hidrojen bağı oluşumuna katılabilir. Hidrojen bağı oluşturma yeteneği olan gruplar;

1. Triptofan ve argininin yan zincirleri (sadece hidrojen bağı vericisidirler).
2. Peptid grubuna ek olarak glutamin, asparajin, serin ve threonin yan zincirleri (hidrojen bağı vericisi ve alıcısı olarak hizmet edebilirler).
3. Lizin e-amino grubu, aspartik asit ve glutamik asit b ve g-karboksil grubu, tirozin fenol grubu ve histidin imidazol grubu.

Bu gruplar pH değişimine bağlı olarak bazen alıcı ve bazen de verici olarak hizmet ederler.

## **2.4 PROTEİN YAPILARININ BELİRLENMESİ**

Moleküler biyoloji ve informatiğin uygulamalarından biri olan protein katlanması problemi üzerinde çalışmalar yapan bilim insanları, proteinin birincil yapısından başlayarak üç boyutlu yapısına ulaşma sürecinin ardında yatan biyolojik süreci araştırmaktadırlar. Proteinin üç boyutlu yapısının bilinmesi, genin hücre içindeki fonksiyonunun bilinmesini sağlar. Böylece, yapısı ve fonksiyonu bilinen bir gende herhangi bir aksaklık ya da bozukluk meydana gelmesi durumunda, bu genin neresindeki bozukluğun organizmada ne tür bir hastalığa sebep olabileceği hakkında bilgi edinmek mümkün olur. Ancak, proteinin üç boyutlu yapısını bulmak, gerek zaman gerekse ekonomik açıdan zahmetli bir iştir. 1969 yılında Cyrus Levinthal, katlanmamış bir polipeptid zincirindeki fazla sayıda serbestlik derecesi nedeniyle, molekülün çok sayıda olası konformasyona sahip olabileceğini fark etmiştir. Bu yüzden üç boyutlu yapının nümerik olarak hesaplanması olanaklı değildir (ITAP 2008).

Bir molekülün fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri onun üç boyutlu yapısı ile ilişkilidir. Moleküllerin yapısı ve fonksiyonu hakkında çeşitli teknikler farklı ve birbirini tamamlayıcı bilgiler verirler. Moleküllerin üç boyutlu yapılarının elde edilmesinde kullanılan deneysel teknikler; X-ışınları difraksiyonu, elektron ve nötron difraksiyonu ve NMR spektroskopisi gibi tekniklerdir.

X-ışınları difraksiyon yöntemleri ile küçük moleküllerin yanında proteinler gibi, biyolojik makromoleküllerin de 3 boyutlu yapısını büyük bir doğrulukla hesaplamak olanaklıdır. Protein moleküllerinin birincil yapısı biyokimyasal yöntemlerle, dördüncül yapısı (toplam biçimi) ise “küçük aç ı X-ışını saçılması” yöntemiyle (SAXS) ve “elektron mikroskobu” kullanılarak elde edilebilir. İkincil ve üçüncül yapısı hakkında ayrıntılı bilgi, protein içindeki atomların düzenlenimlerinin bilinmesini gerektirir. Bu amaçla kullanılan temel yöntem

protein kristalografisidir ve bu sayede atomik çözünürlüğe (1.0Å<sup>o</sup>) kadar bilginin kaydedilmesi sağlanır. “Circular Dichroism (CD)” spektroskopisi ise, yapısal asimetriden dolayı artan, sağ-elli polarize ışığa karşılık sol-elli polarize ışığın soğurulmasındaki farkları ortaya koyan bir tekniktir. Bu yöntemle proteinin ikincil yapısı, UV ötesi bölgede (190–250 nm) belirlenebilir. Bu dalga boylarında kromofor peptid bağıdır ve düzgün, katlanmış bir bölgede yerleştiğinde sinyal artar. Alfa-heliks, beta sheet ve random coil gibi yapıların her biri CD spektrumunda karakteristik bir şekil ve şiddete neden olur. Her ikincil yapı tipinin uygun kısmı, her yapı tipi için referans spektrumunun kesirsel çarpanlarının toplamı olarak, UV ötesi CD spektrumu analiz edilerek belirlenebilir.

Çözülmüş proteinlerin yapıları genelde Protein Data Bank (PDB) adlı veri tabanına kaydedilir ve bugün itibariyle kullanılabilir durumda yaklaşık 60.000 kristal yapı depolanmıştır. Yapısı çözülmemiş proteinlerin sayısından çok daha fazla sayıda yapısı henüz çözülmemiş proteinler vardır. Yapısı çözülmemiş proteinlerin çoğu, yapı çözmede kullanılan ve yukarıda bahsedilen başlıca deneysel tekniklere kolayca uygulanabilenlerden oluşmaktadır. Özellikle, globüler proteinlerin X- ışını kristalografisi için kristalleştirilebilmesi diğerlerine göre daha kolaydır. Ancak membran proteinlerinin kristalleştirilmesi zordur ve PDB’da pek fazla yer almazlar. Bu sebeplerden dolayı protein simülasyonu büyük bir önem kazanmıştır.

## 2.5 BİYOSENSÖRLER

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur. Canlılar teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı gösterirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır.

Son yıllarda bilim ve teknolojiye hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamın önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tat alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensör sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar.

Biyosensörlerin tarihi 1950' li yılların ortalarında L.C.Clark' ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın oksijen ( $O_2$ ) miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons "Glukozoksidaz" (GOD) enzimini  $O_2$  elektrotu ile kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşmuştur. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur. Bir biyolojik sıvıdaki glikoz ve çözülmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glikoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada  $O_2$  harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde  $O_2$  elektrotu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözülmüş  $O_2$  ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan  $O_2$  olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine *biyosensörler* adı verilir.

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, analiz edilecek bir veya bir grup madde miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu ile oluşturulurlar. Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikolar ve nükleik asitler de kullanılabilir olup ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak adlandırılırlar.

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip 'biyomolekül/biyoajan', bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen 'çevirici' ve 'elektronik' bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik ajandır. Genel olarak biyoajanlar, biyoafinite ajanları ve biyokatalitik ajanlar olarak iki alt gruba ayrılırlar. Biyoafinite ajanları olan antikolar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılmaktadırlar.

Biyosensörlerin, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur.

Özellikle 20.yüzyılın son 10 yılında, askeri bir tehdit oluşturması açısından hem dönemin genelkurmay başkanı, ABD eski dışişleri bakanı Colin Powell' ın olabilecek en ürkütücü silahın biyolojik silahlar olduğu yönündeki açıklamaları, 21.yüzyılın ilk dönemi için hem maddi hem de teknik açıdan biyosensör araştırmalarının yönünü belirlemiştir. 2002 yılı Mayıs ayında Japonya' nın Kyoto şehrinde gerçekleşen '7.Dünya Biyosensör Kongresi' çalışma gruplarına ait başlıklar, dünyanın güvenlik, teknik ve ticari anlamda hangi tür araştırmalara öncelik tanıdığı konusunda fikir vermesi bakımından önemlidir. Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir (Telefoncu 1999).



## BÖLÜM 3

### MOLEKÜLER MODELLEME VE KUVVET ALANLARI

#### 3.1 GİRİŞ

Modelleme metotlarının genel amacı, molekülün yapısı ile biyolojik aktivitesi arasında ilişkilendirme yapmaktır. Bu amaç için önemli bir adım, molekülün içerdiği atomların konumlarının fonksiyonu olarak molekülün potansiyel enerjisini hesaplamaktır. Bir molekülün enerjisini hesaplamak için farklı yaklaşımlar vardır.

$H\Psi = E\Psi$ , Schrödinger denkleminin çözümüne dayalı kuantum hesaplar yalnızca hidrojen ve helyum gibi küçük moleküller için çözülebilir. Çok atomlu sistemlere bu metodun uygulanması için bazı yaklaşımların yapılması gerekir.

Birinci yaklaşım, çekirdek ve elektronları ayırmaktır. Bu yaklaşımda, çekirdekler elektronlardan çok daha ağırdır ve çok daha yavaş hareket ederler. Bu yüzden moleküler sistemler sabit çekirdek etrafında hareket eden elektronlar olarak algılanabilir (Born-Oppenheimer yaklaşımı). Bu varsayımı kullanan Schrödinger denkleminin çözümleri göreceli çekirdek koordinatlarına bağlı etkin elektronik enerji değerlerini doğurur. Çekirdek koordinatları hareket ettirildiği için moleküler enerjiler yeniden hesaplanır ve moleküler enerjinin nicel olarak bir tanımı türetilir. Enerji ve geometri arasında ilişki kuran bu tanımlama, molekül için potansiyel enerji yüzeyi olarak tanımlanır. Bu yüzeydeki en düşük nokta taban durum enerjisine karşılık gelir.

İkinci yaklaşım, bir-elektron (spin) yörüngelerinin çarpımı olarak temsil edilebilecek  $\Psi$  dalga fonksiyonuna izin verir. Bu orbitalleri tanımlamak için kullanılan fonksiyonlar baz fonksiyonlarına karşılık gelir. Bu formalizm Lineer Combination Atomic Orbitals (LCAO) olarak adlandırılır. Orbitaller türetildikten sonra orbital katsayıları hesaplanır. Hartree-Fock teori bu amacı gerçekleştirmek için kullanılır. Hartree-Fock, bir moleküler orbital setinin



enerjisinin, her orbitali tanımlamak için kullanılan baz set fonksiyonları ve sistemin enerjisini minimize etmek için ( $N \times N$ ) matris setini çözmeye bir alıştırma olur. Bu hesaplama, denklemleri çözmek için bir değer gerektiği için katsayıların değeri için bir başlangıç tahmininin uyumlu değerler sağlanana kadar düzeltildiği bir iteratif süreç kullanılır. Bu metod, Self Consistent Field (SCF) teori olarak bilinir.

Kuantum mekaniği, moleküllerin davranışını teorik bir modelle tanımlamak için matematiksel bir tanımlama setini kullanır. Bu modellerin geçerliliği, deney sonuçlarıyla modelden türetilen yapı ve özelliklerin karşılaştırılmasıyla ölçümlendirilebilir. Genelde ab initio metotlar, oluşum ısısı, iyonizasyon potansiyeli, UV/Visible spektra ve moleküler geometri gibi özellikler için laboratuvar ölçümlerini yeniden üretebilir.

Ab initio kuantum metotlar, çok sayıda denkleme birkaç tane çözüm hesaplar. Son yayınlar, büyük moleküller üzerine hesapları içerirken bu metotlar veri dosyalarını depolamak için gerekli geniş veri alanı ve her hesap için ihtiyaç duyulan bilgisayar zamanından dolayı 10 ile 20 arasında atom içeren sistemlerle sınırlıdır. Fizikçi ve teorik kimyacılar bu sınırlamaları kaldırmak için alternatif yaklaşımlar geliştirdiler. Bu metotlar, yarı deneysel kuantum metotlara karşılık gelirler.

Yarı deneysel metotlar, ab initio metotlara benzer yaklaşımlar kullanmasına karşın, hesapları basitleştirmek için bazı yaklaşımlar kullanırlar. Bu metotta molekül içindeki tüm elektronları analiz etmek yerine bazı elektronların etkileşimleri göz ardı edilirler. Yarı-deneysel metotlar ab initio metotlara göre daha az bilgisayar kaynağı gerektirirken hala hesaplamak için zahmetlidirler. Genelde hesaplar 100 atoma kadar olan sistemler için yapılırlar. Bu metodun başlıca eksiği uygun parametrelerin geliştirilebildiği sınırlı sayıda sistemin oluşudur.

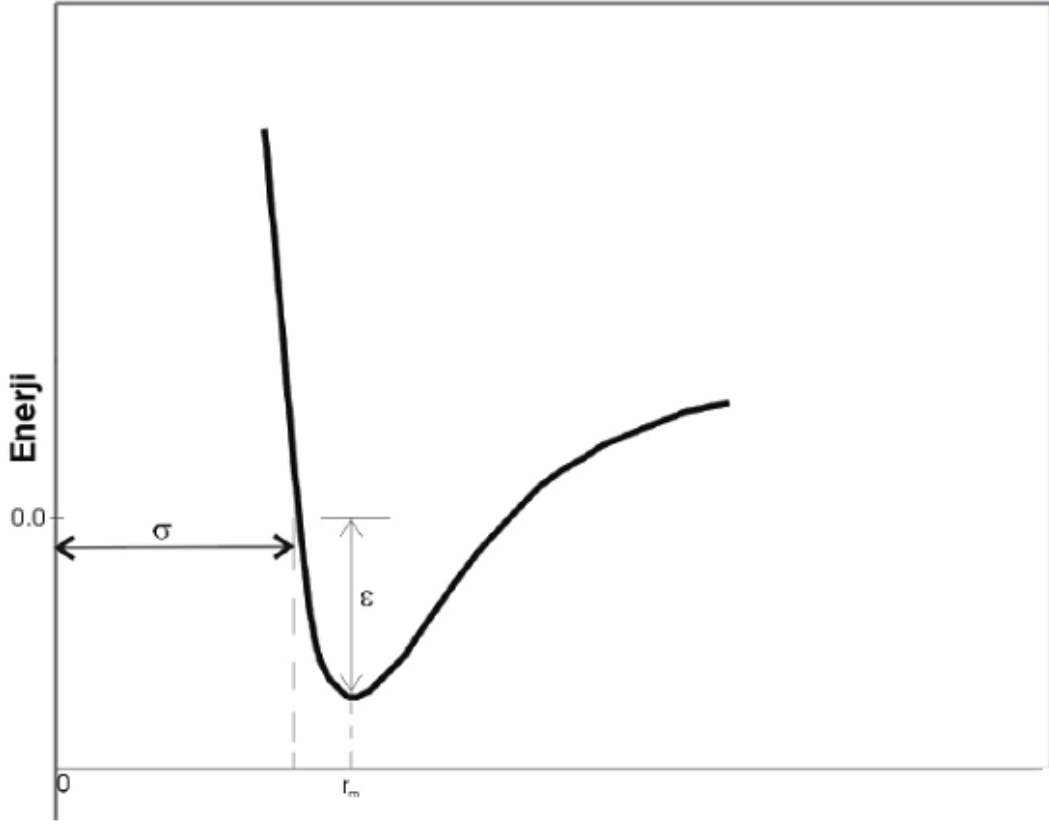
Deneysel olarak çalışılan birkaç yüz atomdan (ilaç adayları, monomerler,..) birkaç bin atoma (proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, polimerler, ...) kadar sistemler için kuantum mekaniğine dayalı yöntemlerin kullanılması mümkün değildir. Bu yüzden moleküler geometrilerin ve ilgili özelliklerin hesaplanacağı şekilde bir basitleştirme daha gereklidir. Bu yaklaşım moleküler mekanik ya da kuvvet alanı (force field) metodu olarak bilinir. Moleküler mekanik, moleküler geometrilerin, enerjilerin ve diğer özelliklerin bağ uzunlukları, bağ açıları ve burulma açılarını denge değerlerine ayarlayarak yeniden belirleme girişiminde bulunan matematiksel bir formalizmdir. Bu yöntem, kuantum fiziğini kullanmak yerine klasik Newton



Eşitlik 3.3' deki terim bağlı atom çiftleri arasındaki etkileşmeyi gösterir. Burada  $k_i$  kuvvet sabiti,  $\ell_i$  iki atom arasındaki bağ uzunluğunu gösterirken, başlangıç bağ uzunluğu  $\ell_{i,0}$  ile temsil edilir. Eşitlik 3.4' deki terim ise yine bağlı atom çiftlerinin bağ açılarının değişiminin potansiyel enerjiye etkisini açıklar.  $\theta_i$  iki atom arasındaki açıyı,  $\theta_{i,0}$  ise başlangıçtaki bağ açısını gösterir. Eşitlik 3.5' deki burkulma potansiyeli, bağların dönmesiyle enerjinin nasıl değiştiğini ifade eder. Burada  $\alpha_i$  burulma açısıdır.

Bağımsız moleküller ve atomlar, ayrı moleküler türlerin yapısını belirlemede önemli bir rol oynayan bağlı olmayan kuvvetlerle etkileşirler. 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. Elektronegatif elementler, daha az elektronegatif olanlara göre elektronları daha çok çekerler ve bir molekülde eşit olmayan bir yük dağılımına sebep olurlar. İki molekül arasındaki elektrostatik etkileşim, uç yük çiftlerinin arasındaki etkileşimlerin toplamı olarak Coulomb yasası ile hesaplanır. 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. Bu iki fonksiyon ile temsil edilen bağlı olmayan enerji terimleri Eşitlik 3.6' da bir arada verilmiştir. Lennard-Jones 12-6 potansiyeli sadece iki ayarlanabilir parametre içermektedir: çarpışma çapı ( $\sigma$ ) ve kuyu derinliği ( $\epsilon$ ). Bu parametrelerin grafiksel olarak gösterimi Şekil 3.1' deki gibidir. Lennard-Jones potansiyeli,  $r^{-6}$  ile değişen bir çekim kısmı ve  $r^{-12}$  ile değişen itme bölümüyle karakterize edilmektedir.

Moleküler modelleme ile protein veya peptid dizilimlerinin hem termodinamik yapıları hem de katlanma özelliklerini çalışmak için literatürde oluşturulmuş kuvvet alanlarından en çok bilinenleri; AMBER (Cornell et al 1995), CHARMM (MacKerrell et al 2000), GROMOS (van der Gunsteren et al 1996), GROMACS (van der Spoel et al 2005) ve ECEPP (Sippl et al 1984) potansiyel enerji fonksiyonlarıdır. Bu fonksiyonlar, küçük moleküllerin deneysel verilerine ve bazı terimler için kuantum kimyasal hesaplara uyumundan parametrize edilmiştir. En genel anlamda, bu fonksiyonlar  $E=E_p+E_{solv}$  şeklinde iki terimin toplamıdır.  $E_p$ , proteinin kendi konformasyonel enerjisi,  $E_{solv}$ , proteinin içinde bulunduğu çözücüyle etkileşme enerjisidir.



Şekil 3.1 Lennard-Jones Potansiyeli.

Protein ve peptidlerin katlanma süreçlerini irdeleyen simülasyon çalışmaları, büyük ölçüde bu moleküllerin vakum içerisindeki ve yalnızca iç fiziksel etkileşimleri göz önüne alınarak yapılmıştır. Hangi model çerçevesinde hesaba katılırsa katılsın sıvı etkileri; protein ve peptidlerin hidrojen bağı yapma ve heliksel yapı oluşturma yatkınlığı, heliks-coil faz geçişinin derecesi ve faz geçiş sıcaklığı gibi parametreler üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Fizikokimyasal olarak ele alındığında, su moleküllerinin polipeptid içi hidrojen bağı oluşma kapasitesini etkilemesinin yanında su köprüsü adı verilen polipeptid zinciri bakımından da büyük öneme sahip olduğu kanıtlanmıştır (Arkın 2007).

Proteinler diğer biyomoleküller gibi çözücü içinde bulunurlar. Modellenen sistemin gerçeğe yakın olması için molekül-çözücü etkileşimlerinin göz ardı edilmemesi gerekir. Bu nedenle çözeltilerin de protein gibi modellenmesi gerekmektedir. Molekül-çözücü etkileşiminin önemi sebebiyle birçok çözücü etkisi yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlardaki ana fikir hesaplamalara çözünmeyi katmadan bir çözücünün etkisini karşılayabilecek uygun bir metot

geliştirmektir. Çözücü katkısını karşılayan, yaygın olarak kullanılan metotlardan biri, çözücünün protein moleküllerine erişim yüzey alanlarıyla (SASA) orantılı olarak ifade edilir. Bu modelde, 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  $E_{\text{Solv}}$  çözünme enerjisi  $A_i$ ,  $i$  atom tipinin SASA'sı ve  $\sigma_i$  atom tipine bağlı ve çözücünden gelen tüm katkıları içeren orantı sabiti olmak üzere,

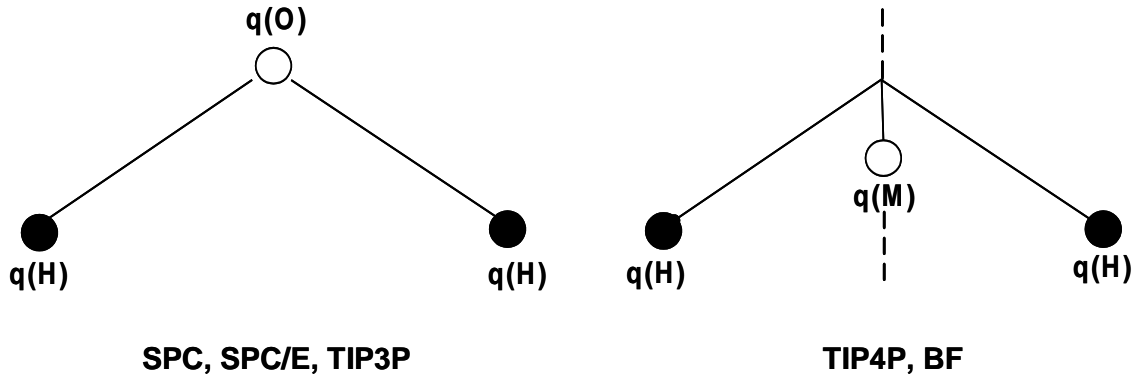
$$E_{\text{Solv}} = \sum_i \sigma_i A_i \quad (3.7)$$

eşitliği ile verilir.  $i$  parametre setinin (ASPs) seçimi, bir çözelti modeli tanımlar ve halen literatürde çeşitli ASP setleri bulunmaktadır. Bu setlerden bazıları, çözücü bir organik sıvıdan suya değiştirildiğinde, basit model bileşenlerinin serbest enerjilerinde deneysel olarak gözlenen değişimlere, en küçük kareler yöntemiyle uyumundan türetilmiştir. Diğerleri ise kuvvet alanları varlığında yapılan MD simülasyonlarıyla, çözücü vakumdan ya da oktanoldan suya değiştirildiğinde, model bileşenlerinin transfer serbest enerjisi tarafından hesaplanmıştır (Eisenberg and McLachan 1986, Ooi et al. 1987, Eisenberg et al. 1989, Kim 1990, Schiffer et al. 1993).

Diğer taraftan, suyun evrensel bir çözücü olması ve biyomoleküllerin dinamiği ve yapısında önemli bir rol oynamasından dolayı su içerisinde bulunan bir peptid veya proteinin, protein-protein ve protein-su etkileşmelerinin simülasyon teknikleri ile incelenebilmesi için çok sayıda su molekülünü temsil edecek modeller geliştirilmiştir. Bu modellerin başlıcaları, “five-site rigid nonpolarizable model of liquid (TIP5P) (Mahoney and Jorgensen 2000)”, “four-point transferable intermolecular potential (TIP4P) (Jorgensen et al. 1985)”, “three-point potential (TIP3P) (Jorgensen et al. 1983)”, “single-point charge (SPC) (Berendsen et al. 1981) ve extended single-point charge (SPC/E) (Berendsen et al. 1981) su modelleridir. Bunlar temel olarak aynı olmakla beraber su molekülünü tam olarak temsil edebilen yük merkezlerinin yerlerinde (Şekil 3.2) ve kullandığı etkileşim parametrelerinde (Çizelge 3.1) farklılıklar vardır.

Çizelge 3.1 Çeşitli su modellerinin karşılaştırılması (Jorgensen et al.1983).

Model	$R_{O-H}(A^0)$	$\theta_{HOH}$	$q(H)$	$q(O)$	$q(M)$	$r(OM)A^0$
SPC	1.0	109.5	0.41	-0.82	0.0	0.0
TIP3P	0.957	104.5	0.417	-0.834	0.0	0.0
TIP4P	0.957	104.5	0.52	0.0	-1.04	0.15



Şekil 3.2 Literatürdeki bazı su modellerinin şematik gösterimleri.

Bütün bu popüler su modelleri, oda sıcaklığı ve 1 atm basınç altında suyun karakteristik özelliklerini temsil edebilen modellerdir. Literatürde bu modeller “explicit” su modelleri olarak bilinirken farklı ASP setleri ise “implicit” su modelleri olarak bilinmektedirler.



## BÖLÜM 4

### SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ

#### 4.1 GİRİŞ

Moleküler simülasyon metotlar, moleküler sistemin potansiyel enerjisini hesaplanma biçimine göre üç farklı sınıfa ayrılabilirler. Bu üç sınıf kuantum mekaniksel metotlar (QM), Monte Carlo (MC) ve Moleküler Dinamik (MD) olarak sayılabilirler. Bu üç metot, sistemin özelliklerini hesaplamak için sırasıyla enerji minimizasyonu, konfigürasyonel faz uzayı üzerinde integrasyon ve Newton hareket denklemlerinin çözümü gibi farklı matematiksel yaklaşımlar kullanırlar.

QM metotlar, temel parçacıklar olarak elektronları kullanarak moleküler sistemlerin özelliklerini hesaplamak için Schrödinger denklemini yaklaşık olarak çözmeye dayalı olduğu için büyük ölçüde doğru olmasına karşın hesaplama maliyeti yüksektir ve 100 atoma kadar sistemler için uygundur. Biyomoleküller gibi çok sayıda atom içeren moleküller için ise daha yoğun olarak Monte Carlo ve Moleküler Dinamik simülasyon yöntemleri kullanılırlar.

#### 4.2 MONTE CARLO (MC) SİMÜLASYON YÖNTEMİ

Monte Carlo metotları, rastgele sayılar kullanarak konformasyon uzayını modellemekte kullanılan sayısal tekniklerdir. “Monte Carlo” ismi şans oyunlarına benzerliği yüzünden konulmuştur. Günümüzde farklı Monte Carlo simülasyon metotları, atmosfer çalışmaları, nükleer fizik, trafik akışı ve tabii ki biyokimya ve biyofizik gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır. Genel olarak Monte Carlo metodu, yeni konformasyon üretilmesi ve bu konformasyonun kabul edilebilirliğine karar verilmesi şeklinde iki basamaktan oluşur.

Monte Carlo metodunda verilen herhangi bir konformasyondan sonra “zar atılır”, yani bilgisayar gelecek konformasyona karar vermek için rastgele bir sayı seçer. Bir durumdan



diğerine geçişin detayları çalışma konusuna göre farklılık göstermektedir. Örneğin, polipeptidlerdeki burulma açılarının değişimi aşağıdaki basamakları içerir. İlk olarak, zar atılarak polipeptid omurgasındaki aminoasitlerin konumları rastgele seçilir. Sonra aminoasitteki değişken burulma açılarından biri gelişigüzel değiştirilerek bir konformasyon elde edilir. Ardından başka bir açı yine rastgele değiştirilerek yeni bir konformasyon elde edilir. Bu aşamada yeni konformasyonun kabul edilebilirliğine karar verilir. Yeni konformasyon reddedilirse, kabul edilir bir konformasyon bulunana kadar yukarıdaki işlem tekrar edilmelidir. Eğer kabul edilirse, bulunan konformasyon yeni olarak kabul edilir ve işleme kaldığı yerden devam edilir. Aşağıdaki sıcaklık bağımlı Metropolis olasılığı yeni konformasyonların kabul edilebilirlik şartıdır:

$$P = \begin{cases} e^{-\beta\Delta E}, & e^{-\beta\Delta E} < 1 \\ 1, & e^{-\beta\Delta E} \geq 1 \end{cases} \quad (4.1)$$

Burada  $\beta = 1/kT$  ve  $\Delta E$  potansiyel enerjideki değişmedir. Yani, yeni konformasyonun enerjisi eskisinden daha düşük ise,  $\Delta E < 0$ , daima kabul edilir. Fakat yeni konformasyonun enerjisi eskisinden yüksek ise,  $\Delta E > 0$ , kabul edilebilirliği Boltzmann faktörüne bağlıdır.  $\Delta E > 0$  daha yüksek enerji durumunda, bilgisayar 0-1 aralığında rastgele bir r sayısı seçer ve bu sayı p olasılığı ile Metropolis kriterine göre karşılaştırılır. Eğer  $p > r$  ise kabul edilir, aksi durumda reddedilir.

Monte Carlo işlemi rastgele sayılarla yürüdüğü için, rastgele sayı üreticinin kalitesi simülasyonlarda önemli bir olgudur. Rastgele sayı üreticilerin, 0-1 aralığında düzgün dağıtılmış rastgele sayılar ürettiği varsayılmaktadır. Fakat gerçekte bilgisayar hiçbir şekilde rastgele sayı üretmez, çünkü sayı üretmek için belirli bir algoritma kullanmaktadır ve bu algoritmanın da sonlu bir periyodikliği vardır. Yüksek kalitedeki bir algoritma yeterli bir periyodikliğe sahip olmakta ve dağılım gerçekten de rastgele görünmektedir. Günümüzde birçok rastgele sayı üretici algoritması vardır. Bunlar kullanılmadan önce test edilmelidir. Pratikte 10.000 veya üzeri sayılı basit bir histogram dağılımının düzgün olup olmadığı bize sayı üreticinin kalitesi hakkında fikir verir (Bilsel 2009).

### 4.3 MOLEKÜLER DİNAMİK (MD) SİMÜLASYON YÖNTEMİ

Dinamik simülasyon metotlar, protein ve diğer biyolojik makromolekül konformasyonlarının zamanla gelişimi hakkında bilgi vermesinin yanı sıra kinetik ve termodinamik bilgiler edinmek için de kullanılır. Bu metotlar, başka şekilde ulaşılamayan bir zaman skalasında bir sistemin özelliklerini belirlemek için kullanılabilir. Bu yönüyle simülasyon model sistemlerimizi anlamamızı kolaylaştıracak değerli bir araç olmaktadır. Ek olarak, bir sistemin teorik olarak ele alınması, hesapsal kimya aracılığıyla bir özelliğe, özel katkıları araştırmaya izin verir; yani bir şekilde simülasyonu değiştirmek fiziksel değildir fakat yine de araştırılacak bir modelin karakteristiğine izin verir. Özel bir örnek, simülasyon boyunca sistemin bir temsilinden diğerine enerji fonksiyonlarının yapay olarak değişimidir. Bu serbest enerji hesaplarında önemli bir tekniktir. Bu yüzden, MD simülasyonlar bir dizi tamamlayıcı hesapsal yaklaşımla beraber protein yapı ve fonksiyonlarının temelini araştırmak için değerli araçlar haline gelmiştir.

MD metotlar, 1950' ler boyunca teorik fizik topluluğu içinde ele alınmıştır. 1957' de Adler ve Wainwright, katı-küre modeli olarak adlandırılan ve atomların yalnızca mükemmel çarpışmalar aracılığıyla etkileştikleri ilk MD simülasyonları yapmışlardır. Ardından, Rahman gerçek atomik etkileşimleri benzetmek için düzgün ve sürekli bir potansiyel uygulamıştır. Bilgisayarların yaygınlaşmasıyla 1976' da ilk olarak MD simülasyonlar bir proteinin deneysel enerji fonksiyonlarının kullanıldığı daha karmaşık sistemler için geliştirilmiştir. Şimdilerde yaygın olarak biyofizik ve materyal bilimi alanında da yoğunlukla MD simülasyonları kullanılmaktadırlar. Bu simülasyonlarda bir dizi deneysel şart, modern teori ve algoritmalarla simüle edilebilirler. Başlangıçta simülasyonlar yalnızca vakumda tek bir molekül için yapılmış olsalar bile, günümüzde daha gerçekçi ve en azından biyolojik olarak daha anlamlı simülasyonlar yapılmaya başlanmıştır.

#### 4.3.1 Enerji Minimizasyonu

Bir moleküler mekanik protein model probleminde yapılacak iş, N atomik koordinat başına üç serbestlik derecesini ve r atomik koordinatları göstermek üzere,  $r = \{r_1, r_2, r_3, \dots, r_N\}$  gibi N bağımsız değişken seti verildiğinde,  $r_{\min}$  ile gösterilen bir konumda, V(r) potansiyel enerji fonksiyonunun global minimuma sahip olduğunu bulmaktır. Bu sebeple problemin,

hesaplamalı olarak bir non-linear optimizasyon problemi şeklinde olduğu görülebilir. Böyle non-linear optimizasyon problemleri çözmek için var olan nümerik algoritmalar ve bunların küçük bir seçimi, yaygın olarak proteinlerin moleküler mekanik modellemesine uygulanabilir.

Çok sayıda bağımsız değişkenle genel bir non-linear fonksiyonun global minimumunu belirlemek oldukça zordur. Birkaç yüz atomlu tipik biyomoleküler sistemler, 300 civarında değişkenle karakterize edilebildiğinden, global minimumu belirlemek genellikle imkansızdır. Diğer yandan enerji minimizasyon metotları, etkin bir şekilde moleküler yapıları rafine etmek için kullanılırken bütün olarak konformasyon uzayı örnekleme için yetersizdirler. İlgili minimumlardan saptırılmış bağ açıları ve uzunluklarıyla rafine edilmemiş moleküler yapı verildiğinde, enerji minimizasyon metotları bu kusurları düzeltmek için çok faydalı olabilir ve böylece sürekli olarak protein sistemlerine uygulanabilirler. En popüler enerji minimizasyonu metotları, çeşitli mertebeden türevler kullanırlar; birinci mertebeye türev kullanan yöntemler Steepest Descent ve Conjugate Gradient iken ikinci mertebeden türev kullanan metot ise Newton-Raphson metottur.

Steepest Descent metot, birkaç birinci mertebeye iteratif metotlardan biridir. Bunların tümü en yakın enerji minimumuna bir araştırma yoluna rehberlik etmesi için potansiyel enerji yüzeyinin gradyentini kullanırlar. Formal olarak,  $F$  kuvvet vektörü ve  $r$  atomik koordinat vektörü olmak üzere,

$$F(r) = -\frac{dV(r)}{dr} \quad (4.2)$$

şeklinde tanımlanır. İteratif descent metotların tümünde, atomik konfigürasyonların belirlenmesi,  $k$  iterasyon için,

$$x(k) = x(k-1) + \lambda(k)F(k) \quad (4.3)$$

ilişkisi uygulanarak üretilir. Burada  $x$  vektörü,  $3N$  boyutlu konfigürasyonu,  $\lambda(k)$  bir adım büyüklüğüne ve  $F(k)$  kuvvet vektörüne karşılık gelir. Adım büyüklüğü, ilk iterasyon için genellikle keyfi olarak ya da birkaç basit deneysel biçimde seçilir. Her iterasyondan sonra bu adım büyüklüğü sistemin tüm potansiyel enerjisinin bu adımla azalıp artışına göre ayarlanır. Enerji artarsa, arama yönü boyunca yerel minimum üzerinden atlayabilecek kadar büyük

olduğu farz edilir ve adım büyüklüğüne göre çarpım faktörü tipik olarak 0.5 çarpanı kadar azaltılır. Enerji azaldığında adım büyüklüğü birkaç çarpanla 1.2 civarında artırılabilir. Adım büyüklüğünün devamlı ayarlanması ilgili bölgede potansiyel enerji fonksiyonunu belli bir eğrilik için kabaca uygun bir durumda tutar. Steepest Descent çoklu yerel minimuma sahip düzensiz potansiyel yüzeyli çok boyutlu problemler için büyük ölçüde yetersizken en yakın yerel minimumu bulmada güçlüdür. Sonuç olarak, global enerji minimumunu belirlemek için gerekli global hareketler gözlenmeyecektir. Yine de uzaysal çakışmaları kaldırmada ve bağ uzunluklarını ve açılarını standart değerlerine getirmede çok etkindir.

Conjugate Gradient metodu Steepest Descent metoduna göre daha yavaştır. Conjugate Gradient metodunda kuvvet vektörü, potansiyel enerjinin gradyentinin eksi işaretlisi olarak tanımlanmıştır. Gradyent vektörü, verilen fonksiyonun en büyük artış yönünü gösterir. Bu nedenle, kuvvet vektörü potansiyel enerjideki en büyük azalış yönünü gösterir. Potansiyel enerjinin minimumu, gradyenti sifıra eşitleyerek elde edilen denklemin  $r^N$  için çözümü ile bulunur.

$$r_{m+1} = r_m + \alpha_m d_m \quad (4.4)$$

Burada  $d_m$  adım (araştırma) yönüdür ve  $\alpha$  araştırma yönünde potansiyel enerjiyi minimize eden sayıdır.  $\alpha$ 'nın çözümü,  $r_{m+1} = r_m + \alpha_m d_m$  noktasında potansiyel enerjinin gradyentinin araştırma yönüne dik olmasını gerektirir.

Tipik biyomoleküler MM sistemlere uygulanmadan önce basit değişimler gerektirmesine rağmen Newton-Raphson metot, popüler bir ikinci türev metodudur. Metodun temeli şu varsayıma dayanır: potansiyel enerji minimum bölgede en azından bireysel değişkenlerin karesiyle ilişkilidir. a, b ve c sabitler olmak üzere, potansiyel aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$V(x_i) \approx a + bx_i + cx_i^2 \quad (4.5)$$

Buradan da birinci ve ikinci türevler,

$$\frac{dV(x_i)}{dx} = b + 2cx \quad \text{ve} \quad \frac{d^2V(x_i)}{dx^2} = 2c \quad (4.6)$$

şeklinde yazılır. Minimum olma şartından  $x_{\min}$  aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$x_{\min} = -\frac{b}{2c} = \frac{\left(2cx - \frac{dV}{dx}\right)}{\left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)} = x - \frac{\left(\frac{dV}{dx}\right)}{\left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)} \quad (4.7)$$

### 4.3.2 Moleküler Dinamik

Basit ifadeyle, MD simülasyonlar, bir MM sistemdeki mevcut kuvvetlerin ve sistemin ardışık hareketlerinin iteratif nümerik hesaplarını içerir. MM sistem, klasik mekanikte tanımlanmış hareket denklemlerine göre etkileşmeleriyle hareket eden bir parçacık setini içerir. Açık biçimde genellikle kuantum dinamik etkiler göz ardı edilir. Bunun yerine her parçacık bir nokta kütle olarak düşünülür ve bu yaklaşım Born-Oppenheimer yaklaşımıyla sağlanır.

Bilindiği gibi  $m_i$  kütleli, konumu 3-boyutlu  $r_i$  vektörü ile gösterilen  $i$  atomu için atomun hızı ve  $p_i$  momentumu arasındaki ilişki,

$$\frac{dr_i}{dt} = \frac{p_i}{m_i} \quad (4.8)$$

şeklinde verilir. Sistemin geri kalanı tarafından  $i$  atomu üzerine etkileyen  $F_i$  net kuvveti,  $i$  atomunun koordinatına göre potansiyel enerji fonksiyonunun negatifıyla aşağıdaki gibi verilir.

$$F_i = -\frac{dV}{dr_i} \quad (4.9)$$

$i$  atomu için Newton hareket denklemi ise,

$$\frac{dP_i}{dt} = F_i \quad (4.10)$$

ile verilir.  $r_i$  vektörünün tek bir bileşenine göre konum verildiğinde (tek bir x doğrultusu boyunca konum) belli bir t anında, kısa ve sonlu bir  $\Delta t$  zaman aralığı sonunda konum Taylor serileri tarafından verilir.

$$x(t + \Delta t) \approx x(t) + \frac{dx(t)}{dt} \Delta t + \frac{d^2 x(t)}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (4.11)$$

Taylor serisinde daha yüksek mertebeli terimler için bazı yaklaşımlar yapılırsa  $x(t)$  konumu,  $\frac{dx(t)}{dt}$  hızı ve  $\frac{d^2 x(t)}{dt^2}$  ivmesi, hareket denkleminin çözümü için yeterli olmaktadır. Tek boyut için Newton' un 2. yasası ivmeyi,

$$\frac{d^2 x(t)}{dt^2} = \frac{F(x)}{m} \quad (4.12)$$

şeklinde tanımlar. Burada,  $F(x)$ , x yönüne paralel atom üzerine etkiyen net kuvvetin bileşenidir. En basit yaklaşım, ikinci türevde Taylor serisini keserek daha yüksek terimlerin toplamını sıfır farz etmektir. Bu durumda tüm sistemin üzerine etkiyen net kuvvet, toplam enerjinin ve momentumun korunumuyla sonuçlanacak şekilde sıfır olmaktadır. Önerilen basit bir yaklaşımla, sistemin toplam enerjisinde bir simülasyon süresince önemli dalgalanmalar ve sapmalar meydana gelir. Bu basit yaklaşımın geliştirilmiş hali modern MD yazılımlarda kullanılır.

### 4.3.3 İntegrasyon Algoritmaları

Hareket denklemlerini integre etmek için çok sayıda algoritma vardır. Bunların pek çoğu, atomik etkileşmeleri betimleyen sürekli potansiyellerin analitik bir çözümü engellediğinden, integrasyonun  $\Delta t$  zaman periyoduyla ayrılmış küçük adımlara bölündüğü sonlu fark metotlarıdır.

Basit Verlet algoritması,  $t + \Delta t$  anındaki yeni koordinatları belirlemek için t anındaki konum ve ivmeyi bir önceki adımdaki  $r(t - \Delta t)$  konumlarını kullanır.  $t + \Delta t$  anındaki hız ve konum değerleri,

$$\mathcal{G}_i \left( + \Delta t \right) = \mathcal{G}_i \left( \right) + \frac{F_i \left( \right)}{m_i} \Delta t \quad (4.13)$$

$$r_i \left( + \Delta t \right) = r_i \left( \right) + \mathcal{G}_i \left( \right) \Delta t + \frac{F_i \left( \right)}{2m_i} \Delta t^2 \quad (4.14)$$

ifadeleri ile ve  $t - \Delta t$  anındaki konum değeri ise,

$$r_i \left( - \Delta t \right) = r_i \left( \right) - \mathcal{G}_i \left( \right) \Delta t + \frac{F_i \left( \right)}{2m_i} \Delta t^2 \quad (4.15)$$

ifadesiyle verilir. Bu ifadeyi Eşitlik 4.14 ile toplayacak olursak hız vektörleri yok edilir ve konum değerleri aşağıdaki gibi bulunabilir.

$$r_i \left( + \Delta t \right) = 2r_i \left( \right) - r_i \left( - \Delta t \right) + \frac{F_i \left( \right)}{m_i} \Delta t^2 \quad (4.16)$$

Verlet algoritmasının az miktarda değişimi olan Leap-frog algoritması da oldukça popüler bir algoritmadır. Bu algortmada, konumlar ve hızlar  $\Delta t/2$  zaman aralığında aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır.

$$\mathcal{G}_i \left( + \Delta t/2 \right) = \mathcal{G}_i \left( - \Delta t/2 \right) + \frac{F_i \left( \right)}{m_i} \Delta t \quad (4.17)$$

$$r_i \left( + \Delta t \right) = r_i \left( \right) + \mathcal{G}_i \left( + \Delta t/2 \right) \Delta t \quad (4.18)$$

Alternatif sonlu fark metot integratörleri, hız Verlet metot ve Beeman algoritmasını içerirler. Hız Verlet metot, konum, hız ve ivmelerin hesabını hassasiyetten ödün vermeden yapar. Beeman algoritması ise, hızlar için daha kesin bir ifade kullandığı için geliştirilmiş enerji korunum karakteristiği içermektedir.

Genel olarak kullanılan algoritmaların tümü, zaman tersinir olduğundan, simülasyonun zamanda keyfi olduğu anlamı ortaya çıkar. Eğer atomların hızları işaretlerini değiştirirse, simülasyon tam olarak ters yönde gerçekleşirdi.

Herhangi bir integrasyon yapısının hesaplama maliyeti önemlidir. Fakat integrasyon metotlarının hesaplama maliyetleri, sisteme etkiyen tüm kuvvetlerin hesabıyla karşılaştırıldığında önemsizdir. Bu yüzden, simülasyon boyunca gerekli kuvvet hesaplarının sayısını sınırlandırmak daha avantajlıdır. Bunu yapmak için daha uzun zaman adımına izin veren integratör seçmek gerekmektedir.

Taylor seri açılımının derecesi, her integratörün doğruluğunu belirlemede önemlidir. Verilen integrasyon yapısında dikkate alınmayan en büyük terim, metodun derecesi olarak tanımlanır. Örneğin Verlet algoritmasında,  $\Delta t^4$  ötesindeki terimler kesildiğinden bu algoritma 4.mertebe bir metottur.

Seçilmiş bir hata düzenleyici ile düzeltilebilen integrasyon algoritma ailesi, tahmin et-düzeltilen metotlar olarak adlandırılır. Bu metotlar, konumlar, hızlar, ivmeler ve Taylor açılımının istenilen daha yüksek mertebeli terimlerini tahmin ederler. Daha sonra, kuvvetler  $t+\Delta t$  anındaki ivmeleri bulmak için bu tahmin edilmiş konumlarla hesaplanırlar. İki ivme seti karşılaştırılır ve bir düzeltme adımı orijinal olarak tahmin edilen hız ve konumlar için ayarlanır.

#### **4.3.4 Topluluklar**

Sistemin durumunu belirleyen sıcaklık, basınç, parçacık sayısı gibi parametre setine sistemin termodinamik durumu denir. Bir sistem atomik konuma ( $q$ ) ve momentuma ( $p$ ) bağlı olarak tanımlanır. Konumlar ve momentumlar çok boyutlu uzayda noktalar olarak düşünülür ve bu uzay faz uzayı olarak tanımlanır. Faz uzayında bir nokta  $\Gamma$  gösterilir ve sistemin durumunu tanımlar.

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 noktalar serisi üretir. Bu noktalar aynı topluluğa ait olup sistemin değişik şekillerine ve bu şekillerin



momentumlarına karşılık gelirler. Moleküler Dinamikte kullanılan kümeler sistemin bulunduğu koşullara göre değişir ve kullanılan başlıca kümeler aşağıdaki gibi gruplandırılabilirler.

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

**Kanonik Küme (NVT):** Sabit atom sayısı N, sabit hacim V ve sabit sıcaklık T ile karakterize edilen durumudur.

**İzobarik Küme (NPT):** Sabit atom sayısı N, sabit basınç P ve sabit sıcaklık T ile karakterize edilen topluluktur.

**Büyük Kanonik Küme ( $\mu VT$ ):** Sabit kimyasal potansiyel  $\mu$ , sabit hacim V ve sabit sıcaklık T ile karakterize edilen termodinamik haldir.

Moleküler dinamikte genellikle fiziksel bir niceliği ölçmek, sistemin fiziksel özelliklerin zaman ortalamalarını almak anlamına gelir. Fiziksel nicelikler genellikle 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 verilir.

$$\langle A \rangle_{küme} = \iint dp^N dr^N A(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \quad (4.19)$$

Burada  $A(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$  ilgilenilen niceliktir ve sistemin konumları ( $r$ ) ve momentumları ( $p$ ) cinsinden ifade edilir.  $\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$  ifadesine ise olasılık yoğunluğu denir ve

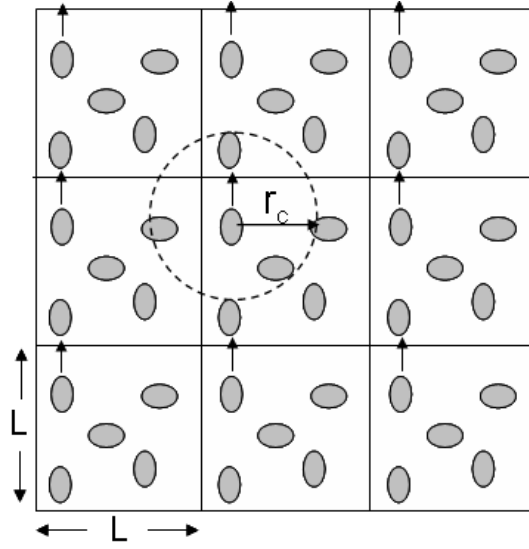
$$\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) = \frac{1}{Z} \frac{\exp \left[ -\frac{H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{k_B T} \right]}{k_B T} \quad (4.20)$$

şeklinde ifade edilir. Burada H Hamiltonyen, T sıcaklık,  $k_B$  Boltzmann sabiti, Z üleşim fonksiyonudur. Üleşim fonksiyonu,



etkilerini çözmek için en yaygın olarak kullanılan yöntem “Periyodik Sınır Şartları”nı uygulamaktır (Leach 2001).

Periyodik sınır şartları az sayıda parçacıklı bir sistemin simülasyonuna olanak sağlamaktadır. Bunun için periyodik bir düzen elde edecek biçimde tüm yönlerde kopyalanan kübik kutu düşünelim. İki boyutlu böyle bir kutu Şekil 4.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Periyodik Sınır Şartları.

Periyodik sınır koşullarına göre, V hacmini kaplayan N tane atomun bulunduğu hücreye “ana hücre” denir. Bu sistemde ana hücre Şekil 4.1’ de ortadaki hücredir ve iki boyutta çalışıldığından bu hücreye komşu 8 adet hücre vardır. Komşu hücreler ana hücre ile aynı boyut ve geometrik şekle sahiptirler. Bu sanal hücrelerde de N tane atom bulunmaktadır ve bunlara ana hücredeki atomların görüntü atomları denir. Ana hücredeki bir  $i$  parçacığı  $r_i$  konumunda ise L hücre büyüklüğü ve n tamsayı olmak üzere,

$$R \left( \vec{r}_i \right) = R \left( \vec{r}_i + nL \right) \quad (4.23)$$

konumlarında görüntü atomları bulunur. Böylece ana hücre tüm doğrultularda görüntülenerek periyodik hale getirilir. Periyodik sınır koşullarının kullanıldığı simülasyon modellerindeki mantıkta, Şekil 4.1’ de de gösterildiği gibi ana hücreden diğer bir komşu hücreye hareket eden parçacığa karşılık sanalı da aynı hareketi yapar. Sonuç olarak ana hücredeki parçacık sayısı

değişmez kalır ve bütün parçacıklar birbirleriyle etkileşir. Böylece ana hücre için sınır koşulları ortadan kalkmış olur.

Periyodik sınır koşulları kullanarak hücredeki atomlar arası etkileşimler hesaplanırken “kısa mesafelerdeki” etkileşimler göz önünde tutulur. Bunun anlamı, ana hücredeki bir  $i$  atomunun toplam potansiyel enerjisi bir  $r_c$  kesim mesafesinden küçük uzaklıklarda bulunan komşu atomlarla yaptığı etkileşimlerden oluşmaktadır. Periyodik sınır koşulları kullanıldığında  $r_c$ 'nin periyodik hücre boyutunun yarısından küçük olması ( $r_c < L/2$ ) önemlidir çünkü bu durumda  $i$  atomunun en yakın komşularla yaptığı etkileşimler dikkate alınmaktadır. Periyodik sınır koşulları korunum yasalarını sağlamaktadır. Sistemin toplam atom sayısı sabit ve sanal atomlar ana hücredeki atomlarla özdeş olduğundan kütle korunmaktadır.

Periyodik sınır şartları yalnızca kübik sistemlerle sınırlandırılmaz. Rhombic dodecahedron, truncated octahedron gibi diğer geometriler de kullanılır. Bu, hesaplama gereksinimlerinde azalmaya neden olacak şekilde sistemdeki çözelti atomlarının sayısını önemli ölçüde azaltabilir. Periyodik sistemler için uygun geometrilerin sayısı sınırlıdır fakat stokastik sınır şartları periyodikliğe sahip olmayan herhangi bir geometriyle kullanılabilir.

Stokastik sınır şartları, özellikle ligand-binding çalışmalarındaki bağlanma bölgesindeki gibi sadece belli bir bölge araştırıldığında kullanışlıdır. Bu durumda ilgili bölge genellikle küresel olan bir kabuk içinde kapalıdır. Bu kabuk bölgeye ait olan atomlara stokastik dinamik uygulanır. Stokastik kabuk bölge atomların kararlı olduğu bir depoyla çevrilidir. Kabuk bölge konformasyon, yoğunluk ya da enerjideki yerel dalgalanmalara yerleşir.

#### **4.3.6 Sınırlandırma Dinamiği**

Sabit bir hesap büyüklüğünden bir simülasyonun uzunluğu dikkate alınan etkileşimlerin maliyeti, her adımda ele alınması gereken etkileşim sayısı ve ilerletilecek serbestlik derecelerinin sayısını içeren bir dizi unsur tarafından belirlenebilir.

Pek çok algoritmik gelişmeler MD simülasyonların etkinliğini ve kararlılığını artırmak için uygulanabilirler. Etkinliğin gelişimi, genellikle SHAKE (Ryckaert et al 1977 ), LINCS (Hess et al 1997) ve RATTLE (Andersen 1983) gibi algoritmaların kullanımıyla hidrojen atomlarının bağlarının sabit uzunluklara sınırlayarak en hızlı etkileşim modlarını dondurarak

elde edilebilir. SHAKE, LINCS ve RATTLE ile hidrojen atomlarını içeren bağ uzunluklarının sabitlenmesi, simülasyonun hassasiyetinden herhangi bir düşüş olmadan daha büyük zaman adımının kullanılmasını sağlar.

SHAKE algoritması (sınırlandırılmış Verlet metot olarak da bilinir) bağ uzunlukları ve bağ açıları gibi iç koordinatlar üzerine sınırlamaları uygulamak için Verlet algoritmasının basit bir değişimidir. Zaman adım uzunluğu  $\Delta t$  nin simüle edilen en yüksek frekanslı hareketin periyoduyla kıyaslandığında küçük olması gereksinimiyle sınırlandırılabilir. İlgili biyomoleküler sistemler için en yüksek frekanslı hareketler bağ gerilme titreşimleridir. Fakat bu titreşimler genel olarak biyomoleküler yapı ve fonksiyon çalışmalarında minimal düzeyde ilgiye sahiptir. Bu yüzden, bağları denge uzunluklarına sınırlandıran algoritmaların kullanımı daha faydalıdır. SHAKE algoritmasında tüm sınırlamalar atomlar arası uzaklıkların sabitlenmesiyle uygulanır. Bağ uzunlukları durumunda, tek atomlar arası uzaklık yeterlidir. Bağ açılarını sınırlandırmak üç uygun atomik koordinatların üç atom arası uzaklıkla ilgili olduğu gerçeğine dayanır.

Eğer k sınırlaması, i ve j atomları arasındaki uzaklık üzerine ise o zaman  $r_{ij}$  i atomdan j atomuna vektör ( $r_{ij} = r_j - r_i$ ) ve  $d_{ij}$  istenilen uzaklık olmak üzere bağ koşulu,

$$r_{ij}^2 - d_{ij}^2 = 0 \quad (4.24)$$

olarak ifade edilebilir. Pratik nümerik simülasyonda herhangi bir verilen adımda sınırlamanın, sapmaların birkaç sınır değerden küçük olduğunda sağlanabileceği söylenebilir. SHAKE durumunda sınırlama,  $\epsilon$  bir sabit ve  $d_k$  denge bağ uzunlukları olmak üzere,

$$r_{ij}^2 - d_{ij}^2 < \epsilon / d_k^2 \quad (4.25)$$

olduğunda sağlanır. LINCS sınırlama metodunda, doğrudan sınırlamaların türevlerinden çok kendileri yenilenirler (yani hızlardan çok sınırlandırılmış uzaklıkları yenilerler) ve bu haliyle SHAKE metoduna göre daha kararlı ve hızlıdır.

#### **4.3.7 Benzetilmiş Tavlama (Simulated Annealing)**

Tavlama, erimiş bir maddenin sıcaklığının materyal tek büyük bir kristal verecek şekilde yavaşça azalması sürecidir. Bilgisayar çipleri için silikon kristallerinin elde edilmesi gibi üretimin pek çok alanında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Tavlamanın kilit özelliği katı-sıvı faz geçişindeki sıcaklık kontrolünün çok dikkatli kullanılmasıdır. Sonuçta elde edilen mükemmel kristal serbest enerjide global minimuma sahiptir. Benzetilmiş tavlama (Simulated annealing, SA) çok sayıda olası çözüme sahip problemlere optimal ya da en iyi çözümler bulmak için bu süreci taklit eden bilgisayar hesaplama metodudur (Kirkpatrick et al 1983).

Bu metotta, verilen bir sıcaklıkta sistemin Monte Carlo ya da Moleküler Dinamik simülasyon kullanılarak termal dengeye ulaşması sağlanır. Yüksek sıcaklıklarda sistem yüksek enerji bariyerlerini aşmak için konformasyon uzayının yüksek enerji bölgesini işgal edebilir. Sıcaklık düştükçe Boltzmann dağılımına göre daha düşük enerjili durumlar daha olası olur. Mutlak sıfırda, sistem en düşük enerjili durumu işgal etmelidir (global minimum enerji konformasyonu). Global olarak, optimize çözüme ulaşmayı garantilemek için her birinde sistemin termal dengeye gelmek zorunda olacağı sonsuz sayıda sıcaklık adımı gerekir. Dikkatli sıcaklık kontrolü, sistemin enerjisi bir konformasyonel uzay bölgesini diğerinden ayıran bariyerlerin yüksekliğiyle kıyaslanabildiğinde gereklidir. Bu duruma çoğunlukla pratikte ulaşılamaz ve bu yüzden SA global minimumu bulmayı garanti etmez. Bununla birlikte, aynı sonuç çeşitli koşullardan elde edilirse o zaman global minimumun bulunması yüksek olasılıklıdır. Bir takım SA koşulları bir molekülün düşük enerji konformasyon serisini verebilir.

#### **4.3.8 Moleküler Dinamikte Sıcaklık-Basınç Kontrolü**

Moleküler Dinamikte sıcaklığı sabit tutmak için birçok neden vardır. Biyolojik yapılar sıcaklık değişimi ile farklı davranışlar gösterebilirler. Bu nedenle modelleme sonunda elde edilecek sonuçların analizlerinin doğru yapılabilmesi için simülasyon boyunca sıcaklığın kontrol edilmesi gerekmektedir. Standart Moleküler Dinamik mikrokronik kümede yapılar fakat ilgilenilen fiziksel sistemin belirli bir sıcaklık altındaki davranışları incelemek için bir sıcaklık termostatı kullanmak kaçınılmazdır. Termostatlar fiziksel sistemin istenilen sıcaklıklarda ve istenilen kümede incelemek için tasarlanmıştır. Sistemin sıcaklığını kontrol

etmenin pek çok yolu vardır. Sıcaklık kontrolü için literatürde bulunan en kolay yollardan birisi “hız ölçeklendirmesi” yapmaktır.

#### 4.3.8.1 Hız Ölçeklendirmesi Metodu

İncelenen sistemin sıcaklığı sistemin ortalama kinetik enerjisi ile ilişkilidir

$$\langle KE \rangle = \frac{3}{2} k_B N T \quad (4.26)$$

Dolayısıyla sıcaklığı kontrol altına almak için hızı kontrol altına almak gereklidir. Herhangi bir t zamanında sistemin sıcaklığı T(t) ise ve parçacıkların hızlarını bir  $\lambda$  faktörü ile çarparsak,

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i}{N k_B} \langle v_i^2 \rangle - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i}{N k_B} \langle v_i^2 \rangle \quad (4.27)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1) T \quad (4.28)$$

şeklinde verilen formlar oluşacaktır ve her iki eşitlikten  $\lambda$  faktörü,

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_{\text{yeni}}}{T}} \quad (4.29)$$

olarak bulunacaktır. Sıcaklığı istenilen değerde tutmak için parçacıkların hızlarını her adımda  $\lambda$  faktörü ile çarpmamız gerekmektedir. Bu yönteme “hız ölçeklendirme metodu” denir. Bu yöntemin dezavantajı kanonik kümede sıcaklık dalgalanmalarına izin vermemesidir.

#### 4.3.8.2 Berendsen Sıcaklık Çiftlenimi

Sıcaklığı kontrol etmek için alternatif bir diğer yöntem ise, incelenen sistemi sabit bir sıcaklıkta bulunan ısı tankı ile etkileşimde tutarak sıcaklığı istenilen değere getirmektir (Berendsen et al. 1984). Sıcaklık değişim oranı, sistem ile ısı tankı arasındaki sıcaklık farkı ile orantılıdır ve bu aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_{\text{bath}} - T) \quad (4.30)$$

Burada  $\tau$  çiftlenim parametresidir. Bu parametrenin büyüklüğü sistem ile ısı tankı arasındaki etkileşimin boyutunu belirler. Sıcaklıktaki değişim

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau} (T_{\text{bath}} - T) \quad (4.31)$$

eşitliğiyle verildiğinde

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\partial t}{\partial \tau} \left( \frac{T_{\text{bath}}}{T} - 1 \right) \quad (4.32)$$

$\tau$  çiftlenim parametresi büyük ise sistem ile ısı tankı arasındaki çiftlenim zayıf, küçük ise güçlü olur. " $\tau = \delta t$ " ise algoritma basit hız ölçeklendirme yöntemine dönüşür.

#### 4.3.8.3 Genişletilmiş Sistem Metodu

Hız Ölçeklendirme yöntemleri tam olarak kanonik küme oluşturamazlar. Bu yöntemler sonucunda incelenen fiziksel sistem istenilen sıcaklık değerine getirilse de çözücü ve çözünen sıcaklıkları birbirinden az da olsa farklılık gösterirler. Simülasyon çalışmalarını kanonik kümede gerçekleştirmek için "Genişletilmiş Sistem Metodu" kullanılır. Genişletilmiş sistem metodu Nose-Hoover tarafından geliştirilmiş bir metottur. Bu metot, incelenen fiziksel sistemle birleşik ve ek serbestlik derecesine sahip bir ısı deposuyla etkileşim mantığına dayanır. Bu ısı banyosunun potansiyel enerjisi,

$$U = \left( \frac{1}{2} \right) k_B \quad (4.33)$$

kinetik enerjisi ise ;

$$K = \left( \frac{Q}{2} \right) \left( \frac{ds}{dt} \right)^2 \quad (4.34)$$



şeklinde verilir. Burada  $Q$ , boyutu (enerji)  $\times$  (zaman)<sup>2</sup> olan ekstra serbestlik derecelerinin kütlesidir ve gerçek sistemle ısı deposunun çiftlenim büyüklüğünü belirler. İncelediğimiz gerçek fiziksel sistem ile bu sisteme ısı deposu entegre ederek oluşturduğumuz genişletilmiş sistemimizin hızları arasında bir ilişki vardır.

Gerçek sistemimizde bulunan parçacıkların hızlarını;

$$V_i = s \frac{dr_i}{dt} \quad (4.35)$$

şeklinde tanımlarız. Gerçek sistemimizdeki zaman adımı  $dt$ , genişletilmiş sistemimizdeki zaman adımına  $dt'$  denilirse aralarındaki ilişki aşağıdaki ifadeyle verilebilir.

$$dt = s dt' \quad (4.36)$$

Ek serbestlik derece sayısı olan  $s$  değişebilir.  $s$  değeri değiştikçe parçacık hızlarına bağlı olarak gerçek sistemimizdeki sıcaklık  $T$  değişir. Bu sayede gerçek sistemimiz ile ısı deposu arasında ısı geçişi olacak ve sistem istenilen sıcaklığa erişecektir.

#### 4.3.8.4 Parinello-Rahman Basınç Çiftlenimi

Moleküler Dinamik yönteminde, sabit hacim yerine sabit basınç altında simülasyon yapmak  $T$  arzu edilen bir durumdur. Bu durumda, basınç değişimi de sıcaklık değişimi gibi simülasyon sonucunu etkileyeceğinden, kontrol altına alınması gereken bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.

1980 yılında basıncı sabitlemek için Parinello ve Rahman (PR) (Parinello and Rahman 1981) tarafından anizotropik sistemlere uygulanabilecek bir yöntem geliştirilmiştir. 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 vektörle ifade edilir. Parinello ve Rahman yaklaşımında kutu içindeki bir  $i$  atomunun hareket denklemi (Haile 1992),

$$\frac{d^2 \mathbf{b}}{dt^2} = \mathbf{V} \mathbf{W}^{-1} \mathbf{b}^{j-1} (\mathbf{P}_{ref} - \mathbf{P}_{dis}) \quad (4.37)$$

eşitliği ile verilir. Burada,  $V$  simülasyon kutusunun hacmi,  $P_{ref}$  istenilen basınç değeri,  $P_{dis}$  sisteme uygulanan dış basınçtır.  $W$  matrisi aşağıdaki Eşitlik 4.38 ile ifade edilir ve sistem ile basınç tankının etkileşiminin büyüklüğünü belirler.

$$W^{-1}_{ij} = \frac{4\pi\beta_{i,j}}{3\tau_p^2 L} \quad (4.38)$$

Parinello-Rahman yaklaşımı ile simülasyonda basınç zaman sabiti ( $\tau_p$ ) ve izotermal sıkıştırılabilirlik ( $\beta$ ) belirlemekle sistemin basıncı kontrol altına alınır.



## BÖLÜM 5

### KOPYA DEĞİŞ TOKUŞ MOLEKÜLER DİNAMİK METOT (REMD)

Protein katlanma (folding) simülasyonlarında, düşük sıcaklıkta, simülasyonlar çok sayıda yerel minimum enerji durumlarından birine takılma eğilimi gösterdiğinden, klasik simülasyon metotlarıyla tam bir kanonik dağılım elde etmek zordur. Bu çoklu-minimumlar (multiple-minima) problemini çözenin bir yolu, non-Boltzmann olasılık ağırlık çarpanlarına dayalı bir simülasyon yapmaktır. Böylece enerji uzayında rastgele bir yürüyüş (random walk) gerçekleştirilebilir. Rastgele yürüyüşler, simülasyonun herhangi bir enerji bariyerini geçmesine izin verir ve böylece klasik metotlardan çok daha geniş bir faz uzayı örneklenebilir. Böyle iyi bilinen metotlardan biri olan Multikanonik algoritma enerji uzayında 1 boyutlu rastgele yürüyüş (random walk) sağlarken, bir diğer metot olan Simulated Tempering sıcaklık uzayında 1 boyutlu rastgele yürüyüş sağlamaktadır. Bu tip ağırlık çarpanlarından dolayı enerji uzayında rastgele yürüyüş sağlayan metotlara genel olarak genelleştirilmiş topluluk algoritmaları denir.

Genelleştirilmiş topluluk metotları güçlüdür fakat Multikanonik ve Simulated Tempering metotta olasılık ağırlık çarpanları önceden bilinmez ve kısa simülasyonların iterasyonu ile belirlenmek zorundadır. Bu süreç çok zordur ve can sıkıcı olabilir. Bunların üstesinden gelen genelleştirilmiş topluluk algoritmasına dayalı başka bir metot ise REMD metottur. Bu metotta ağırlık çarpanı zaten bilinmelidir ve belirlenmesinde hiçbir sıkıntı yoktur.

Koordinat ve momentum vektörleri sırasıyla  $q=\{q_1, q_2, \dots, q_N\}$  ve  $p=\{p_1, p_2, \dots, p_N\}$  olan  $m_k(k=1, \dots, N)$  kütleli N atomlu bir sistem düşünelim.

Sistemin Hamiltoniyeni  $H(q,p)$ , kinetik enerji  $K(p)$  ve potansiyel enerjinin  $E(q)$  toplamıdır:

$$H(q,p)= K(p)+ E(q) \quad (5.1)$$

$$K(p) = \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m_k} \quad (5.2)$$

T sıcaklıktaki bir kanonik toplulukta,  $H(q,p)$  Hamiltonyenli her  $X=(p,q)$  durumu

$$W_B = e^{-\beta H(p,q)} \quad (5.3)$$

Eşitliğindeki Boltzmann çarpanıyla ağırlıklandırılır. Ortalama kinetik enerji ise aşağıdaki gibi verilir.

$$\langle K(p) \rangle_T = \left\langle \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m_k} \right\rangle_T = \frac{3}{2} N k_B T \quad (5.4)$$

REMD Metodu için geliştirilmiş topluluk, kanonik toplulukta  $M$  farklı sıcaklıkta  $T_m$  ( $m=1, \dots, M$ ) orijinal sistemin  $M$  tane etkileşmeyen kopyasını (replica) içerir. Kopyalar için  $i$  ( $i=1, \dots, M$ ) etiketi, sıcaklıklar için  $m$  ( $m=1, \dots, M$ ) etiketinin bir permütasyonudur (veya tam tersi):

$$\begin{aligned} i &= i(m) \equiv f(m), \\ m &= m(i) \equiv f^{-1}(i) \end{aligned} \quad (5.5)$$

Burada  $f(m)$ ,  $m$ ' nin permütasyon fonksiyonu ve  $f^{-1}(i)$  ise fonksiyonun tersidir. Bu geliştirilmiş toplulukta  $X$  durumu  $T_m$  sıcaklıkta  $i$  kopyasındaki  $N$  atomun  $q^{[i]}$  koordinat ve  $p^{[i]}$  momentumlarının

$$x_m \equiv (q_m, p_m) \quad (5.6)$$

tüm  $M$  seti üzerinden bir bileşimdir:

$$X = (x_1, \dots, x_M) = (x_m^1, \dots, x_m^M) \quad (5.7)$$

Kopyalar etkileşmediğinden, bu geliştirilmiş topluluktaki  $X$  durumu için ağırlık çarpanı her kopyanın (ya da sıcaklığın) Boltzmann çarpanlarının çarpımıyla verilebilir:

$$W_{\text{REM}}(X) = \exp\left\{-\sum_{i=1}^M \beta_m H\left(\mathbf{q}^{\pm}, p^{\pm}\right)\right\} = \exp\left\{-\sum_{m=1}^M \beta_m H\left(\mathbf{q}^{\pm}, p^{\pm}\right)\right\} \quad (5.8)$$

Genelleştirilmiş toplulukta sırasıyla  $T_m$  ve  $T_n$  sıcaklıklarına sahip  $i$  ve  $j$  kopyalarının değiş tokuş (exchange) edildiğini düşünelim:

$$X = (\dots, x_m^{\pm}, \dots, x_n^{\pm}, \dots) \rightarrow X' = (\dots, x_m^{\pm'}, \dots, x_n^{\pm'}, \dots) \quad (5.9)$$

Burada  $i$ ,  $j$ ,  $m$  ve  $n$  Eşitlik (5.5)' deki permütasyon fonksiyonları ile ilişkilendirilir ve kopyaların değiş tokuşu yeni bir  $f'$  permütasyon fonksiyonunu ortaya çıkarır.

$$\begin{aligned} i &= f(m) \rightarrow j = f'(m), \\ j &= f(n) \rightarrow i = f'(n), \end{aligned} \quad (5.10)$$

Bu değiş tokuş daha detaylı olarak şu şekilde verilir:

$$\begin{aligned} x_m^{\pm} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm}, p^{\pm}\right)_m &\rightarrow x_m^{\pm'} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm'}, p^{\pm'}\right)_m, \\ x_n^{\pm} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm}, p^{\pm}\right)_n &\rightarrow x_n^{\pm'} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm'}, p^{\pm'}\right)_n \end{aligned} \quad (5.11)$$

Bu süreç  $i$  ve  $j$  kopyalarına ait olan  $T_m$  ve  $T_n$  sıcaklık çiftinin değiş tokuşuna denktir:

$$\begin{aligned} x_m^{\pm} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm}, p^{\pm}\right)_m &\rightarrow x_n^{\pm'} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm'}, p^{\pm'}\right)_n, \\ x_n^{\pm} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm}, p^{\pm}\right)_n &\rightarrow x_m^{\pm'} \equiv \left(\mathbf{q}^{\pm'}, p^{\pm'}\right)_m \end{aligned} \quad (5.12)$$

REMD yaparken  $q$  koordinatların yanı sıra  $p$  momentumları dikkate almak zorundayız. Momentumlar için aşağıdaki formlar önerilir:

$$\begin{aligned}
p^{i'} &\equiv \sqrt{\frac{T_n}{T_m}} p^i, \\
p^{j'} &\equiv \sqrt{\frac{T_m}{T_n}} p^j,
\end{aligned}
\tag{5.13}$$

Bu tanımlama Eşitlik (5.4)' deki sıcaklık şartını sağlayabilmesi için iki sıcaklık oranlarının karekökü ile kopyalardaki tüm atomların hızlarını yeniden skalalandırılma olanağı sağlar. Bu değiş tokuş sürecini bir denge dağılımına doğru yaklaştırmak yeterlidir.

$$W_{REM}(\mathbf{K} \rightarrow \mathbf{K}') = W_{REM}(x') \omega(\mathbf{K}' \rightarrow \mathbf{K})
\tag{5.14}$$

Eşitlik (5.1), (5.2), (5.8), (5.13), ve (5.14)' den

$$\begin{aligned}
\frac{W(\mathbf{K} \rightarrow \mathbf{K}')}{W(\mathbf{K}' \rightarrow \mathbf{K})} &= \exp \left\{ \begin{aligned} & -\beta_m \left[ K \mathbf{v}^+ + E \mathbf{v}^- \right] - \beta_n \left[ K \mathbf{v}^+ + E \mathbf{v}^- \right] \\ & + \beta_m \left[ K \mathbf{v}^- + E \mathbf{v}^+ \right] + \beta_n \left[ K \mathbf{v}^- + E \mathbf{v}^+ \right] \end{aligned} \right\} \\
&= \exp \left\{ \begin{aligned} & \beta_m \frac{T_m}{T_n} K \mathbf{v}^- - \beta_n \frac{T_n}{T_m} K \mathbf{v}^+ + \beta_m K \mathbf{v}^- + \beta_n K \mathbf{v}^- \\ & - \beta_m \left[ E \mathbf{v}^- \right] - E \mathbf{v}^- - \beta_n \left[ E \mathbf{v}^- \right] - E \mathbf{v}^- \end{aligned} \right\} \\
&= \exp(-\Delta)
\end{aligned}
\tag{5.15}$$

elde edilir. Burada  $\Delta$ , aşağıdaki gibidir.

$$\Delta \equiv \beta_n - \beta_m \left[ E \mathbf{v}^- \right] - E \mathbf{v}^-
\tag{5.16}$$

i, j, m ve n indisleri

$$i=f(m), \quad j=f(n)
\tag{5.17}$$

değiş tokuşundan önce Eşitlik (5.5)' deki permütasyon fonksiyonları ile ilişkilendirilir.

Örneğin, bu durum yaygın olarak Metropolis kriteri tarafından sağlanabilir:

$$\omega(X) \rightarrow X' \equiv \omega \left( \prod_m x_n \right) \equiv \begin{cases} 1, & \text{for } \Delta \leq 0 \\ \exp(-\Delta) & , \text{for } \Delta > 0 \end{cases} \quad (5.18)$$

Genelliği kaybetmeden  $\beta_1 < \beta_2 \dots < \beta_M$  olduğunu farz edelim. Bir REM simülasyon aşağıdaki iki adım uygulanarak yapılır:

- (1) Sabit sıcaklıkta kanonik topluluktaki her replica için eş zamanlı ve bağımsız olarak bir MD adım yapılır.
- (2) Komşu sıcaklıklardaki bir replica çifti  $x_m$  ve  $x_{m+1}$  Eşitlik (5.18)' deki  $\omega \left( \prod_m x_{m+1} \right)$  olasılıkla değiş tokuş edilir.

2. adımda yalnızca komşu sıcaklıklara ait replicaların değiş tokuş edildiğine dikkat edilmelidir. Çünkü iki  $\beta$  arasındaki fark arttıkça değiş tokuş olasılığı üstselsel olarak azalır. Ayrıca her ne zaman replica değiş tokuşu kabul edilirse Eşitlik (5.5)' deki permütasyon fonksiyonları güncellenir (update) (Sugita and Okamoto 1999).





## BÖLÜM 6

### SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI

#### 6.1 GİRİŞ

Tez çalışması kapsamında incelenen peptidler, gıda zehirlenmelerine sebep olan Staphylococcal enterotoxin B (SEB) toksinlerinin saptanmasında biyosensör olarak kullanılabilirlikleri olan peptidlerdir ve aminoasit dizilimleri aşağıda verilmiştir.

PeptidI	Trp-Ala-Pro-Pro-Leu-Phe-Arg(+)-Ser-Ser-Leu-Phe-Tyr
PeptidII	Leu-Leu-Ala-Asp(-)-Thr-Thr-His-His-Arg(+)-Pro-Trp-Thr
PeptidIII	Leu-Gln-Gly-Phe-Trp-Gln-Thr-Asp(-)-Ala-Ser-Tyr-Arg(+)

Bu dizilimlerin her birinin birbiri ucuna bağlanmasıyla elde edilmiş ikili ve üçlü tekrarlı yapıları da aynı amaçlar doğrultusunda incelenmiş ve bulunan sonuçlar ileride Bölüm 6.4-5'te bir arada verilmiştir. Bundan sonra kolaylık açısından, yukarıdaki peptid dizilimleri “*tekli*”, diğerleri ise sırasıyla “*ikili*” ve “*üçlü*” dizilimler adlarıyla anılacaktır.

Tüm peptid dizilimlerinin başlangıç yapıları açık formundan başlatılarak simülasyon çalışmaları yapılmıştır ve simülasyonlarda hiçbir deneysel başlangıç verisi kullanılmamıştır. Bundan dolayı her bir simülasyon çalışması için optimum bir başlangıç yapısı elde etmek amacıyla ayrıntıları ileride sunulmuş bir takım protokoller uygulanmıştır.

Çalışmamızda yapılan tüm MD ve REMD simülasyon işlemleri ve analizleri için Gromacs programı kullanılmıştır. “Groningen Machine for Chemical Simulations” kelimelerinin kısaltmasından oluşan Gromacs (van der Spoel et al. 2005) (Gromacs, <http://www.gromacs.org>) ilk olarak Groningen Üniversitesi'nin Biyofiziksel Kimya bölümü tarafından geliştirilen açık kaynak kodlu bir yazılım paketidir. Gromacs projesi aslında 1990'ların başında halka mimarisine dayanan moleküler simülasyonlar için paralel bilgisayar

sistemi oluşturmak amacıyla dizayn edilmiştir. Gromacs protein, lipit, polimer gibi biyomolekülleri simüle etmeye yarayan bir programdır. Birçok sistem üzerinde derlenebilir ve standart mesaj geçiş ara yüzü (MPI) kullanılarak paralel olarak çalıştırılabilir. Bununla birlikte Gromacs birden fazla kuvvet alanını destekler ve açık kaynak kodlu doğasından dolayı oldukça esnek bir programdır.

Anlaşılır bir sunuş olması açısından, tüm peptid dizilimlerinin tekli formlarının MD ve REMD simülasyon sonuçları ve PeptidII' nin ikili ve üçlü, PeptidIII' ün ise ikili formunun MD ve REMD simülasyon sonuçları ayrı bölümler halinde sunulmuştur.

## 6.2 TEKLİ PEPTİD DİZİLİMLERİNİN MD SİMÜLASYONLARI

### 6.2.1 Metot

Öncelikle, her bir peptidin başlangıç yapıları “TINKER” modelleme programı (Humphrey et al. 1996) kullanılarak, düz bir zincir şeklinde oluşturulmuştur. Oluşturulan bu başlangıç yapılarından yola çıkarak sırasıyla vakum ve çözücü ortamında olmak üzere iki aşamalı MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Vakum ortamındaki simülasyon sonucu elde edilen yapılar, ortama çözücü eklenerek yapılan simülasyon aşamasında başlangıç yapısı olarak kullanılmıştır. Böylelikle MD simülasyonlarının başlangıç yapısının daha optimize yapılardan başlaması sağlanmaya çalışılmıştır.

Peptidlerin hem vakum hem de çözücü içeren ortamlardaki simülasyonları, NPT kümesi (parçacık sayısı, basınç ve sıcaklık sabit: “isobaric-isothermal ensemble”) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri hesaplamak için kullanılan kuvvet alanı (force field), OPLS-AA/L (Jorgensen and Severance 1990) olarak seçilmiştir. Biyomolekülleri oluşturan atomların hızları  $T = 300$  K için, Maxwell Boltzman hız dağılım fonksiyonu ile belirlenmiştir. Moleküler dinamik simülasyonlarında atomların konumlarının ve hızlarının belirlenmesi için standart Verlet (Verlet 1967) algoritması kullanılmış ve moleküler dinamik zaman adımı 2 fs olarak seçilmiştir. Periyodik sınır koşullarını kullanabilmek ve sistemin büyüklüğünü sınırlamak için incelenen yapılar bir simülasyon kutusuna yerleştirilmiştir. Bu sayede sadece kutu içerisindeki kuvvetlerin hesaplanması sağlanmıştır. Simülasyon kutusunun şekli ve büyüklüğü simülasyon zamanını önemli ölçüde etkileyeceğinden kutunun boyutları minimum olacak şekilde belirlenmiştir.

## 6.2.2 Simülasyon Detayları

Simülasyon çalışmasına vakum ortamından başlanılmıştır. Tinker moleküler modelleme paketi kullanılarak oluşturulan peptidlerin basit yapıları, boyutları  $3 \times 3 \times 3 \text{ nm}^3$  olan kübik simülasyon kutusunun merkezine yerleştirilmiştir. Simülasyon kutusuna yerleştirilen yapılar sahip oldukları yüksek enerjiden dolayı kararlı durumda olamayacaklarından enerji minimizasyonu işlemine tabi tutulmuşlardır. Enerji minimizasyonundaki amaç, tüm kinetik enerjiyi sistemden atıp yapıdaki termal gürültüyü azaltırken, sistemin potansiyel enerjisinde de bir azalma olmasını sağlamaktır. Bu minimizasyonlarda, her peptid sisteminin yakın van der Waals temaslarını yok etmek için yerel tarama tekniklerinden sırasıyla ‘Steepest Descent’ ve ‘Conjugate Gradient’ algoritmaları kullanılmış, enerji gradyenti  $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  olarak seçilmiş ve işlemler 1000 adımda tamamlanmıştır.

Simülasyon çalışmalarında, başlangıç şartları sistemin faz uzayındaki beklenen yörünge konumu civarında bulunamayabilir. Sistemin istenilen enerji değerine (faz uzayındaki yörüngesine) ayarlanması, sisteme enerji vererek veya sistemden enerji alarak sağlanabilir. Enerji verme veya alma işlemi genellikle, termostat parametresi olarak adlandırılan bir değerle atom hızlarının çarpılmasıyla sağlanır. Bu işlemin yapıldığı süreç, moleküler dinamikte dengeleme süreci veya termalizasyon olarak adlandırılır ve bu bölgedeki sisteme Dengeleme Fazı denilir (Haile 1992). Bu doğrultuda, sistemin enerji minimizasyonunun ardından termalizasyon adımına geçilmiştir. 200 ps’lik termalizasyon sürecinde sıcaklık kontrolü Nose-Hoover termostatı kullanılarak sağlanmış ve çiftlenim parametresi 0.1 ps olarak ayarlanmıştır. Bu termalizasyon adımı sonrasında da vakum ortamında simülasyon çalışmasının ürün aşamasına geçilmiştir.

Vakum ortamında yapılan 1000 ps’lik ürün simülasyonu aşamalarında, sıcaklık, v-rescale termostatı seçilerek kontrol edilmiştir. Bu sırada çiftlenim sabiti 0.1 ps olarak ayarlanmıştır. ‘Simulating Annealing’ algoritması yardımıyla biyomoleküllerin sıcaklığı aniden 1000 K çıkarılıp aşama aşama 300K’e kadar düşürülmüştür. Bu sayede oluşturulan tüm konformasyonların birbirleri ile korelasyonuna bakılarak birbirlerinden farklı ya da benzer konformasyon kümeleri oluşturulmaya çalışılmış ve vakum ortamındaki bu yapılardan en olası konformasyon seçilmiştir.

Vakum ortamında belirlenen bu en olası konformasyon, simülasyon kutusunda bırakılarak ortam SPC/216 su modeli kullanarak tamamen çözücü ile doldurulmuş ve çözücü ortam varlığında simülasyonlara başlanmıştır. PeptidI, PeptidII ve PeptidIII için simülasyon kutusuna doldurulan su molekülü sayıları sırasıyla 2303, 2053 ve 2112 tanedir. Peptid+çözücü bileşik sisteminin simülasyonlarında ise aşağıdaki protokol aşamaları izlenmiştir.

Kutu içerisindeki yapıların atomları ile simülasyon kutusu arasındaki uzaklık minimum 1nm olarak belirlenmiştir. Her bir peptid için atomlar arası elektrostatik etkileşimler için gerçek uzay kesme mesafesi (cut-off,  $r_{cut}$ ) 0.9 nm olarak alınmış ve Particle Mesh Ewald (PME) (Darden et al 1993) yöntemi kullanılmıştır. PME gereği yüklü olan PeptidI'i nötralize etmek için suya bir Cl iyonu eklenmiştir. Lennard Jones etkileşimleri  $r_{cut} = 1.4$  nm' lik 'cut-off' yaklaşımı ile hesaplanmış ve bağ uzunlukları Lincs algoritması kullanılarak sınırlandırılmıştır.

Peptid+su bileşik sisteminde hidrojen ve kırılmış hidrojen bağlarının olması çok büyük kuvvetlerin oluşmasına ve aynı zamanda yapının bozulmasına neden olduğundan, bu kuvvetleri sistemden çıkarmak gerekmektedir. Bu işlem enerji minimizasyonu adımı ile sağlanmıştır. Bu bileşik sistemde de aynı vakum ortamında olduğu gibi  $100 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-1}$  enerji gradyenti ile sırasıyla 'Steepest Descent' ve 'Conjugate Gradient' algoritmaları kullanılarak minimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve takiben termalizasyon adımına geçilmiştir.

Termalizasyon adımı yapılırken sisteme konum sınırlandırılması yapılmıştır. Konum sınırlaması (position restrain) sabit pozisyonda tutulan özelleşmiş atomların harmonik etkileşimleridir. Çözücü eklenen sistemimizde konum sınırlaması ile su moleküllerinin simülasyon kutusu içerisinde serbestçe dolaşmasına imkan verilirken atom pozisyonlarını da sınırlandırılarak, makromoleküllerin içinin su ile kaplanması sağlanmıştır. Simülasyonun bu aşamasında suyun gevşeme zamanı da göz önünde tutularak 200 ps' lik bir termalizasyon işlemi yapılmıştır. Sıcaklık ve basınç ise sırasıyla v-rescale (Bussi et al. 2007) ve Berendsen (Berendsen et al. 1984) termostatları ile kontrol edilmiştir.

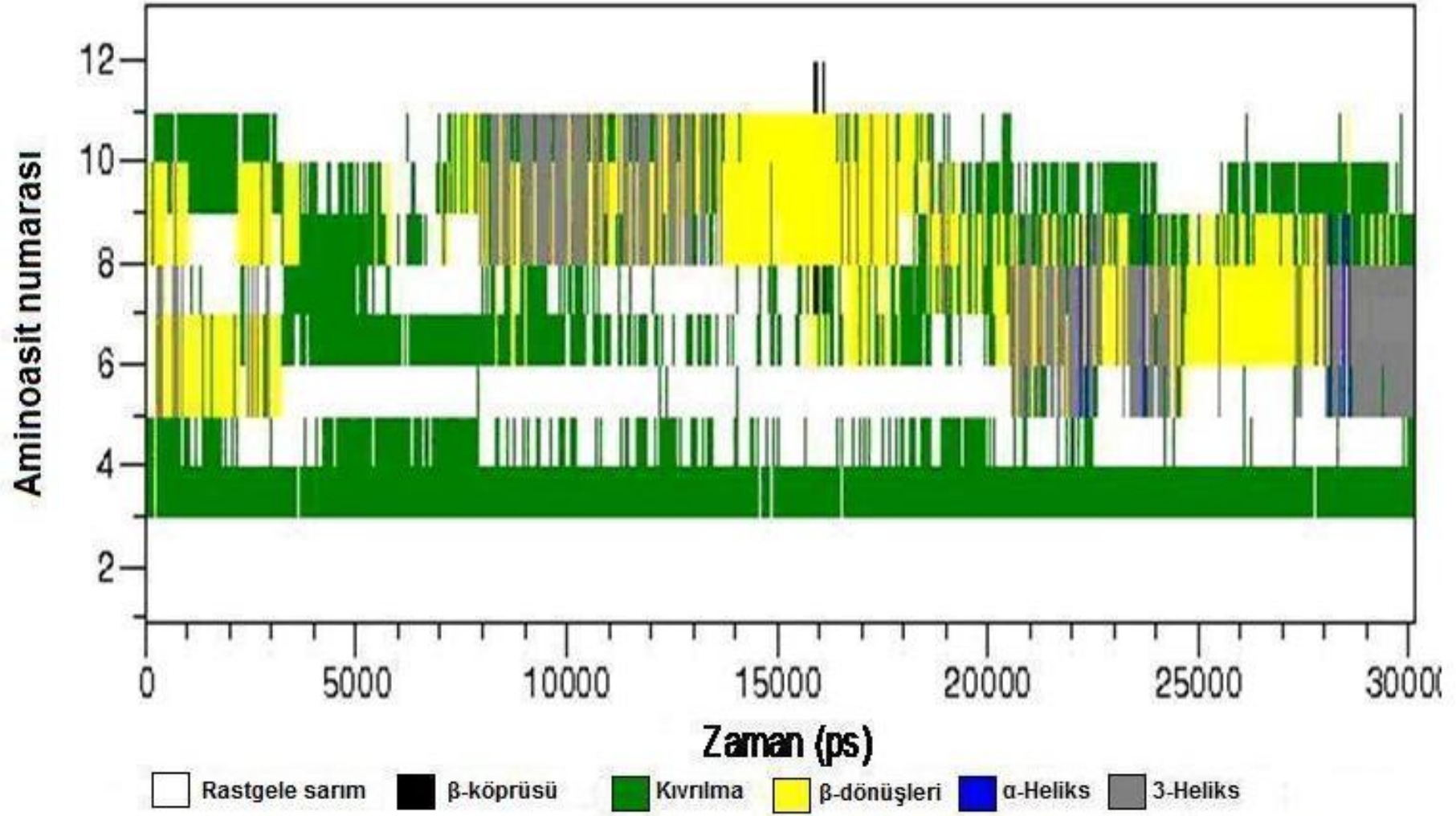
Vakum ve çözücü ortamdaki bu simülasyonlardan sonra seçilen konformasyonlar için oda sıcaklığında ve 1 atm sabit basınç altında ürün simülasyonu aşamasına geçilmiştir. Bu aşamalarda 2 fs zaman adımı kullanılmış, sıcaklık termostatu v-rescale, basınç termostatu ise

Parrinello–Rahman (Parrinello and Rahman 1981) olarak seçilmiştir. Sıcaklık ve Basınç çiftlenim sabitleri ise sırasıyla 0.1 ps ve 0.5 ps olarak ayarlanmıştır. 30 ns' lik ürün aşamalarının sonucunda elde edilen yapılar analiz edilerek yorumlanmıştır. İkincil yapı analizlerinde DSSP (Kabsch and Sander 1983) “İkincil yapı Analiz Programı” kullanılmıştır.

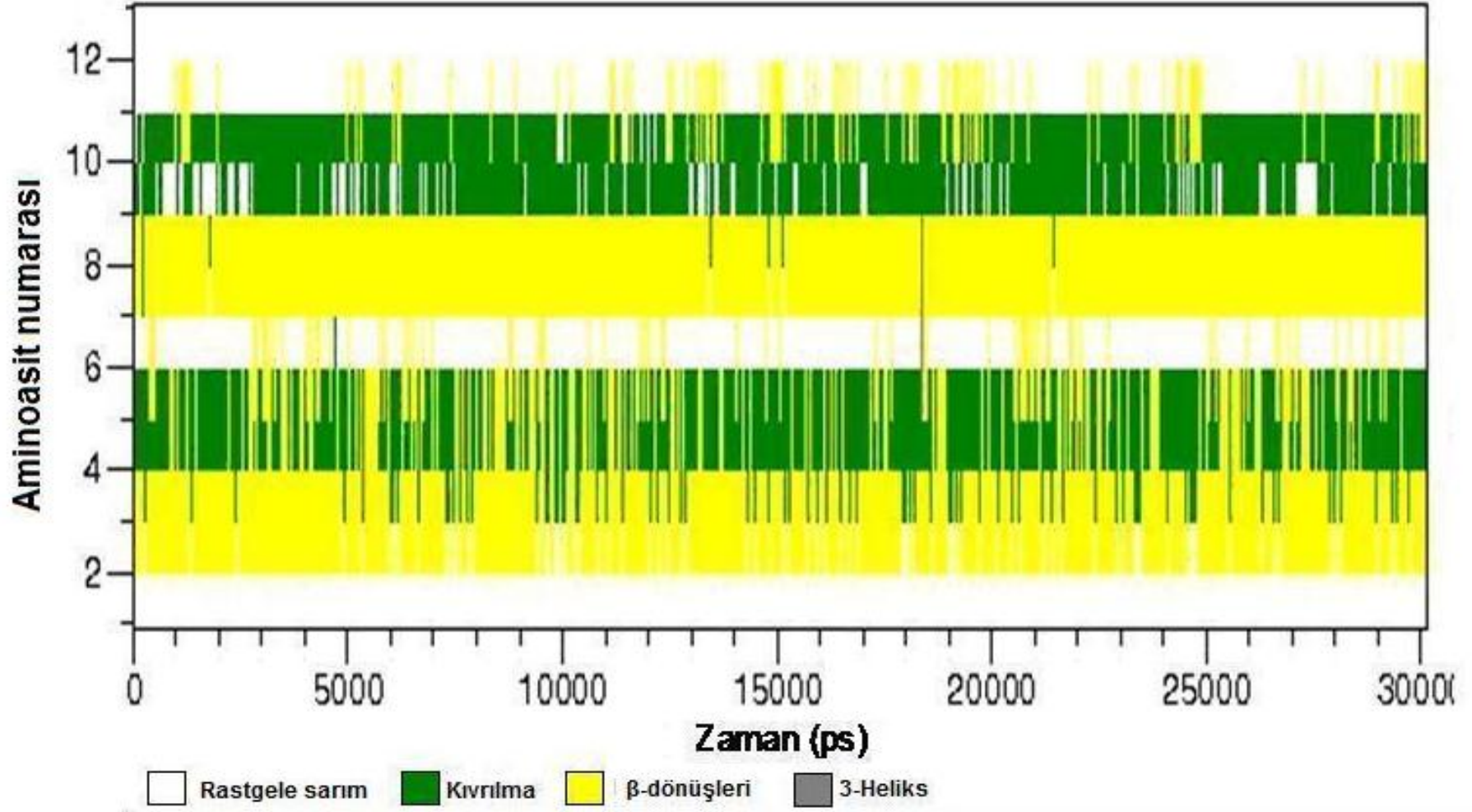
### 6.2.3 Sonuç ve Analizler

Detayları Bölüm 6.2.2' de anlatılan protokoller uygulandıktan sonra, ürün aşamasında elde edilen ve her zaman adımı için kaydedilen yörünge dosyaları kullanılarak, peptid konformasyonlarının ikincil yapıları belirlenmiş ve bu yapılar sırasıyla Şekil 6.1-3' de verilmiştir. Şekillerde düşey eksendeki sayılar peptid dizilimindeki aminoasit birimlerinin sıra numarasını vermektedir. Şekillerde görülen renklerin hangi ikincil yapıya karşılık geldiği ise altlarındaki renk kutucuklarında ifade edilmiştir. Buna göre beyaz renk *rastgele sarım* (random coil), siyah renk  *$\beta$ -köprüsü* (beta bridge), yeşil renk *kıvrımlar* (bend), sarı renk  *$\beta$ - dönüşleri* (turn), mavi renk  *$\alpha$ -heliks* ( $\alpha$ -helix), gri renk *3-heliks* (3-helix) ve kırmızı renk ise  *$\beta$ -yaprağı* (beta sheet) yapılarına karşılık gelmektedir.

Her üç şekilden de açıkça görüldüğü üzere, simülasyon zamanı süresince incelenen peptidlerin hepsinde ilk ve son aminoasitler rastgele sarım yapı göstermektedir. Bu terminal aminoasitlerin zwitter-iyon forma sahip olmalarından dolayı beklenen bir durumdur.

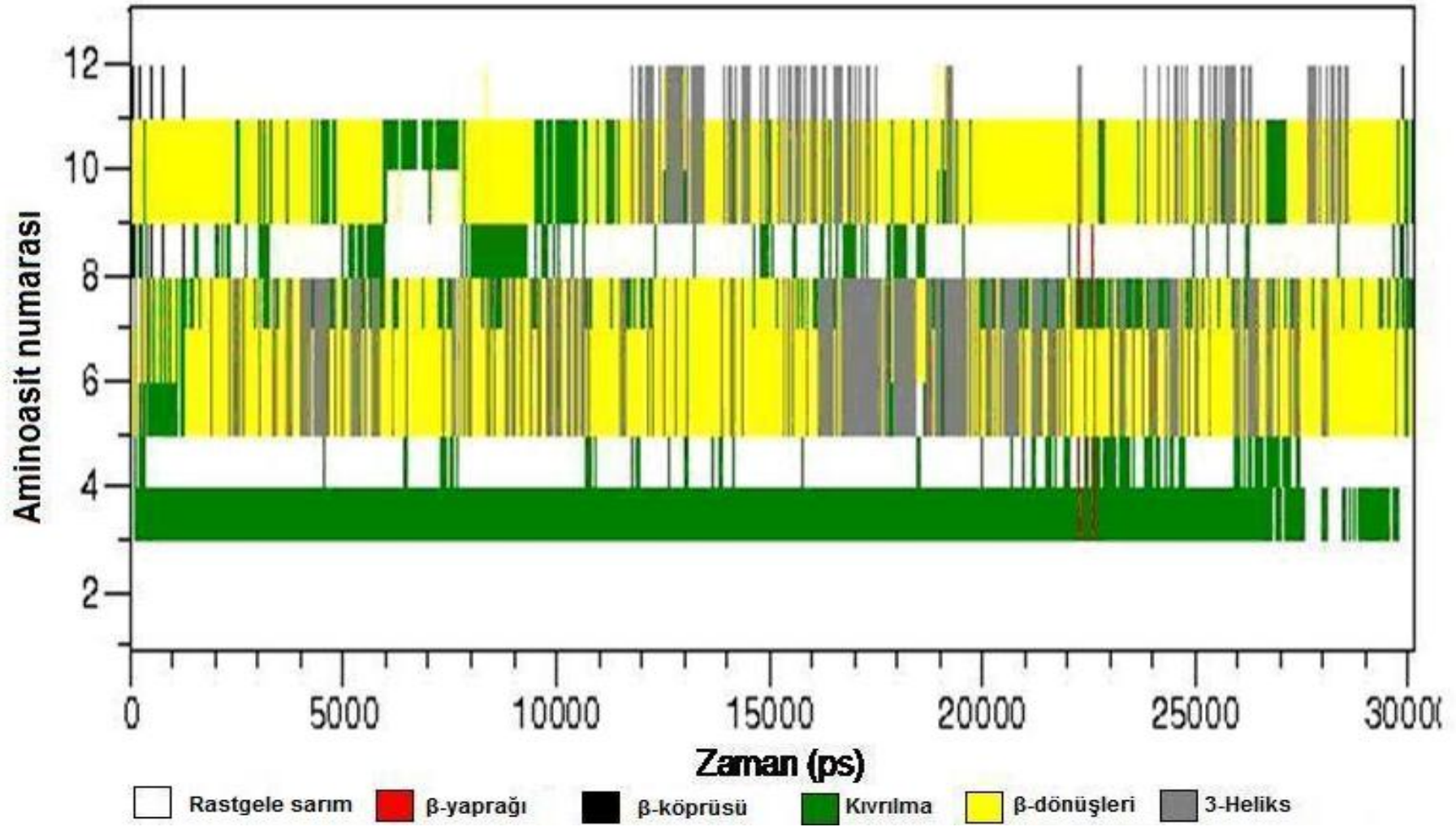


Şekil 6.1 PeptidI için zamana göre ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.2 PeptidII için zamana göre ikincil yapı değişimi.





Şekil 6.3 PeptidIII için zamana göre ikincil yapı değişimi.

Öncelikli olarak Şekil 6.1' e bakıldığında, PeptidI' in, ilk ve son aminoasitlerinde görülen rastgele sarım yapı dışında, 3. aminoasit civarında kıvrılma yapısı yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı peptidin orta bölgelerinde bulunan aminoasitlerin, simülasyon boyunca daha kararsız yapıda olduğu söylenebilir. Orta bölgedeki bu az kararlılığın aksine, kıvrılma yapılarının daha kararlı olması, PeptidI' in 3. ve 4. segmentlerinde içerdiği proline aminoasitlerinden kaynaklanabilir. PeptidI' in orta bölgesinde (5-10 segmentler) başlıca gözlenen yapılar beta dönüşleri ve rastgele sarım yapılarıdır. Bu yapıların dışında ilk 3 ns süresince yine orta bölgede 3-heliks yapı da gözlenmektedir. Daha sonra bu yapı yerini kıvrılma ve rastgele sarım yapılar bırakmaktadır ve simülasyonun sonlarında 5-7 segmentlerinin tekrar tümüyle 3-Heliks yapıya büründüğü görülmektedir. Simülasyonun 7-14 ns aralığında, 8-10 segmentlerinde çoğunlukla 3-Heliks yapı mevcutken bu aminoasitler 14-19 ns aralığında beta dönüşleri yapısı göstermeye başlamışlardır. Diğer taraftan 19 ns' den sonra 9-10 aminoasitlerinde kıvrılma ve rastgele sarım yapılar yaygınken, 5-8 aminoasitlerinde beta dönüşleri ve 3-Heliks yapılar kendilerini göstermektedir.

Şekil 6.2' de gösterilen ikincil yapılardan, PeptidII' nin tüm simülasyon süresince 1, 6, 11 ve 12 numaralı aminoasitlerinde bütünüyle rastgele sarım yapılar sergilediği görülmektedir. Bunun yanı sıra leucine ve alanine aminoasitlerine sahip 2-3 segmentleri ve histidine aminoasitlerine sahip 7-8 segmentlerinde beta dönüşleri yapıları ortaya çıkarken, 9-10 segmentlerinde genelde kıvrılma yapıları bulunmaktadır. Simülasyonun başlangıcında 4-5 segmentlerinde kıvrılma yapıları baskınken, ilerleyen süreçte bu baskınlık kaybolmuş ve bu segmentlerde karışık olarak beta dönüşleri ve kıvrılma yapıları gözlenmeye başlanmıştır.

Şekil 6.3' de gösterilmiş olan PeptidIII' ün sahip olduğu olası ikincil yapılar incelendiğinde ise 1, 2, 4, 11 ve 12 nolu aminoasitlerin çoğunlukla rastgele sarım yapılar sergilediği gözlenmektedir. 3. aminoasitin tüm simülasyon boyunca kıvrılma yapısında kaldığı gözlenirken, 5-7 ve 9-10 segmentlerinde ise karışık olarak beta dönüşleri, 3-Heliks ve kıvrılma yapılar görülmektedir. Şekilden PeptidIII' ün sahip olduğu beta dönüşleri yapılarını oranının, 3-Heliks ve kıvrılma yapılarınınkinden daha fazla olduğu görülmektedir. Simülasyonun başlangıcında 8 ve 11 aminoasitlerinde  $\beta$ -köprüsü yapıları gözlenirken, bu yapılar 1.5 ns' den sonra 8. aminoasitin hızlıca rastgele sarım-kıvrılma ve 11. aminoasitin ise rastgele sarım-3-Heliks yapılarla yer değiştirdiği görülmüştür. Diğer taraftan 21 ns' den sonra 3-4 ve 7-8 segmentlerinde çok az miktarda olmakla beraber  $\beta$ -yaprağı, 3 ve 8 aminoasitlerde ise  $\beta$ -köprüsü yapılarına rastlanmaktadır.

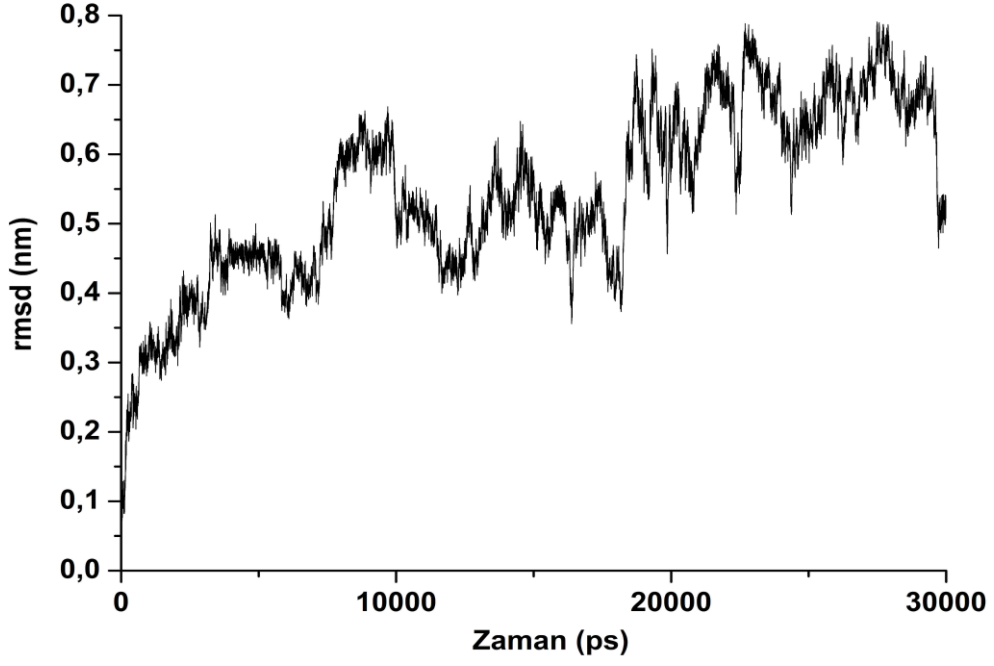
Peptidlerin simülasyon süresince başlangıç konumlarından ne kadar uzaklaştıklarını takip etmek ve ikincil yapı değişimlerini daha net anlayabilmek için her bir peptidin başlangıç konformasyonlarındaki atomlarının konum değerleri ile zamana bağlı olarak konum değerlerine göre kare ortalama karekök yer değiştirme (RMSD) grafikleri çizilmiştir (Şekil 6.4-6). Bu şekillerden her bir peptid için RMSD değerlerinin kendi içinde farklı dalgalanmalar sergilediği görülmektedir. RMSD değerlerinde gözlenen farklı dalgalanmalar ilgili peptid diziliminin ikincil yapılarındaki köklü değişimlerden kaynaklanmaktadır. Bu değerler yukarıda sunulan ikincil yapı değişimlerinin verildiği şekillerle karşılaştırıldığında yapısal değişimler ve bunların gerçekleştiği zaman aralıkları daha iyi değerlendirilebilmektedir.

Şekil 6.4 incelendiğinde, ilk 20000 ps lık zaman diliminde yüksek dalgalanmaların olduğu, bu zamandan sonra dalgalanmaların azalarak yapının daha kararlı hale ulaştığı görülmektedir. Bu durum PeptidI için Şekil 6.1’ de verilen ikincil yapıların zamanla değişimlerine bakıldığında daha net anlaşılmaktadır.

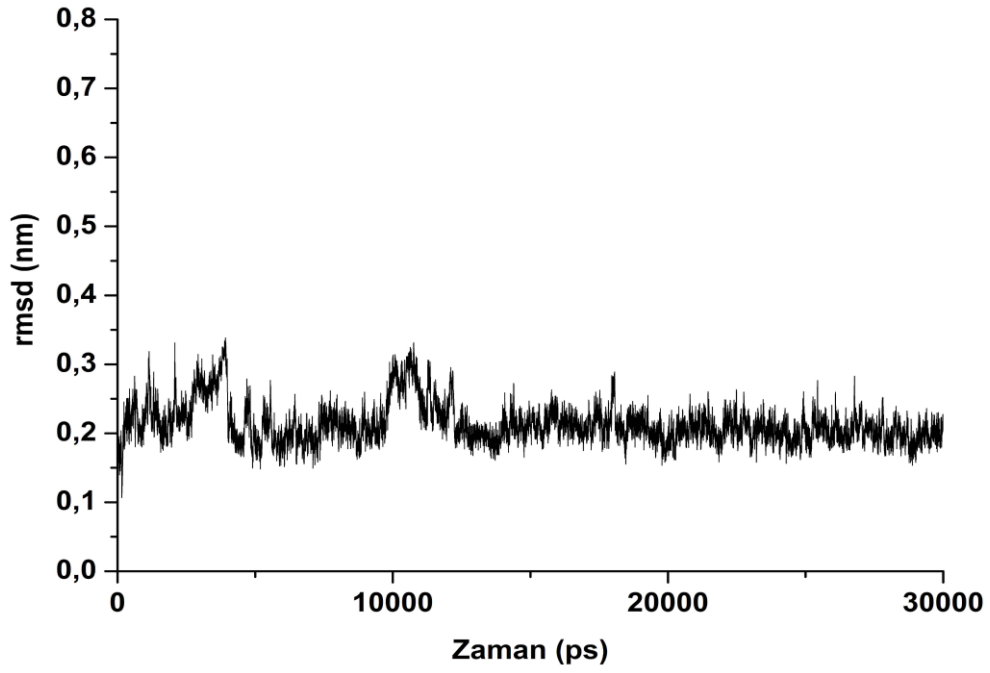
PeptidII için RMSD değerlerinin değişimi incelendiğinde ise (Şekil 6.5) PeptidI’ e kıyasla çok daha az bir dalgalanmanın olduğu görülmektedir. Yaklaşık olarak ilk 14000 ps’ den sonra 0.2 nm civarında olan bu dalgalanmalar, simülasyon süresince PeptidII’ nin PeptidI’ e göre daha kararlı yapılar sergilediğini göstermektedir. Bu durum ikincil yapı değişimlerinde de açıkça görülmektedir (Şekil 6.2).

Şekil 6.6’ da ise PeptidIII için RMSD değerlerinin zamanla değişimi verilmektedir. Değişim incelendiğinde yine ilk 12000 ps’ lık zaman diliminden sonra daha kararlı bir yapıya ulaşıldığı görülmektedir. PeptidIII için Şekil 6.3’ te verilen ikincil yapı değişimi incelendiğinde de yaklaşık aynı simülasyon zamanından sonra heliks yapının ortaya çıkışıyla birlikte yapının kararlılık gösterdiği gözlenmektedir.

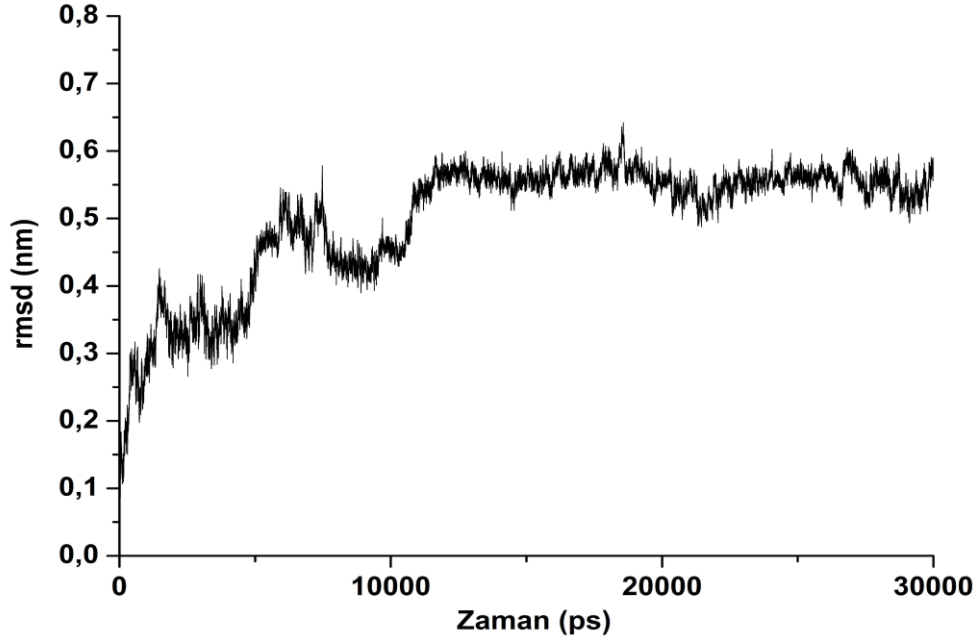
Her üç peptid dizilimi için klasik MD simülasyonu yapılarak elde edilmiş bu sonuçlar, kolabratörlerimizin aynı şartlarda geçmişte elde ettiği sonuçlarla uyumaktadır (Oğuz 2011). Ayrıca yukarıda sunulan sonuçlar kolabratörlerimiz tarafından yorumlanarak, deneysel sonuçlarla karşılaştırılmış ve aralarındaki uyumlar yorumlanarak literatürde yayımlanmıştır (Dudak et al. 2010). Çalışmamızda, daha çok REMD simülasyonlarının değerlendirilmesi ve REMD ile klasik MD simülasyonlarının karşılaştırması üzerinde durulacağından, klasik MD ile elde ettiğimiz bu sonuçları da sunma yoluna gidilmiştir.



Şekil 6.4 PeptidI için zamana bağlı kare ortalama karekök yer değıştirme.



Şekil 6.5 PeptidII için zamana bağlı kare ortalama karekök yer değıştirme.



Şekil 6.6 PeptidIII için zamana bağlı kare ortalama karekök yer değıştirme.

Her üç peptidin simülasyon zamanı boyunca sahip oldukları ikincil yapı yüzdeleri tüm yörünge dosyaları üzerinden hesaplanmış ve Çizelge 6.1’ de bir arada verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, PeptidI ve PeptidIII’ ün büyük oranda rastgele sarım yapılar, PeptidII’ nin ise beta dönüşü yapıları gösterdiği görülmektedir. Ayrıca diğer peptidlere oranla heliks yapıya en az miktarda PeptidII sahipken, bu peptidin en yüksek oranda kıvrılma ve beta dönüşleri yapılarına sahip olduğu da gözlenmektedir.

Çizelge 6.1 Peptidlerin ikincil yapı yüzdeleri.

	<b>Rastgele Sarım (%)</b>	<b>Kıvrılma (%)</b>	<b><math>\beta</math>-dönüşleri (%)</b>	<b>Heliks (%)</b>	<b><math>\beta</math>-Köprüsü (%)</b>	<b><math>\beta</math>-Yaprağı (%)</b>
PeptidI	55.5	23.1	12.0	8.67	0.12	-
PeptidII	34.0	26.1	39.8	0.14	-	-
PeptidIII	46.2	15.6	23.2	14.4	0.30	0.19

Peptidlerin ikincil yapılarının belirlendiği DSSP protokolü hidrojen bağ tanımlamaya dayalı olduğu için her peptidin konformasyonel yapılarına hidrojen bağ etkisini araştırmak amacıyla molekülün kendi içinde yapmış olduğu hidrojen bağ sayılarının aminoasitlere göre dağılımları da elde edilmiştir. Bu hesaplamalarda, hidrojen ve alıcı arasındaki uzaklık 0.35 nm’ den daha

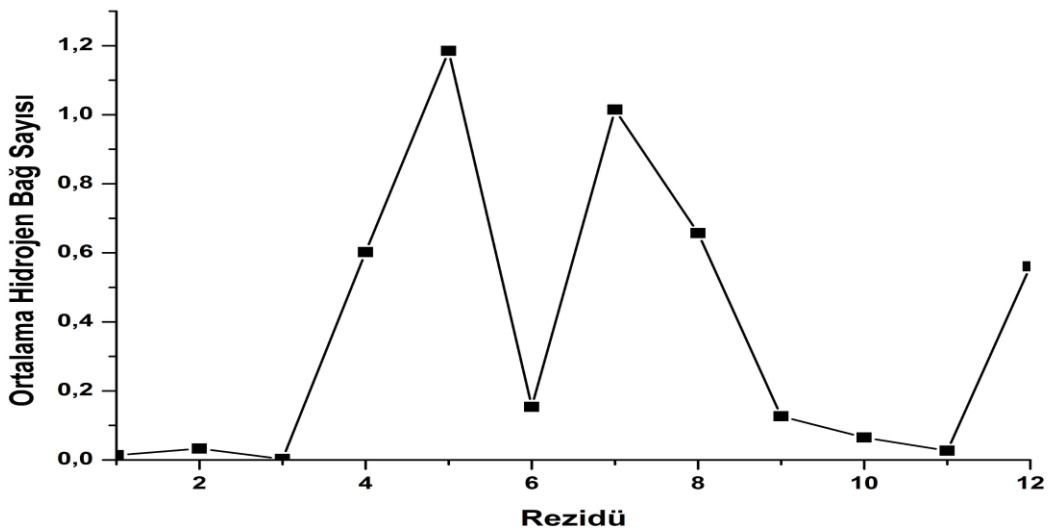
az ve hidrojen, alıcı ve verici arasındaki açı  $30^{\circ}$  den daha küçük olduğu durumlarda hidrojen bağlarının oluşacağı öngörülmüştür.

PeptidI' in molekül içinde yaptığı hidrojen bağ sayısının aminoasitlere göre dağılımına Şekil 6.7' den bakıldığında, 5. aminoasitte (Leu) hidrojen bağ sayısının maksimum bir değere ulaştığı ve 6. aminoasitte önemli bir düşüş yapıp 7. aminoasitte tekrar arttığı görülmektedir. Ayrıca 1, 2, 3 ve 11. aminoasitlerinin çok az sayıda hidrojen bağına sahip oldukları da şekilden görülmektedir.

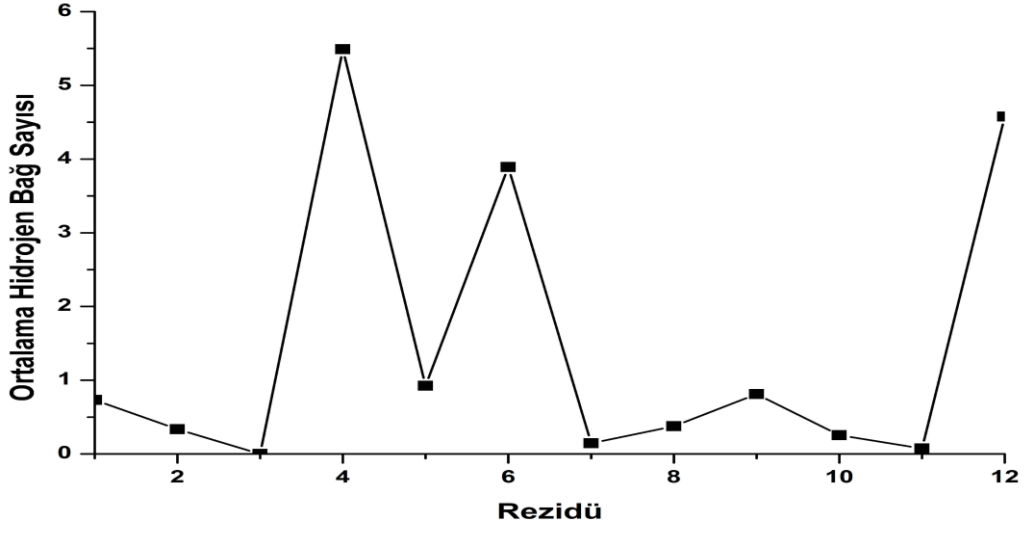
Şekil 6.8' de ise PeptidII için de 4. aminoasitte bir maksimum olduğu ve bu aminoasitten sonra 5. aminoasitte önemli bir azalışla birlikte 6. aminoasitte tekrar keskin bir artış olduğu görülmektedir. Ayrıca 3., 7. ve 11. aminoasitlerde çok az sayıda hidrojen bağı görülürken 12. aminoasitiyle birlikte önemli bir artış olduğu gözlenmektedir.

PeptidIII için molekül içi hidrojen bağ sayısına bakıldığında ise 8. aminoasitte maksimum sayıya ulaşıldığı ve 1, 3, 6, 9 ve 11. aminoasitlerde ise görece olarak çok az sayıda hidrojen bağına sahip oldukları Şekil 6.9' dan görülmektedir.

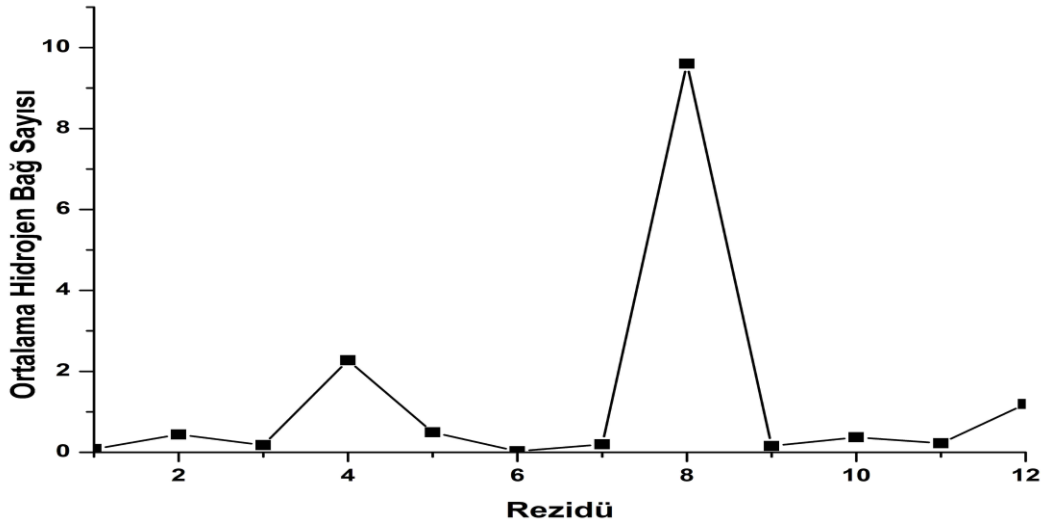
Şekillerden, daha çok sayıda hidrojen bağının olduğu aminoasitlerin yüklü aminoasitler, özellikle Asp (-) olduğu söylenebilirken, diğer aminoasitler için ise genel bir davranış biçimi olmadığı ve komşu aminoasitler etkisi altında farklı eğilimler gösterdiği söylenebilir.



Şekil 6.7 PeptidI için molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı.



Şekil 6.8 PeptidII için molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı.



Şekil 6.9 PeptidIII için molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı.

## 6.3 TEKLİ PEPTİD DİZİLİMLERİNİN REMD SİMÜLASYONLARI

### 6.3.1 Metot

Klasik MD simülasyonlarında karşılaşılan yerel minimumlara takılabilme problemlerinden dolayı çalışmamızın bu kısmında PeptidI, II ve III için 280-501 K sıcaklık aralığında 52 farklı kopya (replica) ile REMD simülasyonlar yapılmıştır. Tüm peptidlerin başlangıç yapıları yine TINKER programı kullanılarak oluşturulmuştur. MD simülasyonlar N terminali  $\text{NH}_3^+$  ve C terminali  $\text{COO}^-$  seçilerek açık (extended) yapılarından başlatılmıştır. Tüm simülasyonlar GROMACS (van der Spoel et al. 2005) paket programı kullanılarak yapılmış ve enerjileri hesaplamakta OPLS-AA kuvvet alanı (force field) (Jorgensen and Severance 1990) kullanılmıştır. Sistemi ele alırken NPT topluluk ve suyu temsil etmek için SPC (Berendsen et al. 1981) su modeli kullanılmıştır. Her peptid aşağıdaki gibi bir protokol uygulanmıştır.

Her peptid sistemi için yakın van der Waals temaslarını yok etmek amacıyla vakumda önce steepest descent ve ardından conjugate gradient algoritmaları kullanılarak enerji minimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra sistem yüksek bir sıcaklığa kadar ısıtılmış ve sonrasında vakumda bu yüksek sıcaklıktan oda sıcaklığına simulating annealing yapılarak soğutulmuştur. Elde edilen yapı suda çözülmüştür. Elde edilen yapıya termalizasyon uygulandıktan sonra kısa bir MD simülasyonla sistemin dengeye ulaşması sağlanmış ve sonrasında REMD simülasyonlara başlanmıştır. Sonuçlarda sunulan ikincil yapılar DSSP (Kabsch and Sander 1983) ikincil yapı analiz programı, üç boyutlu konformasyonların görsel sunumu ise VMD paket programı (Humphrey et al. 1996) kullanılarak elde edilmiştir.

### 6.3.2 Simülasyon Detayları

Her peptid dizilimlerimize,  $100 \text{ kJmol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$  enerji gradyenti elde etmek için, önce steepest descent ardından conjugate gradient ile vakumda enerji minimizasyonları yapılmıştır. Optimize edilen sistemler 100 ps de 1000 K sıcaklık altında simüle edilmiştir. Ardından sistem 200 ps zaman zarfında 1000 K den 300 K sıcaklığa simulating annealing ile soğutulmuştur.

Her peptid sisteminin vakum simülasyonundan elde edilen başlangıç yapıları, SPC su modeli kullanılarak çözülmüştür. Particle Mesh Ewald (PME) (Darden et al. 1993, Essmanm et al. 1995) metotta uzun erimli (long-range ) etkileşimleri betimlemek için bir 0.9 nm cut-off ve

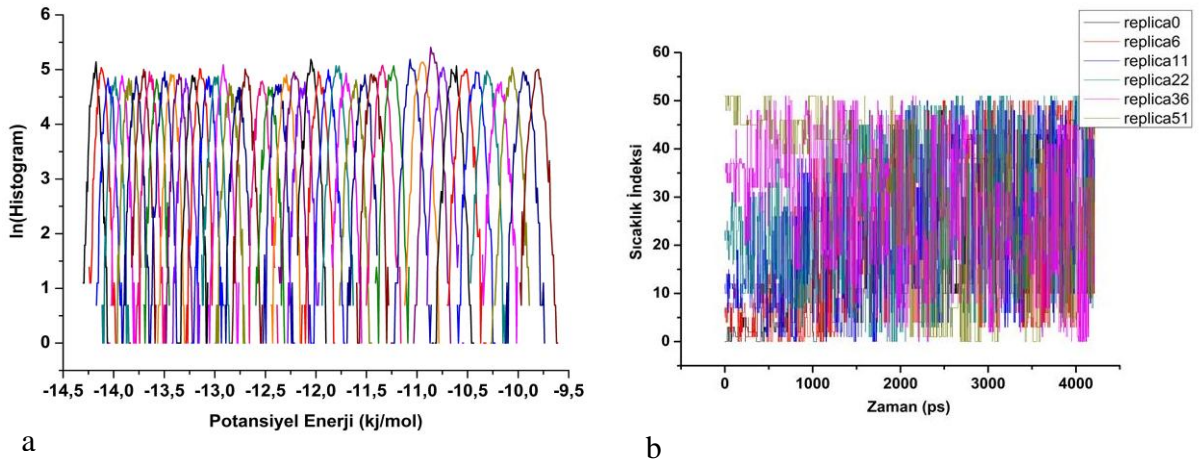


1.4 nm van der Waals cut-off yarıçapları kullanılmıştır. Peptidlerdeki kovalent bağları sınırlandırma işi LINCS (Hess et al. 1997) algoritması ile halledilmiştir. Periyodik sınır şartları uygulanmış ve PME gereği PeptidII'yi nötralize etmek için 1 Cl<sup>-</sup> iyonu genion programıyla çözelti ortamına eklenmiştir. Peptidteki herhangi bir atom ile simülasyon kutusu arasındaki minimum uzaklık 1 nm olarak sınırlandırılmıştır. Çözeltideki peptidlerin başlangıç yapısı 100 kJmol<sup>-1</sup>nm<sup>-1</sup> enerji gradyenti ile steepest descent sonra conjugate gradient ile minimize edilmiştir.

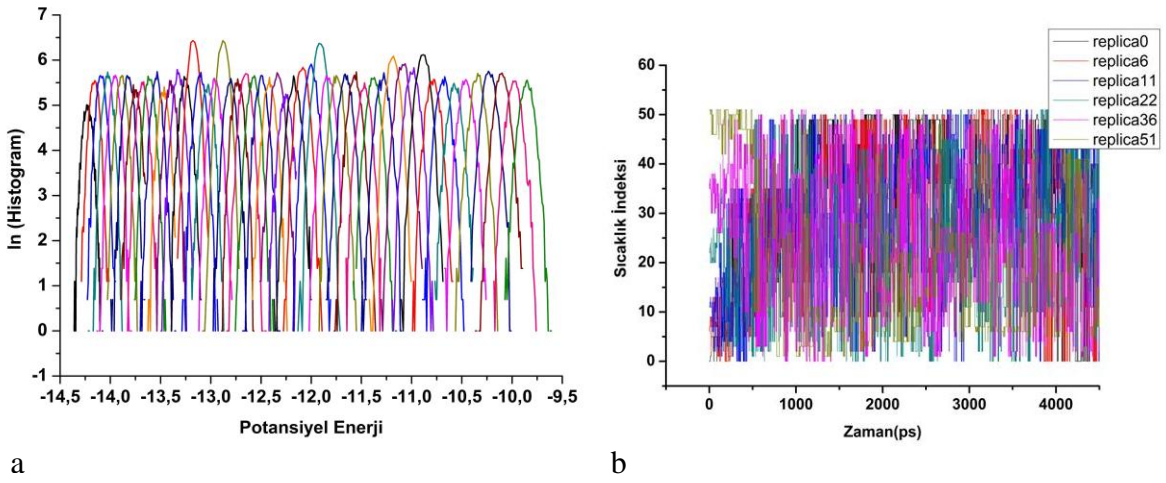
NPT toplulukta yapılan simülasyonlarda simülasyon boyunca çözelti 300 K ısı deposuyla ve 1 bar basınçlı basınç termostatıyla temas ettirilmiştir. Tüm simülasyonlar için toplam 400 ps termalizasyon yapılmıştır. Termalizasyon boyunca peptidin atomik konumları sabit tutulurken su moleküllerinin hareketine izin verilmiş ve bu aşamada sıcaklık ve basınç sırasıyla v-rescale (Bussi et al. 2007) ve Berendsen (Berendsen et al. 1984) termostatlarla kontrol edilmiştir. Termalizasyonun ardından 200 ps kısa MD simülasyonları yapılmıştır. Bu kısa MD simülasyonlarında ise sıcaklık ve basınç sırasıyla v-rescale (Bussi et al. 2007) ve Parrinello-Rahman (Parrinello and Rahman 1981) termostatlarıyla kontrol edilmiştir. Son olarak her peptid için 2fs zaman adımı kullanan toplam 4 ns'lik REMD simülasyonları yapılmıştır. Ürün simülasyonlarında sıcaklık ve basınç sırasıyla 0.1 ps ve 0.5 ps çiftlenim sabitleriyle v-rescale ve Berendsen (Berendsen et al. 1984) termostatlar kullanılarak kontrol edilmişlerdir. Kopyalar arasındaki değiş tokuşlar her 500 MD adımda bir 0.2 değiş-tokuş (exchange) olasılığı ile gerçekleştirilmiştir. Her üç peptid için kullanılan kopya sıcaklıkları, 280.03, 283.39, 286.83, 290.28, 293.28, 297.32, 300.88, 304.48, 308.11, 311.78, 315.49, 323.00, 326.81, 330.67, 334.55, 338.46, 342.42, 346.41, 350.44, 354.51, 358.61, 362.75, 366.93, 371.16, 375.42, 379.72, 384.08, 388.47, 392.90, 397.35, 401.86, 406.41, 411.01, 415.64, 420.32, 425.05, 429.83, 434.65, 439.51, 444.43, 449.38, 454.39, 459.44, 464.54, 469.69, 474.89, 480.14, 485.43, 490.78, 496.18 ve 501.63 K olarak belirlenmiştir (Patrikson and van der Spoel 2008).

### 6.3.3 Sonuç ve Analizler

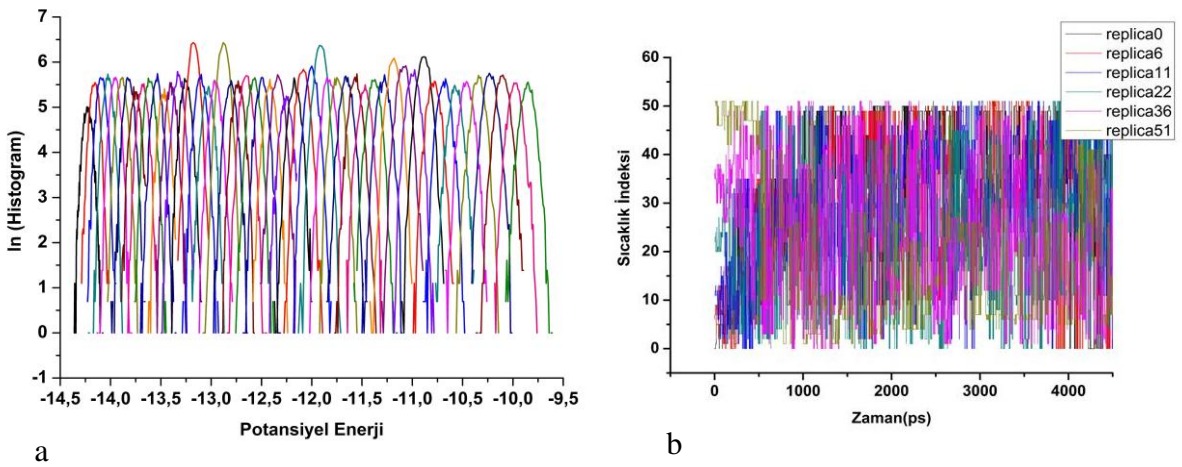
REMD simülasyonlarının tam anlamıyla başarılı olup olmadığına komşu kopyaların potansiyel enerji histogramlarının örtüşmesine (overlap) bakılarak karar verilebilir. Yapılan REMD simülasyonlarında PeptidI, II ve III için sırasıyla her bir sıcaklıktaki enerji histogramlarının önemli ölçüde örtüştüğü Şekil 6.10-12' den görüldüğünden simülasyonlarımızda geniş enerji aralığında örnekleme yapabildiğimizi söyleyebiliriz.



Şekil 6.10 PeptidI için a. Her bir kopya için potansiyel enerji histogramı b. Sıcaklık İndeksi.



Şekil 6.11 PeptidII için a. Her bir kopya için potansiyel enerji histogramı b. Sıcaklık İndeksi.



Şekil 6.12 PeptidIII için a. Her bir kopya için potansiyel enerji histogramı b. Sıcaklık İndeksi.

Şekil 6.10-12' de sadelik açısından sadece 6 farklı kopyanın REMD simülasyonları boyunca sıcaklık indeksleri verilmektedir. Bu kopyaların 280-501 K aralığındaki tüm sıcaklıkları ziyaret ettiği ve her üç peptid için de enerji uzayında bir boyutlu rastgele yürüyüşün sağlanabildiği sıcaklık indeksi şekillerinden görülmektedir.

### 6.3.3.1 İkincil Yapı Analizi

Her üç peptidin sudaki konformasyonlarının ikincil yapıları her sıcaklık için DSSP yapı tanımlama protokolü tarafından belirlenmiştir. İkincil yapıların sıcaklığa bağlılığını daha net inceleyebilmek amacıyla burada sadece 280, 300, 319 ve 501 K sıcaklıklardaki ikincil yapılar simülasyon zamanının fonksiyonu olarak sunulacaktır. Bu ikincil yapılar, PeptidI, II ve III için sırasıyla Şekil 6.13-24' de verilmektedir. Şekillerden bu farklı sıcaklıklarda her üç peptidin de ilk ve son iki aminoasitlerinin simülasyon zamanı boyunca büyük çoğunlukla rastgele sarım yapı gösterdiği görülmektedir. Bu durum terminal (uç) aminoasitlerin zwitteriyon formunda oluşundan dolayı beklenen bir durumdur.

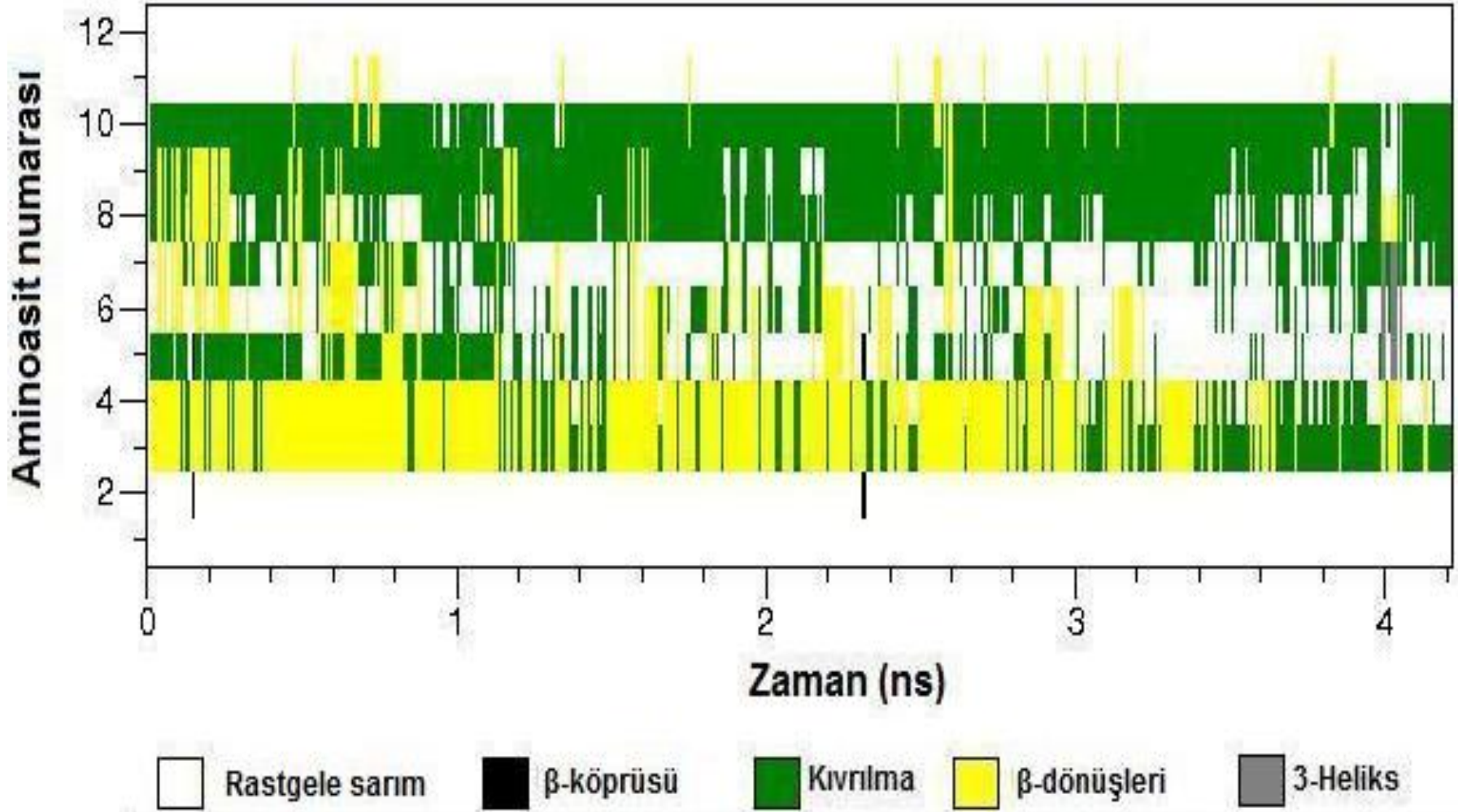
Şekil 6.13-16' dan görüldüğü gibi PeptidI, simülasyonlar boyunca tüm sıcaklıklarda az miktarda heliks yapının yanı sıra çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapıları segilemektedir. Özel olarak, beta dönüşü yapıları çoğunlukla Pro<sup>3</sup> ve Pro<sup>4</sup> aminoasitlerinde yer almaktadır. Sıcaklık değişimine rağmen tüm simülasyonlar boyunca Arg<sup>7</sup>(+) aminoasidi genelde rastgele sarım yapıya sahipken, kıvrılma yapılarının çoğunlukla Ser<sup>8</sup>-Ser<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup> sıralı segmentlerinde gözlemlendiği söylenebilir. Bunun yanında Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Phe<sup>6</sup>, Arg<sup>7</sup>(+), Ser<sup>8</sup>, Ser<sup>9</sup> ve Leu<sup>10</sup> aminoasitlerinde parça parça heliks yapılar da gözlemlenmektedir. Diğer taraftan, 501 K sıcaklıkta (Şekil 6.16) Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup> ve Phe<sup>6</sup> aminoasitlerinde  $\beta$ -köprüsü yapıları açıkça ortaya çıkmasına rağmen sıcaklığın azalmasıyla (Şekil 6.13-15) bu yapıların oranı da azalmaktadır.

PeptidII için elde edilen sonuçlara bakıldığında, bu peptidin de PeptidI' e benzer biçimde çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü şeklindeki ikincil yapılar sahip olduğu Şekil 6.17-20' den görülmektedir. Her sıcaklık için Ala<sup>3</sup>, Asp<sup>4</sup>(-), Thr<sup>5</sup>, His<sup>8</sup>, Arg<sup>9</sup>(+) ve Pro<sup>10</sup> aminoasitlerinde genelde rastgele sarım yapılar ortaya çıkmaktadır. 501 K sıcaklıkta terminal aminoasitleri dışındaki kısımlarda yer yer beta dönüşü yapılarına rastlanırken (Şekil 6.20), sıcaklık azaldığında bu yapıya büyük ölçüde Thr<sup>6</sup>-His<sup>7</sup>-His<sup>8</sup> sıralı aminoasitlerinde rastlanabildiği gözlenmektedir (Şekil 6.17-19). Bu üç temel yapının yanı sıra şekillerden,

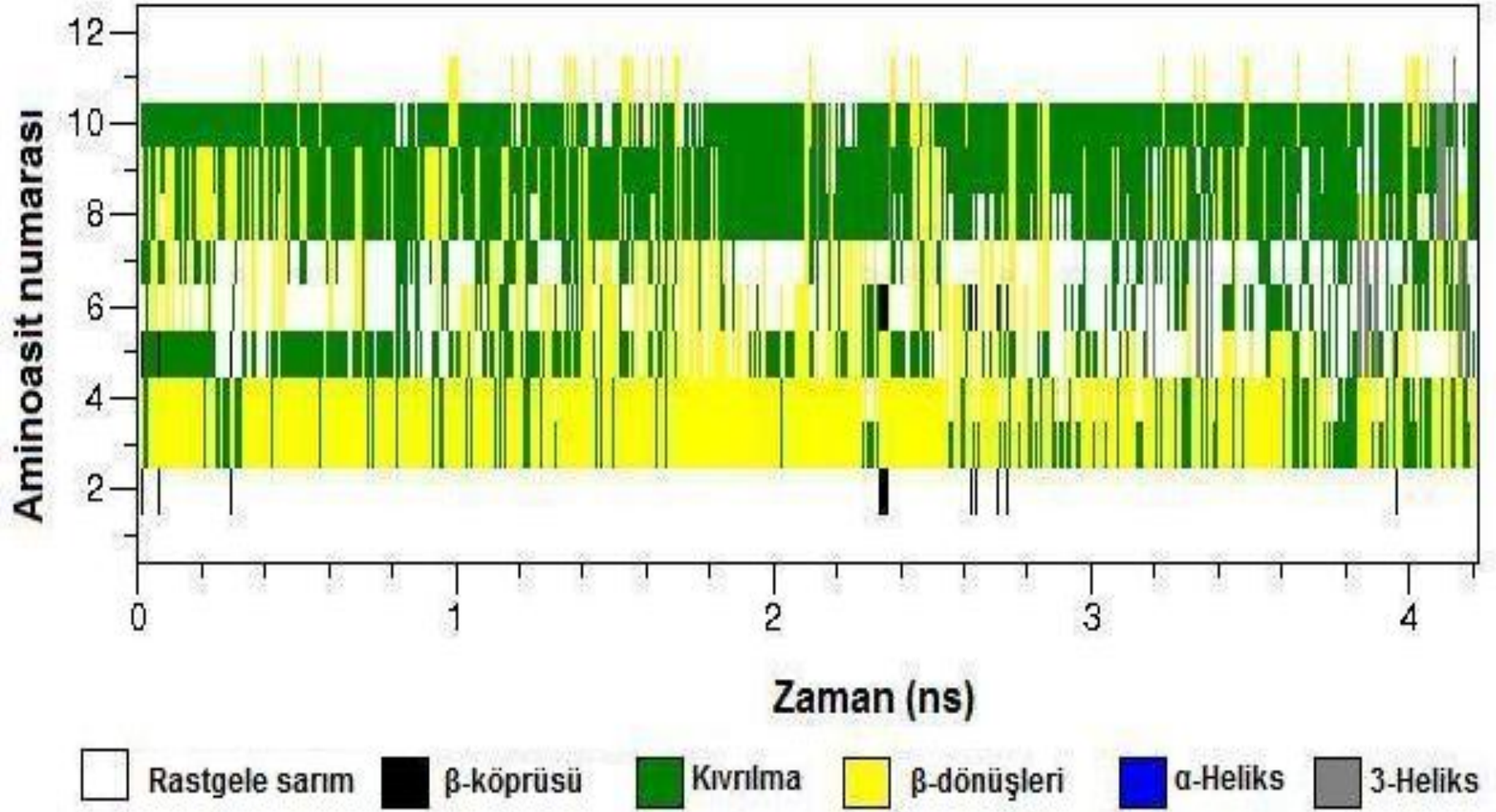
özellikle 280, 300 ve 319 K sıcaklıklarda 501 K' dekinden daha fazla miktarda heliks yapılar olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca 280, 300 ve 319 K sıcaklıklarında özellikle Leu<sup>2</sup> ve Trp<sup>11</sup> aminoasitlerinde az miktarda gözlenen  $\beta$ -köprüsü yapıların 501 K sıcaklıkta neredeyse yok olduğu da söylenebilir.

Şekil 6.21-24' den, PeptidIII için de ağırlıklı ikincil yapıların yine sırasıyla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapıları olduğu, bu yapılardan rastgele sarım yapının 280, 300 ve 319 K sıcaklıklarda özellikle Trp<sup>5</sup>, Asp<sup>8(-)</sup> ve Ala<sup>9</sup> aminoasitlerinde ortaya çıktığı ve 501 K sıcaklıkta ise beta dönüşü yapısının diğer sıcaklıklara kıyasla daha baskın olduğu söylenebilir. Heliks yapı ise çoğunlukla 280 ve 300 K sıcaklıklarda Gln<sup>2</sup> ve Ala<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup> sıralı segmentlerinde ortaya çıkmaktadır. Bunlara ek olarak her sıcaklık için az miktarda  $\beta$ -yaprağı yapıları da gözlenmektedir.

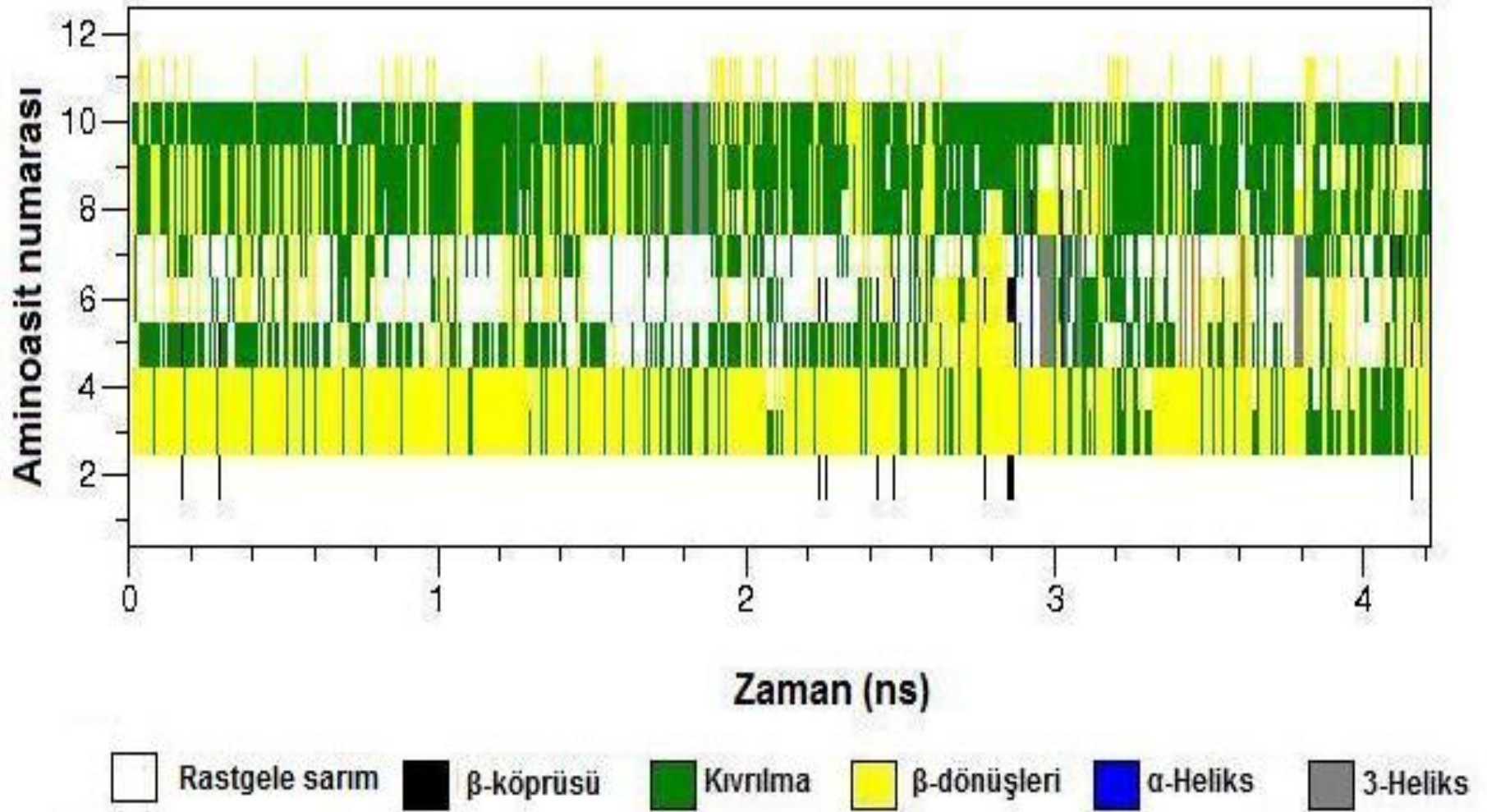
Her üç peptid için düşük sıcaklık, oda sıcaklığı ve yüksek sıcaklık bölgelerinde karşılaştırmalar yapabilmek amacıyla sırasıyla 280, 300 ve 501 K sıcaklıklarda peptidlerin sahip oldukları konformasyonların ikincil yapı yüzde oranları ayrı ayrı hesaplanmış ve bunlar Çizelge 6.2' de bir arada verilmiştir. Burada ayrıca, elde ettiğimiz sonuçların, literatürde her peptid için 300 K'de elde edilen CD sonuçlarıyla (Dudak et al. 2010) karşılaştırılması da amaçlanmıştır.



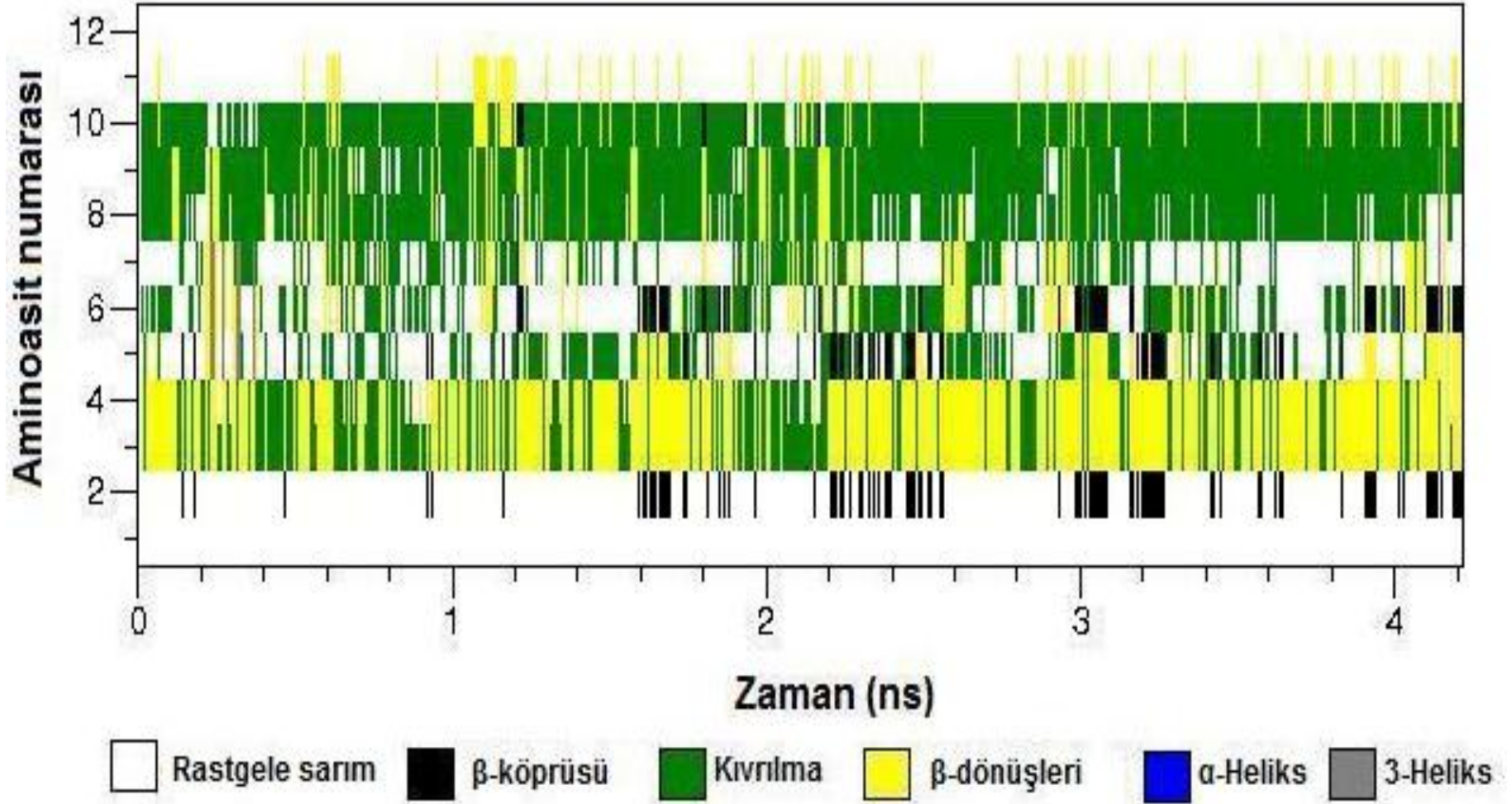
Şekil 6.13 Peptid I için 280 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.14 Peptid I için 300 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.

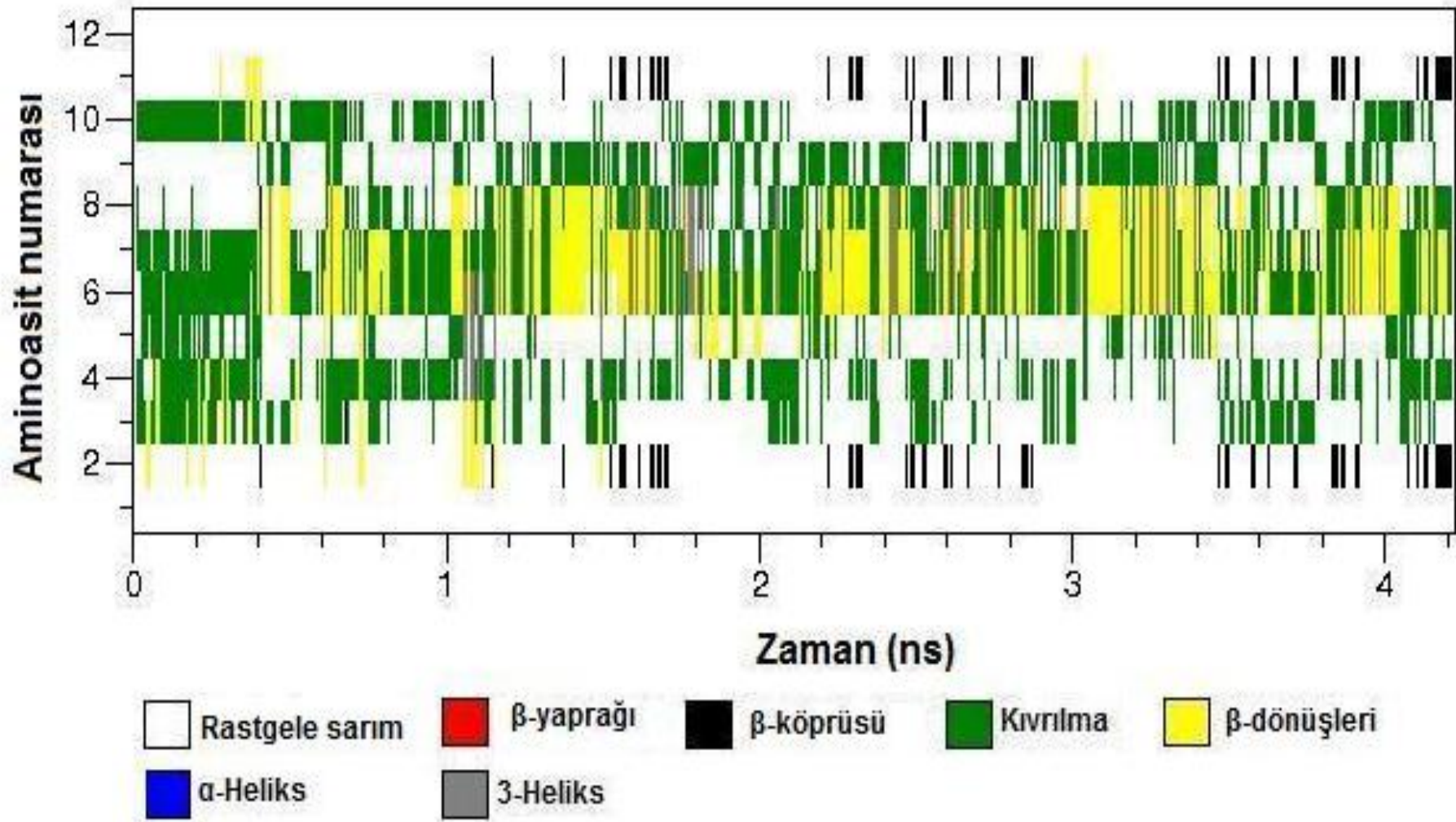


Şekil 6.15 Peptid I için 319 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.

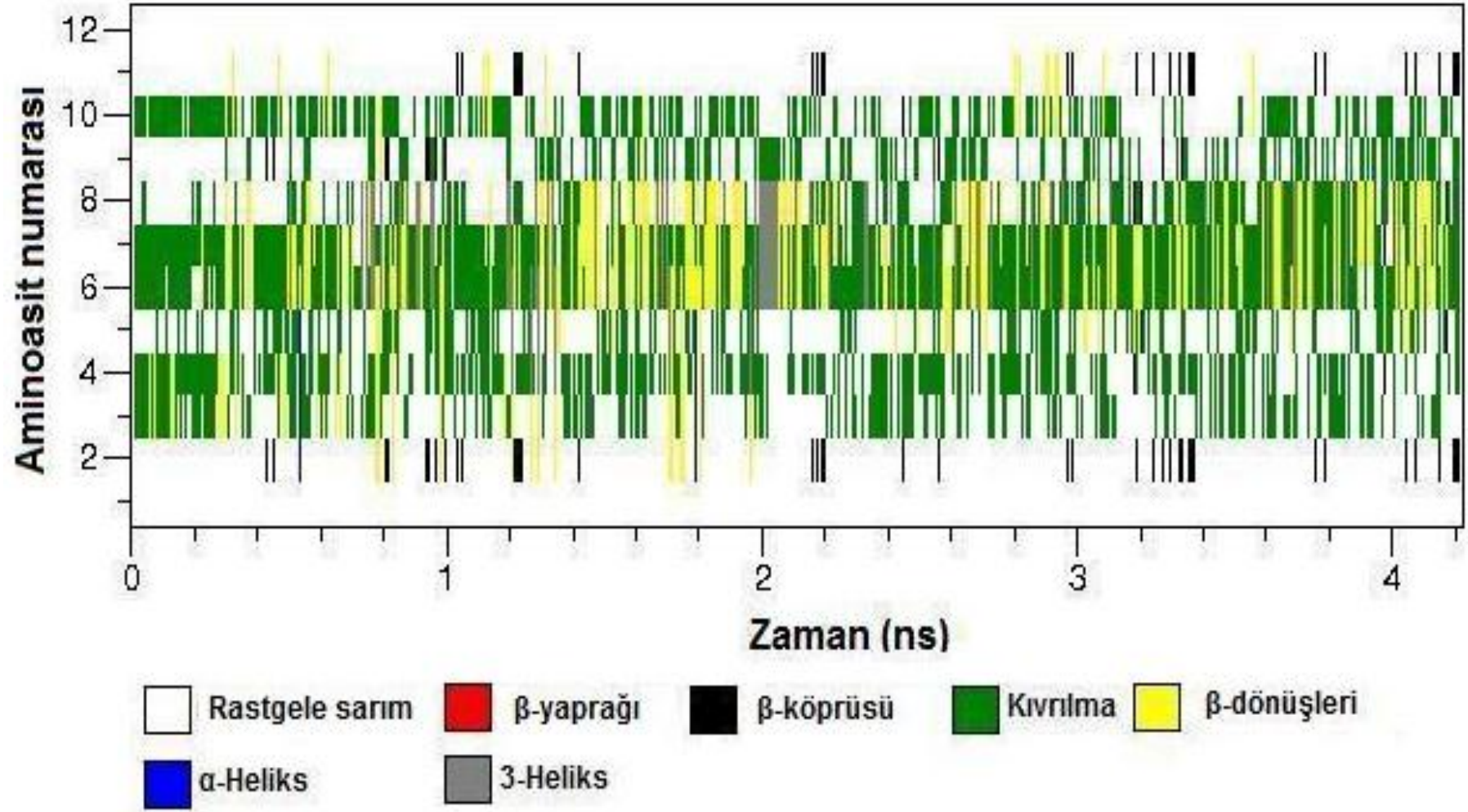


Şekil 6.16 PeptidI için 501 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.

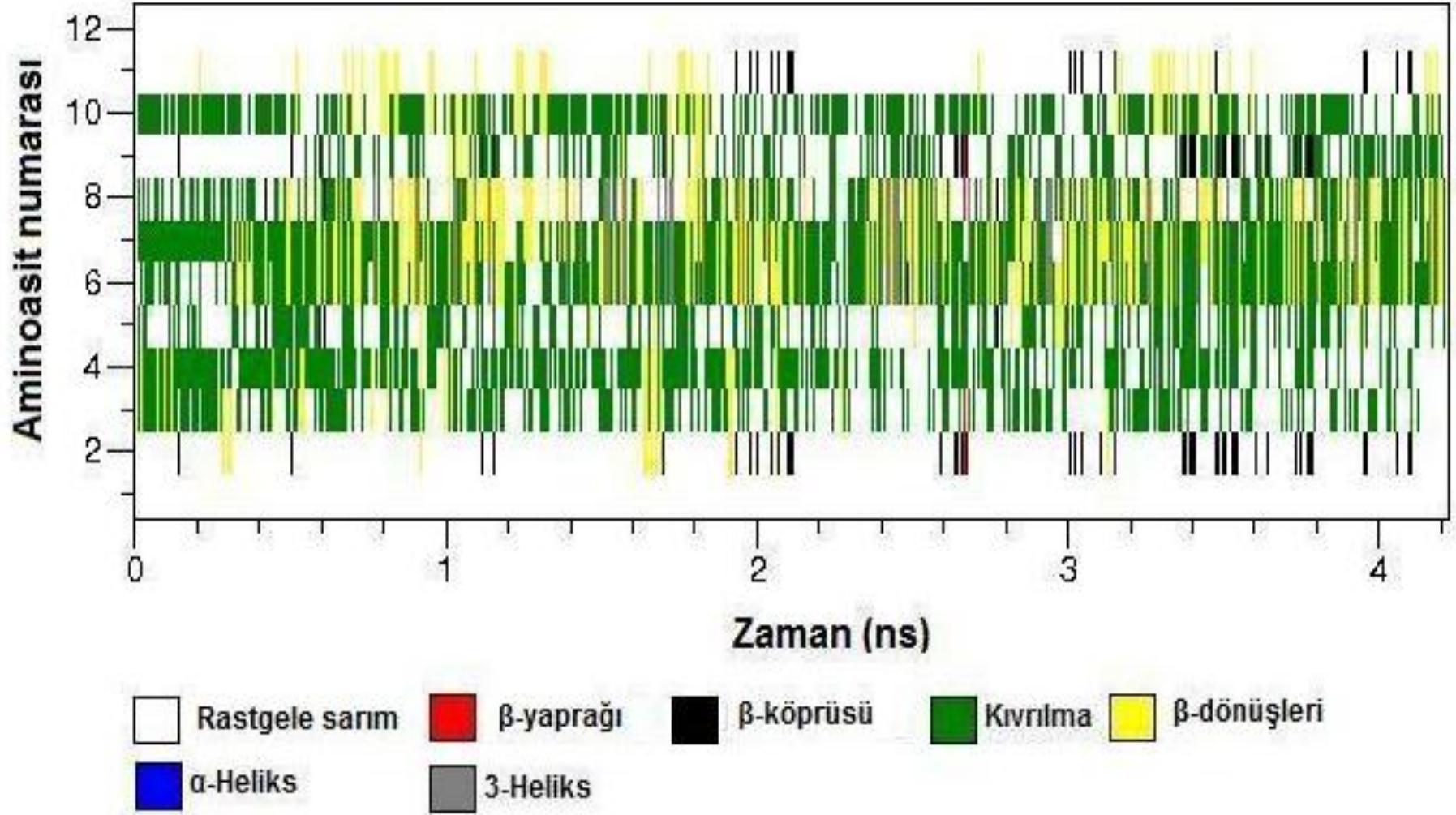




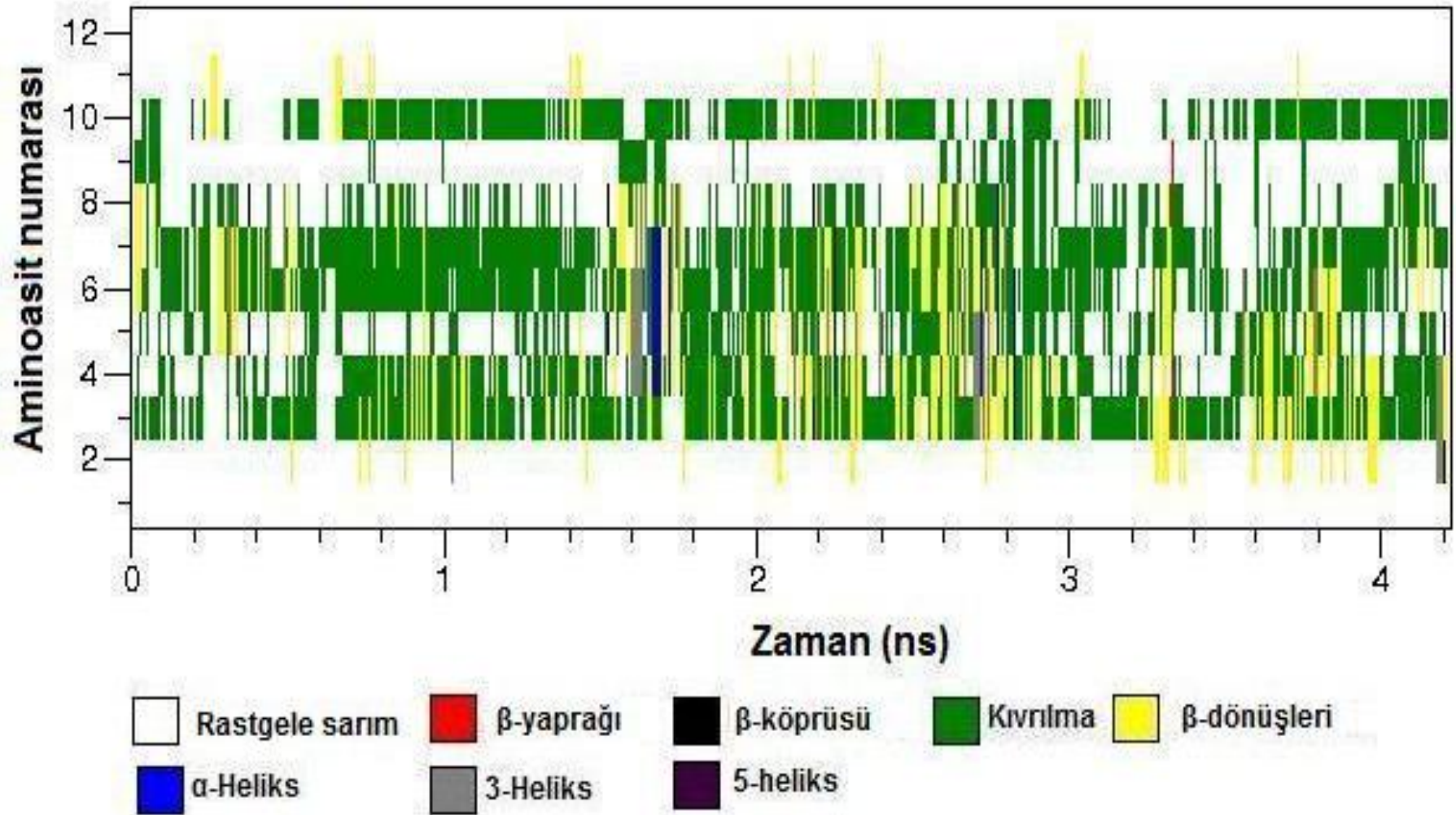
Şekil 6.17 PeptidII için 280 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



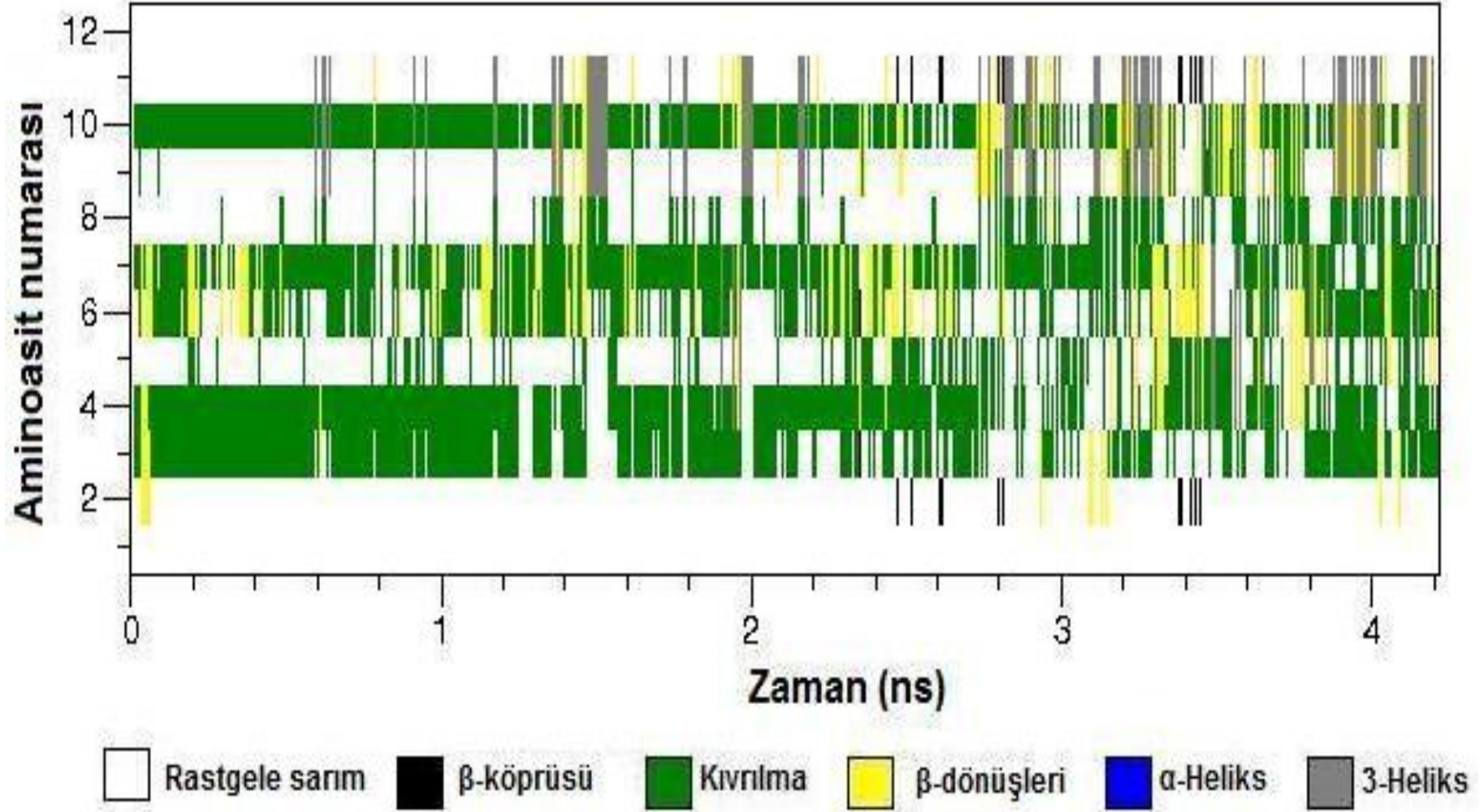
Şekil 6.18 PeptidII için 300 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



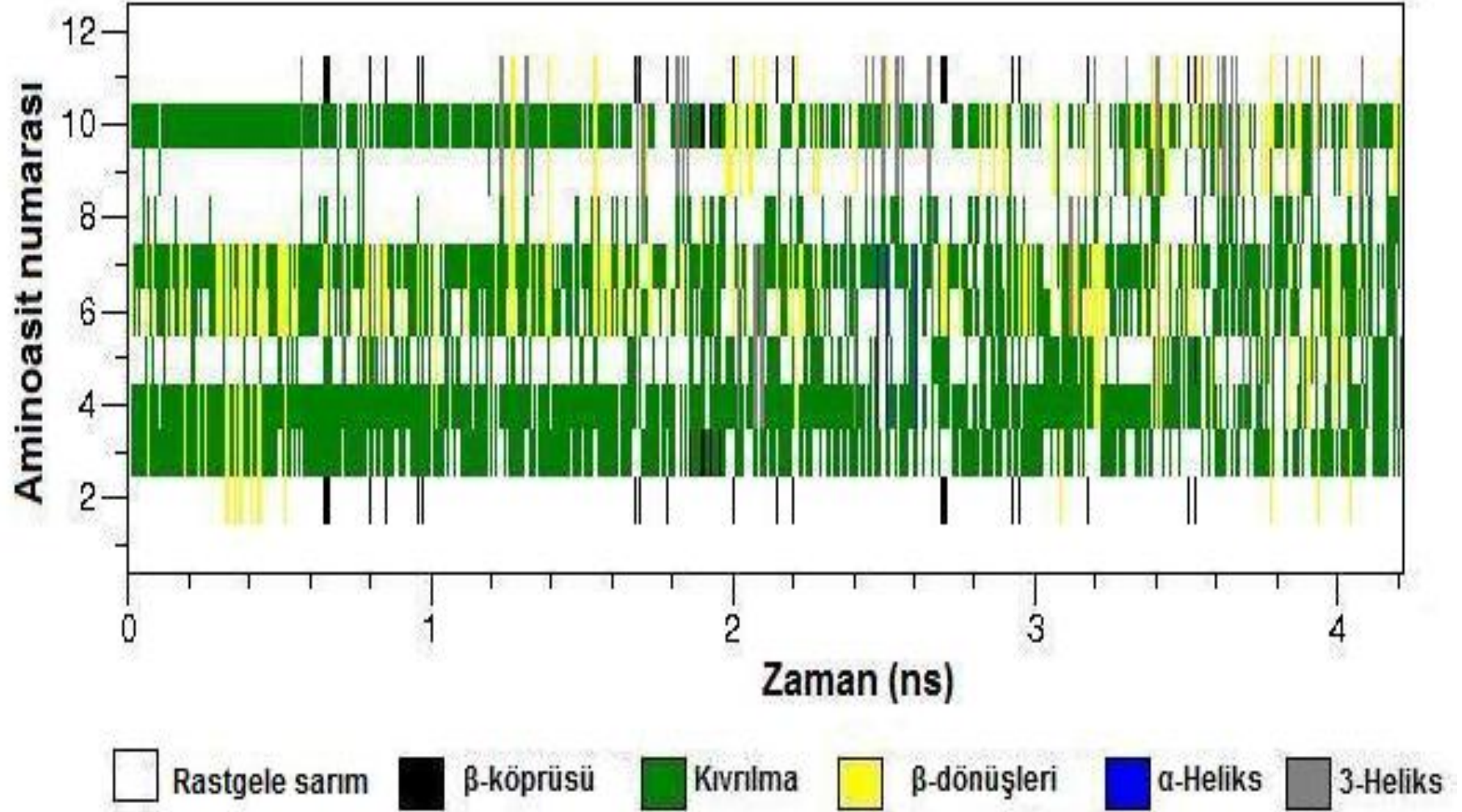
Şekil 6.19 PeptidII için 319 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



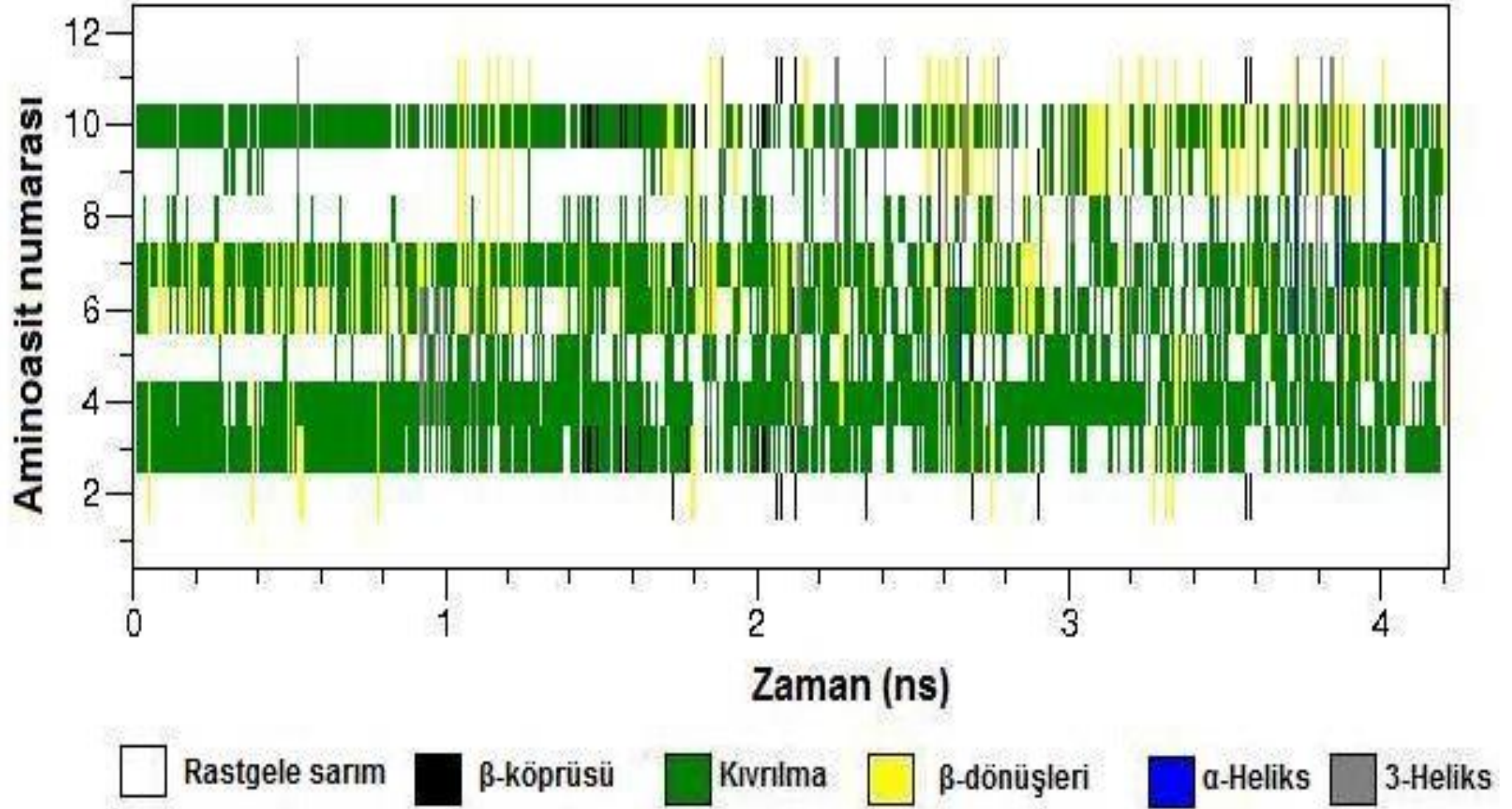
Şekil 6.20 PeptidII için 501 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



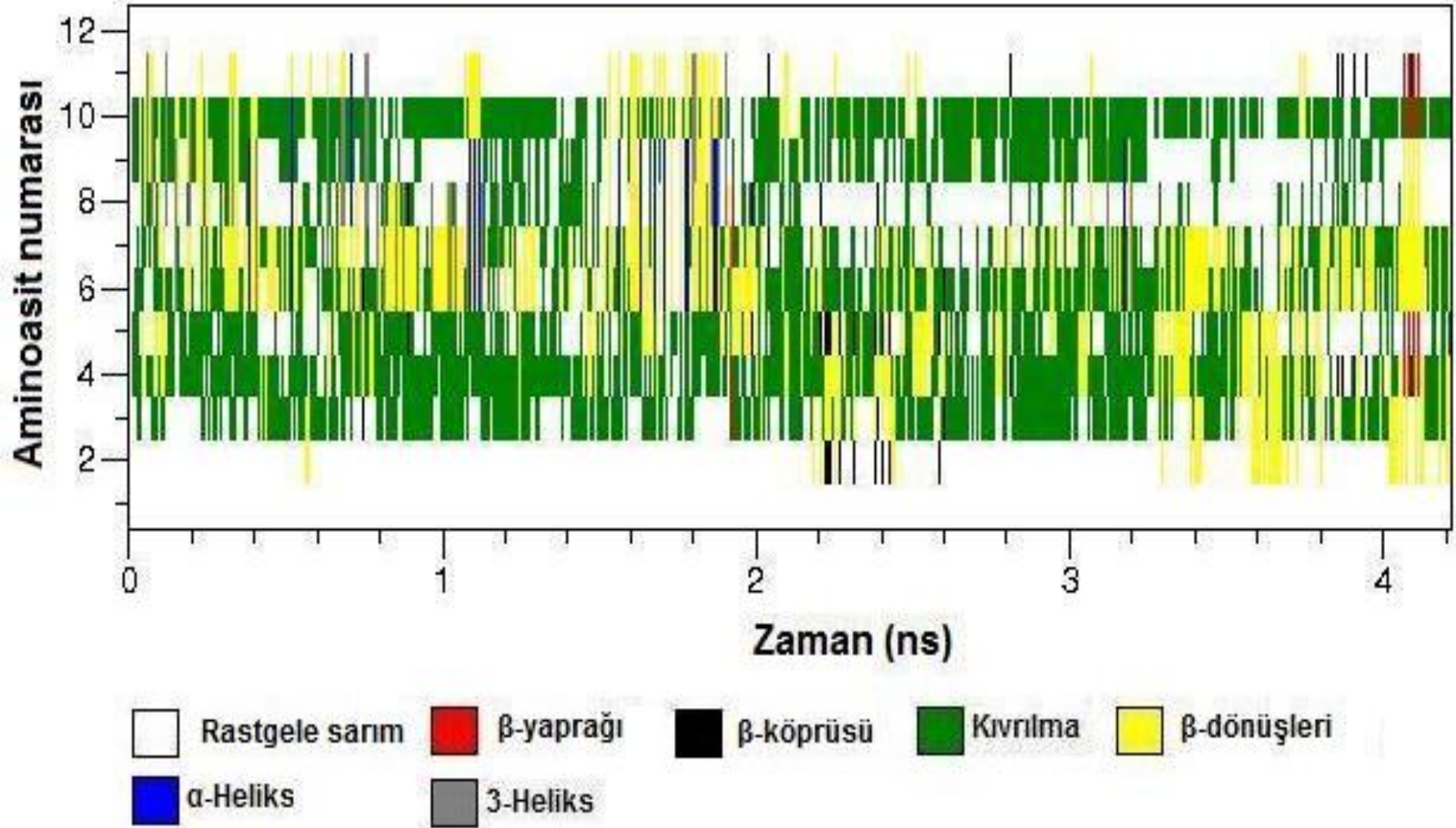
Şekil 6.21 PeptidIII için 280 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.22 PeptidIII için 300 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.23 PeptidIII için 319 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.24 PeptidIII için 501 K sıcaklıktaki zamana göre ikincil yapı değişimi.



Çizelge 6.2 Peptidlerin 280 K, 300 K ve 501 K sıcaklıktaki ikincil yapı yüzdeleri.

	Rastgele						
	T[K]	sarım (%)	Kıvrılma (%)	$\beta$ - dönüşü (%)	Heliks (%)	$\beta$ -yaprağı (%)	$\beta$ -köprüsü (%)
<b>PeptidI</b>	280	51.0	31.4	17.2	0.3	-	0.1
	300	47.1	28.7	23.0	0.9	-	0.3
	501	46.3	33.1	16.9	0.4	-	3.3
<b>PeptidII</b>	280	61.8	23.9	9.7	2.9	0.0	1.7
	300	60.8	26.9	7.7	2.9	0.0	1.7
	501	60.8	29.1	7.3	2.6	0.0	0.2
<b>PeptidIII</b>	280	56.4	28.4	7.9	6.6	0.4	0.3
	300	57.1	28.3	8.6	5.0	0.5	0.5
	501	53.6	31.7	11.3	2.6	0.2	0.6

Seçilen bu üç farklı sıcaklıkta ve P=1 atm basınç altında, peptidlerin çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü şeklinde ikincil yapılar gösterdiği Çizelge 6.2' den görülmektedir. Ek olarak, heliks yapı her peptid için farklı popülasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan,  $\beta$ -yaprağı yapısı yalnızca PeptidII ve III' te belirlenmiştir. Literatürde, bu peptidler için yapılmış deneysel CD spektroskopi sonuçlarında ise baskın ikincil yapıların her üç peptid için rastgele sarım,  $\beta$ -strand ve beta dönüşleri şeklinde olduğu rapor edilmiştir. Bahsedilen bu deneysel çalışmada ayrıca az miktarda heliks yapının mevcut olduğu ve yüksek  $\beta$ -strand oranının kısa peptidler için fitting metotta kaynaklanabileceği de vurgulanmıştır. Bu fitting metotta yüksek moleküler boyutlu proteinler referans olarak kullanıldığı için metodun yetersiz olabileceği de vurgulanmıştır. Tüm bu noktalar ele alındığında, REMD simülasyon sonuçlarımızın literatürdeki deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu söylenebilir.

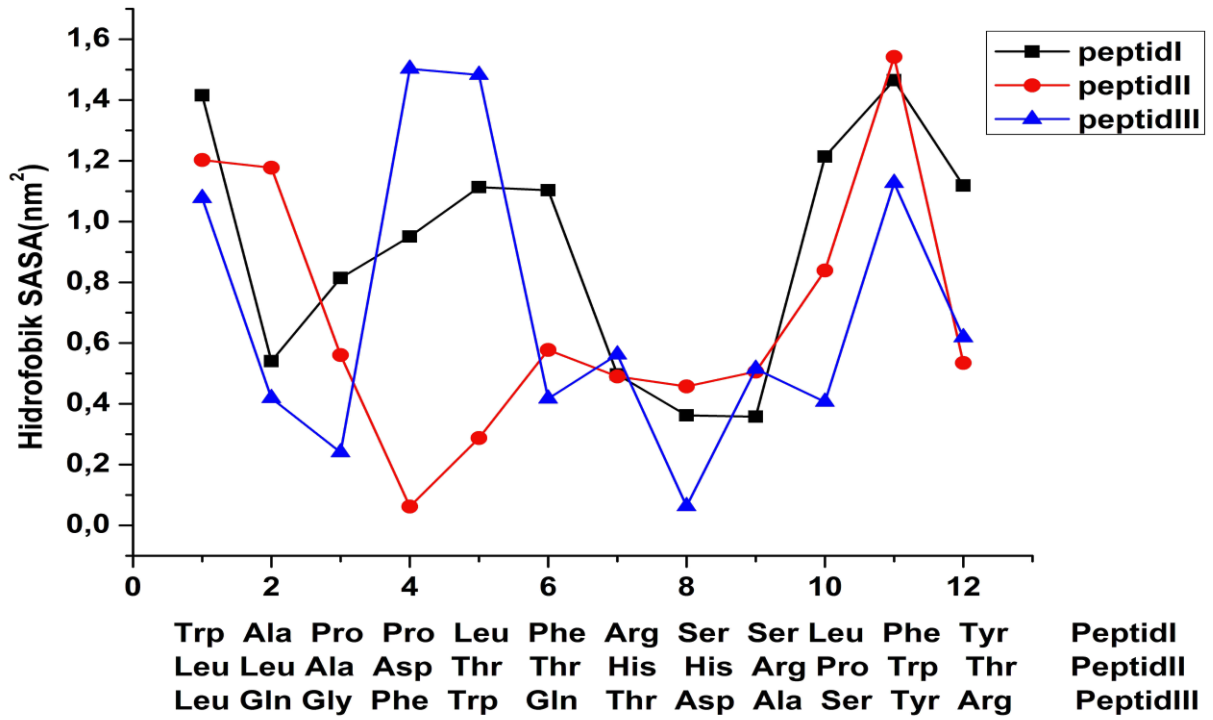
Ayrıca bu kısımda elde edilen REMD simülasyon sonuçları ile Bölüm 6.2.3' de sunulan 300 K sıcaklıkta yapılan klasik MD simülasyonlarının sonuçları karşılaştırıldığında, her iki simülasyon sonucunda da baskın yapıların çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşleri şeklinde olduğu ve uç terminal aminoasitlerinin tümüyle rastgele sarım yapı gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, PeptidII için klasik MD simülasyonlarında gözlenmeyen  $\beta$ -köprüsü yapılarının REMD simülasyonlarında ortaya çıktığı ve klasik MD simülasyonlarında çok az oranda rastlanan heliks yapısının ise REMD simülasyonlarında daha fazla olduğu söylenebilir. Bu farklılıklar PeptidII konfigürasyonlarının klasik MD

simülasyonları esnasında herhangi bir yerel minimuma takılmış olabileceğini düşündürmektedir.

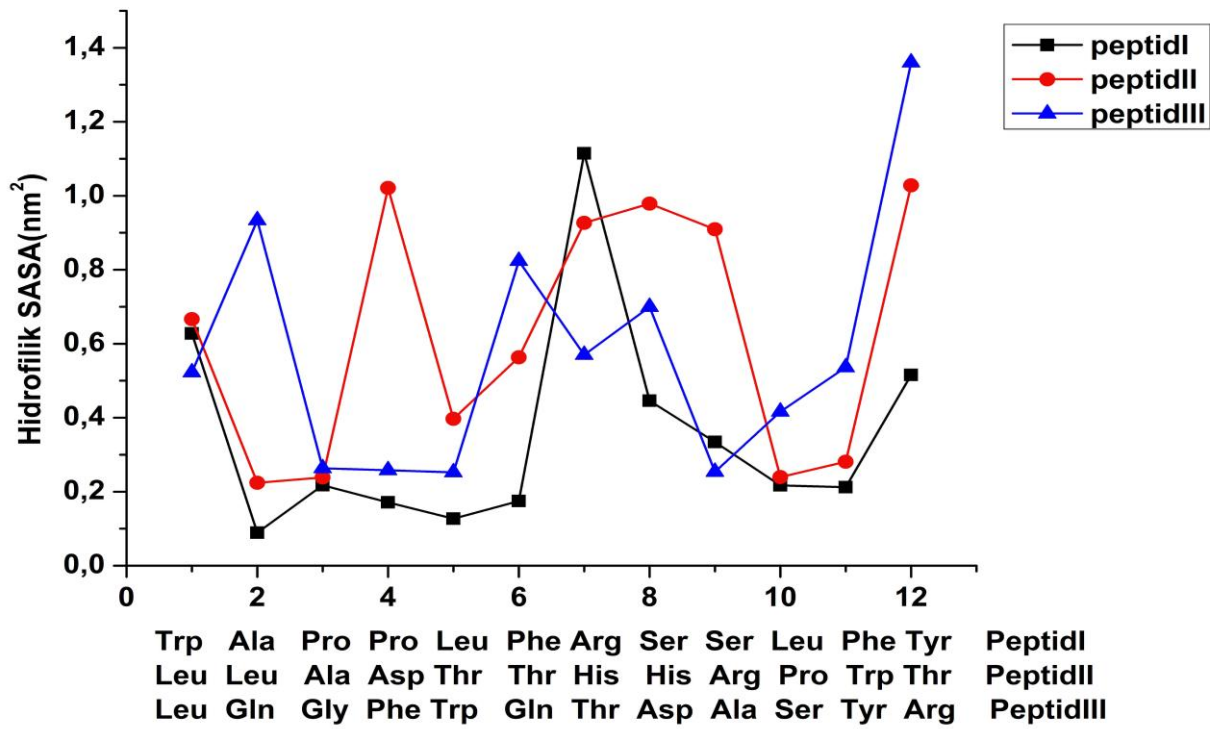
### 6.3.3.2 Hidrojen Bağları ve Çözücü Erişim Yüzey Alanları (SASA)

Protein katlanmalarında en etkin kuvvetler hidrofobik kuvvetlerdir. Bundan dolayı her peptidin konformasyonel yapılarına hidrofobik kuvvetlerin etkisini görmek amacıyla, 300 K sıcaklıkta hidrofobik, hidrofilik ve toplam çözücü erişim yüzey alanları (SASA) tarafımızdan hesaplanmış ve Şekil 6.25-27' de her peptid için bir arada verilmiştir. Şekil 6.25'den görüldüğü gibi PeptidI için en yüksek hidrofobik katkı Trp<sup>1</sup> ve Phe<sup>11</sup> aminoasitlerinde gözlenirken en yüksek hidrofilik katkının Arg<sup>7(+)</sup> aminoasitinden geldiği görülmektedir (Şekil 6.26). Hidrofobik katkı, Ala<sup>2</sup> ve Phe<sup>6</sup> aminoasitleri arasında artış göstermiş, ardından Arg<sup>7</sup> ve Ser<sup>9</sup> aminoasitleri arasında azalmış ve tekrar Phe<sup>11</sup> aminoasitinde artış göstermiştir. Ayrıca, Şekil 6.14' deki PeptidI için 300 K sıcaklıkta oluşan ikincil yapılar incelendiğinde Ala<sup>2</sup>-Phe<sup>6</sup> segmentinde kıvrılma ve beta dönüşü yapılarının daha baskın olduğu ve Ser<sup>8</sup>-Leu<sup>10</sup> sıralı aminoasitlerinin ve Arg<sup>7(+)</sup> aminoasitlerinin çoğunlukla rastgele sarım yapıya sahip olduğu da söylenebilir. PeptidII için Asp<sup>4(-)</sup>, His<sup>7</sup>, His<sup>8</sup>, Arg<sup>9(+)</sup>, Tyr<sup>12</sup> aminoasitleri yüksek hidrofilik katkılar sağlarken Leu<sup>1</sup>-Leu<sup>2</sup> ve Trp<sup>11</sup> aminoasitleri ise yüksek hidrofobik katkılar sağlamaktadır. PeptidIII için ise en yüksek hidrofobik ya da en düşük hidrofilik katkılar Phe<sup>4</sup> ve Trp<sup>5</sup> aminoasitlerinde görülmektedir. Diğer taraftan, düşük hidrofobik katkılar Ala<sup>3</sup>, Asp<sup>8</sup> (-) ve Arg<sup>12(+)</sup> aminoasitlerinde gözlenmektedir.

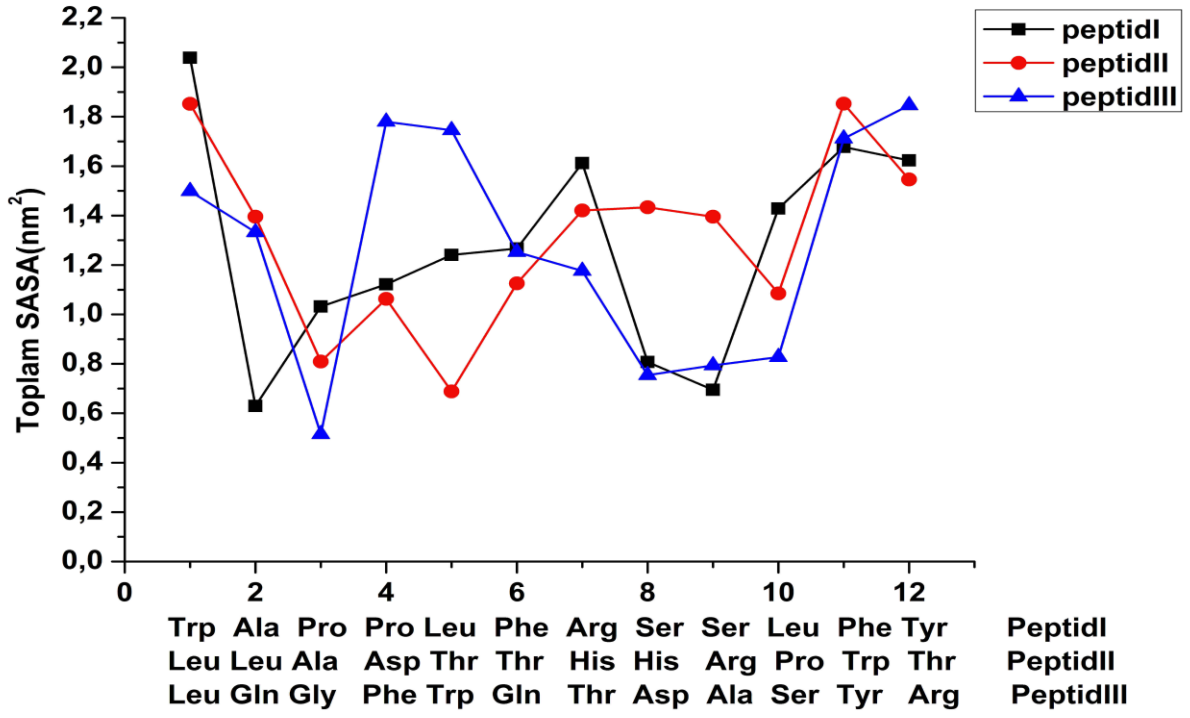
SASA' ların yanı sıra her peptid için 300 K sıcaklıkta aminoasit başına çözücü ile peptidler arasında yapılan hidrojen bağlarının olasılığı da hesaplanmış ve sonuçlar her peptid için Şekil 6.28' de bir arada verilmiştir. PeptidI için en yüksek ve en düşük hidrojen bağ olasılıkları sırasıyla Arg<sup>7(+)</sup> ve Leu<sup>5</sup> aminoasitlerinde gözlenirken, bu peptid için N ve C terminal aminoasitlerinde (Trp<sup>1</sup> ve Tyr<sup>12</sup>) bu olasılığın yüksek olduğu görülmüştür. PeptidII için en yüksek ve en düşük olasılıklar sırasıyla Thr<sup>12</sup> ve Pro<sup>10</sup> aminoasitlerinde iken Asp<sup>4(-)</sup> ve Arg<sup>9(+)</sup> aminoasitlerinde de yine yüksek olasılıklar gözlenmiştir. PeptidIII için ise, en yüksek olasılık Arg<sup>12(+)</sup> aminoasitinde gözlenirken en düşük olasılık Gly<sup>3</sup> ve Ala<sup>9</sup> aminoasitlerinde gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, her peptid için su ile yapılan en güçlü hidrojen bağlarının rastgele sarım yapılara sahip aminoasitlerde gözlenmesine karşın, zayıf hidrojen bağlarının kıvrılma,  $\beta$ -dönüşü, heliks,  $\beta$ -yaprağı ve  $\beta$ -köprüsü yapılarına sahip aminoasitlerde ortaya çıktığı görülmüştür.



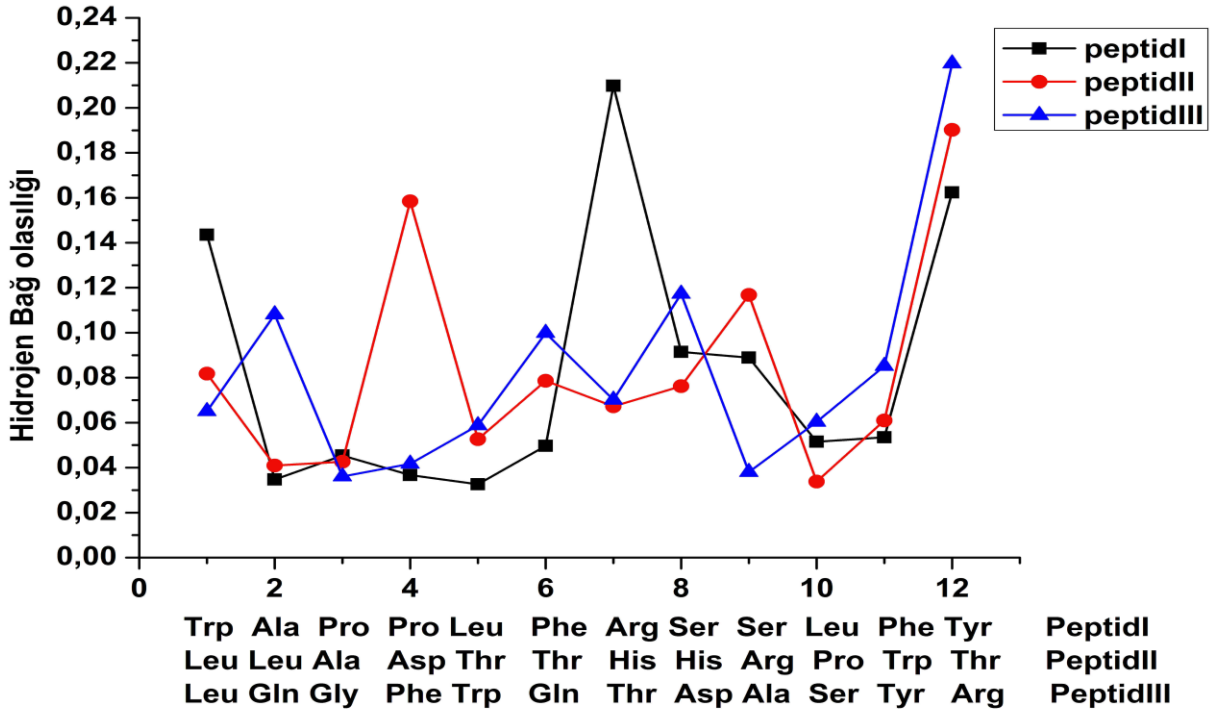
Şekil 6.25 Her üç peptid için hidrofobik SASA.



Şekil 6.26 Her üç peptid için hidrofilik SASA.



Şekil 6.27 Her üç peptid için toplam SASA.



Şekil 6.28 Her üç peptid için moleküller arası hidrojen bağ yapma olasılığı.

### 6.3.3.3 Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA)

REMD simülasyonlarla peptid hareketine atomik boyutta bir bakış ve serbest enerji yüzeyinin bir temsili elde edilebilir. Simülasyonlardan serbest enerji yüzeyini elde etmek için bir reaksiyon koordinat setine ihtiyaç vardır. Bu setle farklı konformasyonel alt seti ayırabilme olanağı sağlanır. Reaksiyon koordinatları Temel Bileşen Analizi ile elde edilebilir (PCA). PCA yaygın olarak protein dinamiğini incelemek için kullanılan bir metottur ve birkaç temel bileşen vasıtasıyla konformasyonel örnekleme hakkında bilgi sağlayan bir araçtır. Bu metodu kullanarak MD yörüngeleri az sayıda değişkenle açıklanabilir.

Temel Bileşen Analizinde ilk adım,  $X(t)$  yörüngeden elde edilen  $C_{ij}$  kovaryans matrisi oluşturmaktır. Burada  $\langle \rangle$ , örneklenen yapıların tümü üzerinden ortalama,  $x_i$ , N parçacıklı sistemin Kartezyen koordinatı olmak üzere  $C_{ij}$ ,

$$C_{ij} = \left\langle \left( X_i - \langle X_i \rangle \right) \left( X_j - \langle X_j \rangle \right) \right\rangle \quad (6.1)$$

şeklinde verilir.  $C_{ij}$  matrisi simetrik olduğu için bir R ortogonal dönüşüm matrisiyle köşegenleştirilebilir.

$$R^T C R = \text{diag} \left( \lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{3N} \right) \quad (6.2)$$

Burada,  $\lambda_i$  ler C kovaryans matrisin özdeğerleri ve R matrisindeki i. sütun bu  $\lambda_i$  özdeğerine ait olan özvektördür. Birinci özvektör, en büyük konumsal dalgalanmayı, ikincisi, ikinci en büyük dalgalanmaya karşılık gelir ve bu şekilde devam eder. Böylece hareketin önemli bölümü ilk birkaç temel bileşenle karşılanabilir.

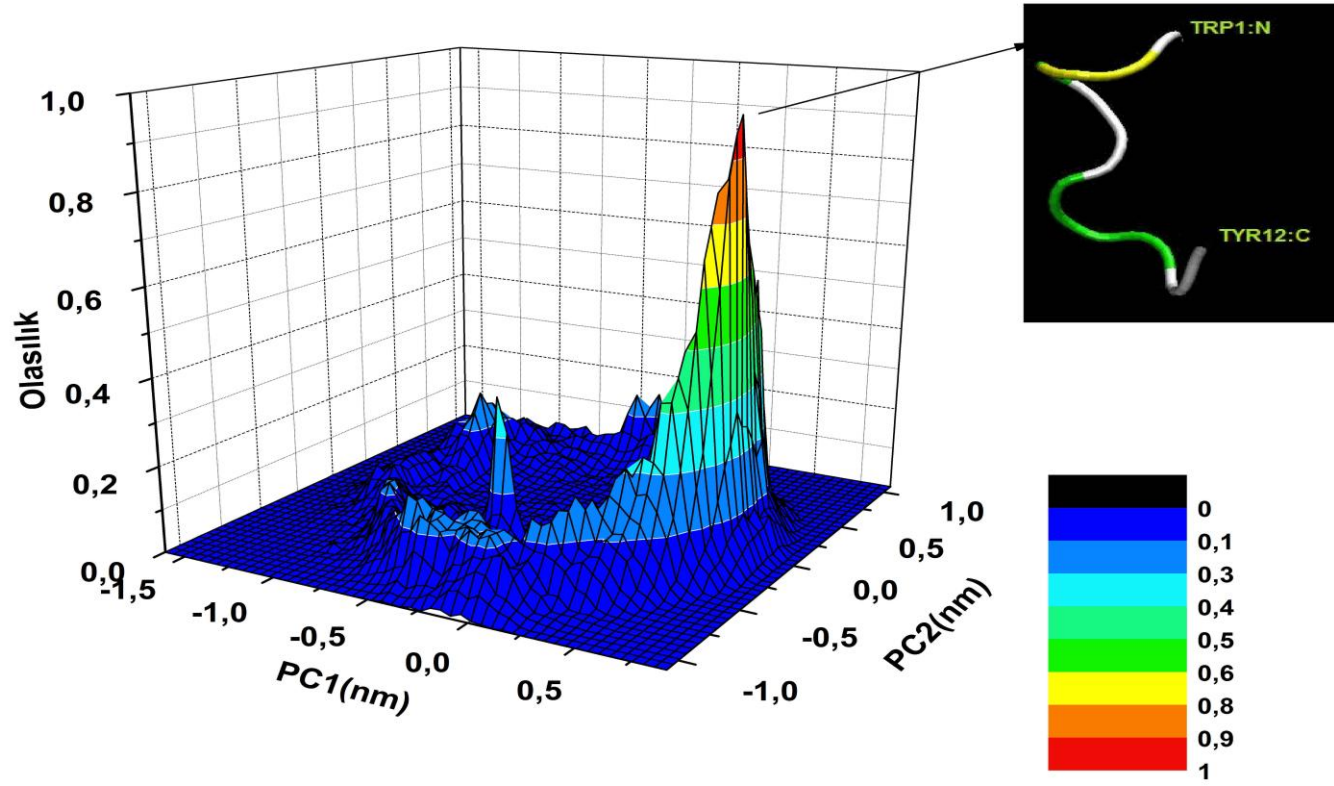
Bu tez çalışmasında temel bileşenlerin katsayılarının katkısı analiz edilerek konformasyonel yapılar için bir bakış elde etmek için simülasyonlardan elde edilen yörünge dosyalarına PCA yöntemi uygulandı. Bunun yanı sıra, PCA ile kovaryans matrisin özvektörleri konformasyonel olasılık dağılımını ve serbest enerji yüzeyini de elde etmek için kullanılabilir.

Simülasyonlar sonucu temel bileşenleri elde etmek için ilk önce REMD simülasyonlarının tüm konfigürasyonlarından ortalama yapılar elde edilmiştir. Sonrasında, bu ortalama yapılar, verilen peptidlerin tüm yörüngeleri üzerinden temel bileşenlere ait olan özvektörleri hesaplamak amacıyla referans yapılar olarak kullanılmıştır. Özdeğer hesabı ve temel bileşenler boyunca izdüşümü  $C_{\alpha}$  atomu koordinatlarına göre hesaplanmıştır. Hesaplamalarda ilk üç temel bileşenin PeptidI, PeptidII ve PeptidIII' ün toplam hareketinin sırasıyla %67, %66 ve %57' sini karşılamakta olduğu görülmüştür. Tüm kopyaların 1. temel bileşen (PC1) ve 2. temel bileşene (PC2) göre konformasyonel olasılık dağılımları Şekil 6.29-31' de her peptid için ayrı ayrı verilmektedir.

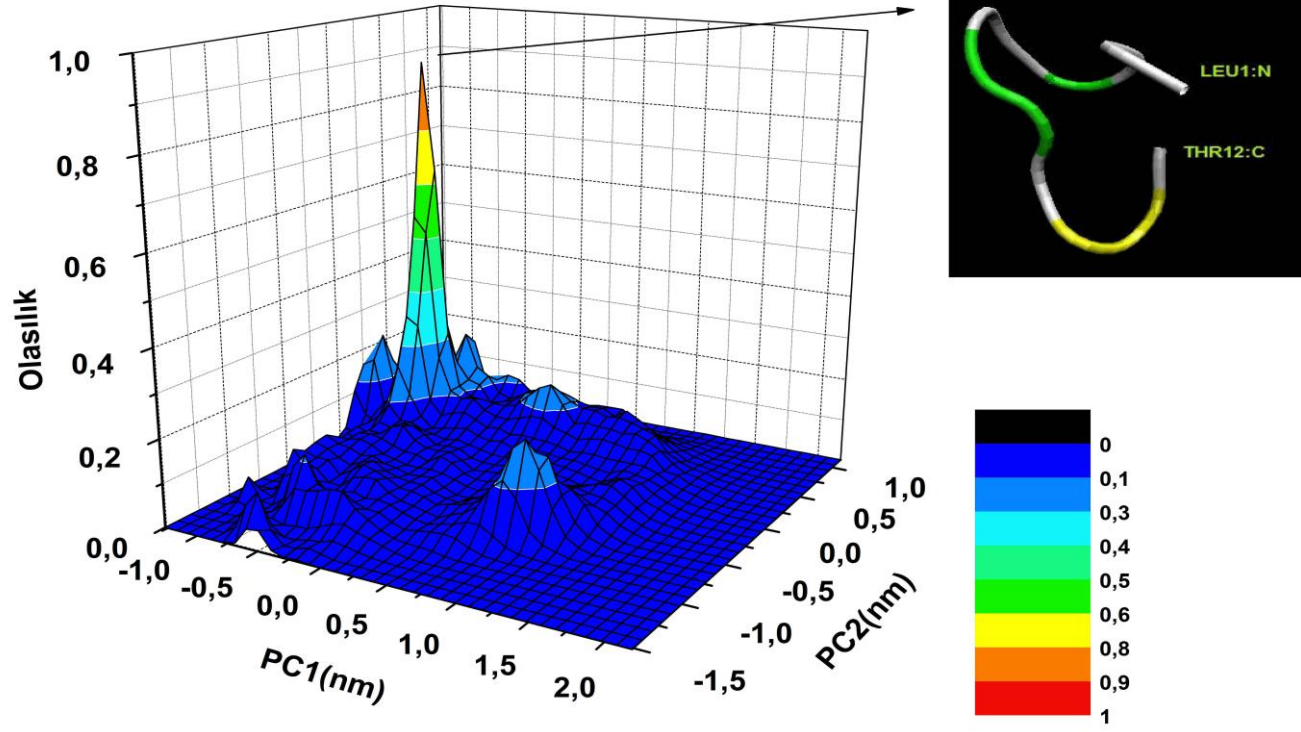
PeptidI için ilk iki temel bileşen hareketin önemli bölümünü betimlemek için yeterli olmuştur (toplam hareketin %58). Şekil 6.29' dan görüldüğü gibi PC1 ve PC2 boyunca hareketin dağılımı açıkça en yüksek olasılıklı belli bir bölgede (PC1 ve PC2'ye göre sırasıyla (0.25;0.75) ve (-0.5;0.5)) toplanmıştır. Bu bölgeyi temsil eden üç boyutlu yapılardan biri şeklin sağında verilmektedir. Buradan rastgele sarım, beta dönüşü ve kıvrılma yapılarının ilk iki temel bileşene göre en baskın yapılar olduğu görülmektedir.

PeptidII için PC1 ve PC2 bileşenlerinin toplam hareketin %56' sını karşıladığı hesaplanmıştır. Olasılık dağılımının (-1.25;-0.75) ve (0.0;0.75) konumları civarında merkezlenmiş keskin bir pike sahip olduğu Şekil 6.30' dan görülmektedir. Bu en yüksek olasılıklı yapılardan biri şeklin sağında gösterilmiştir. PeptidI' e benzer olarak PeptidII için sunulan bu temsili yapının da çoğunlukla rastgele sarım, beta dönüşü ve kıvrılma şeklinde ikincil yapılara sahip olduğu söylenebilir.

Peptid III için ise PC1 ve PC2 toplam hareketin %47' sini karşıladığı hesaplanmıştır. PC1 ve PC2 boyunca hareketin dağılımı Şekil 6.31' de verilmektedir. Olasılık dağılımlarında iki keskin pik karşımıza çıkmaktadır. Birinci pik, PC1 ve PC2'ye göre sırasıyla (-0.25;0.50) ve (-0.75;-0.25) noktaları civarında ve ikinci pik ise (-0.25;0.50) ve (-0.25;0.25) noktaları civarında merkezlenmiştir. En yüksek olasılıklı yapıların varlığını gösteren bu piklere karşılık gelen temsili üç boyutlu konformasyonlardan her biri şeklin sağında ve solunda verilmektedir. Bu konformasyonların ikincil yapıları ağırlıklı olarak rastgele sarım ve kıvrılma yapıları şeklinde olmasına karşın, 1. pik için beta dönüşü yapısı ve 2. pik için ise heliks yapı önemli ölçüde ortaya çıkmaktadır.

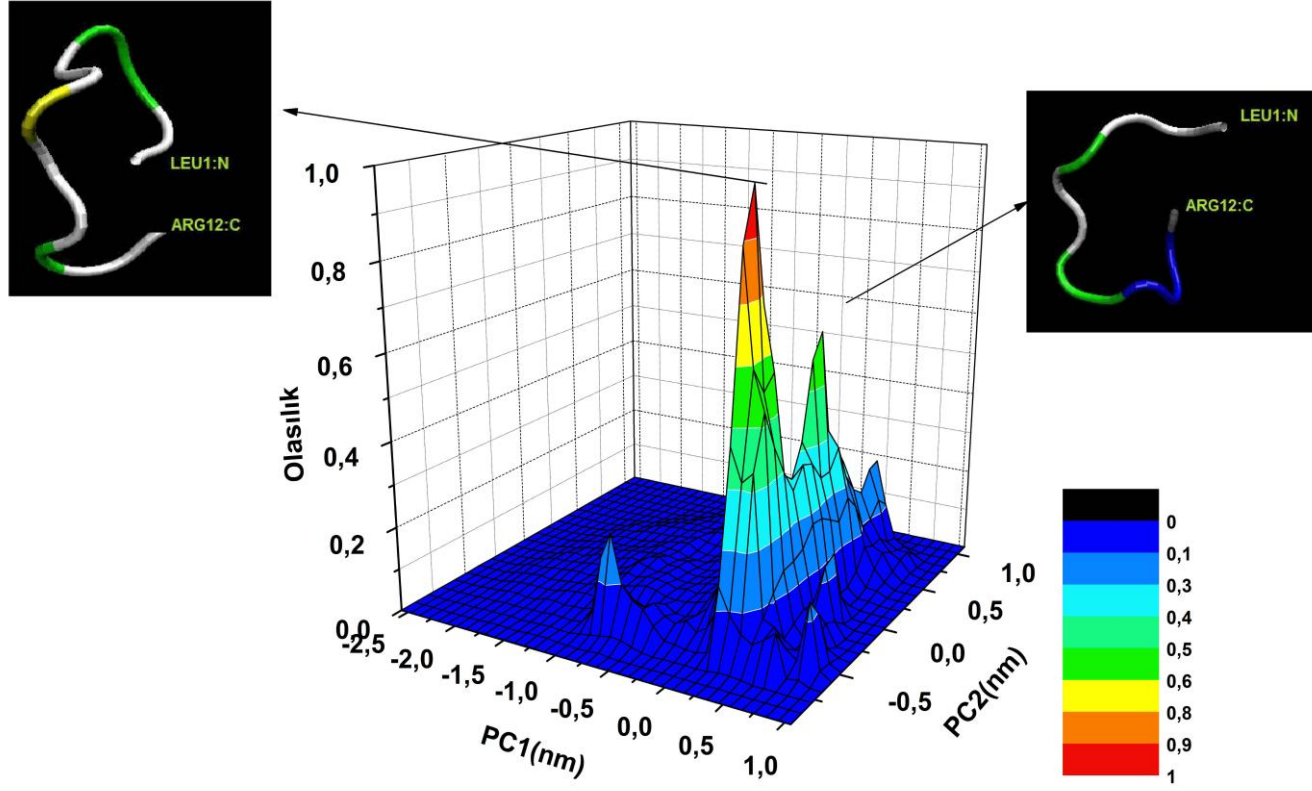


Şekil 6.29 PeptidI için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları.



Şekil 6.30 PeptidII için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları.





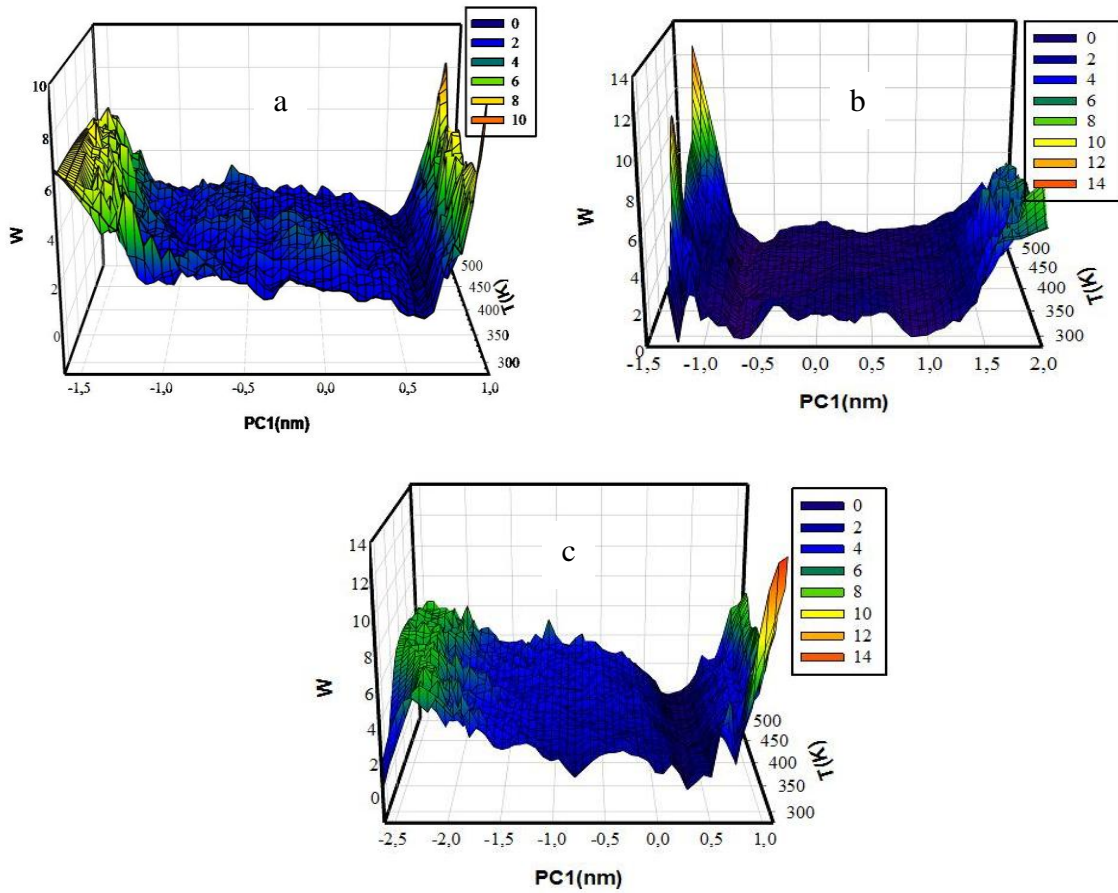
Şekil 6.31 PeptidIII için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları.

### 6.3.3.4 Serbest Enerji Yüzeyleri

Peptidlerin konformasyonel dinamiğini araştırmak için PCA yapılarak REMD simülasyonlardan serbest enerji yüzeyleri de elde edilmiştir. Bu elde edilişte aşağıdaki serbest enerji eşitliği kullanılmıştır.

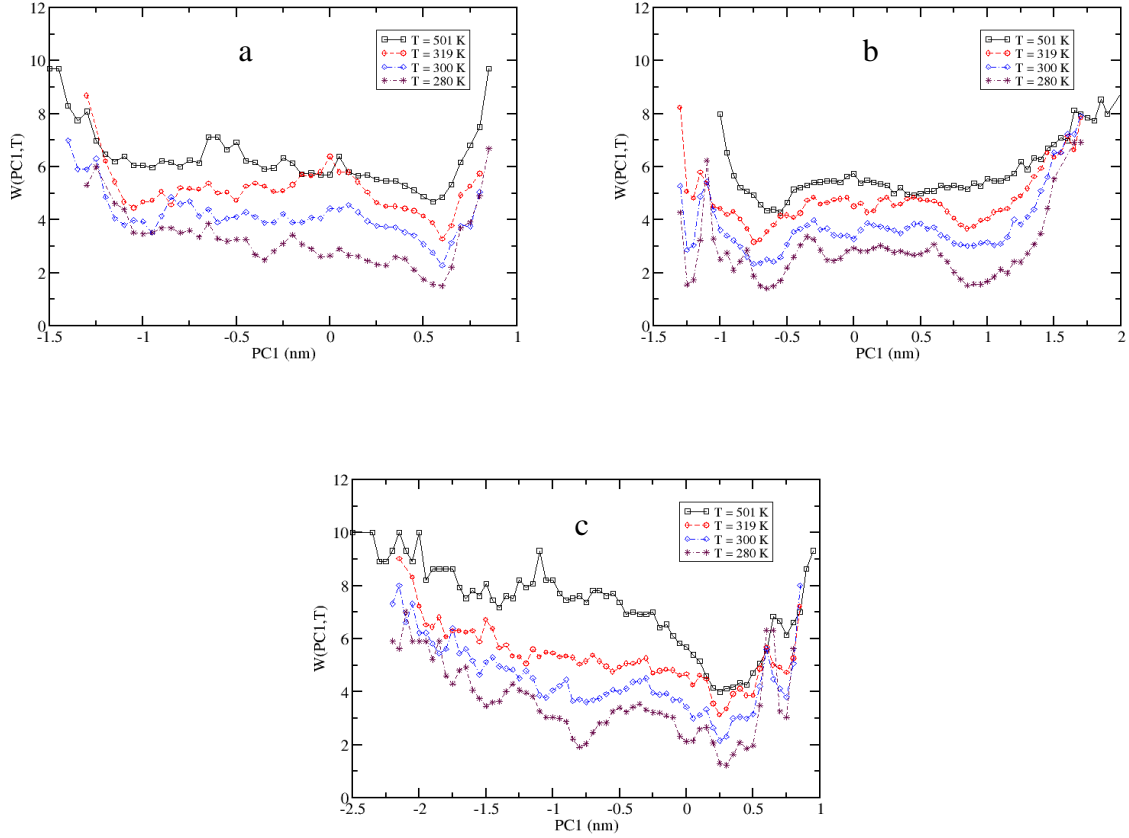
$$W(PC1,T) = -k_B T \ln P(PC1,T) \quad (6.3)$$

Sıcaklığın da fonksiyonu olan bu ifade, P(PC1, T) simülasyon verilerinin histogramından elde edilen sıcaklığa bağlı olasılık dağılımlarını ve  $k_B$  Boltzmann sabitini ifade etmektedir. Eşitlik 6.3 kullanılarak hesaplanan enerji değerlerinin sıcaklık ve PC1 uzayında oluşturduğu serbest enerji yüzeyleri Şekil 6.32’ de her peptid için ayrı ayrı verilmiştir.



Şekil 6.32 PC1 ve sıcaklığa göre serbest enerji yüzeyleri a) PeptidI b) PeptidII ve c) PeptidIII.

İncelenen peptidlerin yerel minimumlarını açık bir biçimde görebilmek için PC1' in fonksiyonu olarak 280, 300, 320 ve 501 K sıcaklıklarındaki serbest enerji yüzeylerini iki boyutlu grafikleri çizilmiş ve bunlar Şekil 6.33' de her peptid için ayrı ayrı verilmiştir.



Şekil 6.33 Farklı sıcaklıklarda PC1' e göre iki boyutlu serbest enerji yüzeyleri a) PeptidI b) PeptidII ve c) PeptidIII.

Şekil 6.33.a' dan görüldüğü gibi PeptidI için en düşük minimumun  $PC1 \approx 0.5$  nm civarında gözlenmiştir. Bu peptid için  $0.25 < PC1 < 0.6$  ve  $-0.6 < PC1 < -0.3$  aralığında konumlanmış iki belirgin minimum seçilmiştir. Yapılan hesaplamalarda her iki bölge için de çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşleri şeklindeki ikincil yapı formlarının baskın olduğu belirlenmiştir. İkinci bölgedeki ortalama beta dönüşü yapısı popülasyonun birinci bölgeden daha fazla olduğu Çizelge 6.3' den görülmektedir. Bununla birlikte, bu bölgelere ait gözlenmiş ortalama ikincil yapılar sıcaklıkla az miktarda değişiklik göstermiştir.

Çizelge 6.3 Her üç peptid için yerel minimumlara ait ortalama yapı popülasyonları.

Peptid	PC1 (nm)	T [K]	Rastgele Sarım (%)	Kıvrılma (%)	$\beta$ -Dönüşü (%)	Heliks (%)	$\beta$ -Yaprağı (%)	$\beta$ -Köprüsü (%)
PeptidI	<b>1.min</b>	280	51.0	30.1	18.6	0.1	-	0.2
	<b>(0.25;0.6)</b>	300	48.9	28.3	22.4	-	-	0.4
	<b>2.min</b>	280	45.5	30.5	24.0	-	-	-
	<b>(-06;-0.3)</b>	300	43.6	28.1	25.9	2.4	-	-
PeptidII	<b>1.min</b>	280	63.0	15.1	15.5	6.4	-	-
	<b>(0.6;1.5)</b>	300	60.2	17.9	14.1	7.8	-	-
	<b>2.min</b>	280	61.7	36.1	2.1	0.1	-	-
	<b>(-0.4;0.0)</b>	300	62.8	33.4	3.3	0.5	-	-
	<b>3.min</b>	280	63.00	31.7	4.4	0.1	-	0.8
	<b>(-1.1;-0.3)</b>	300	60.3	26.7	8.3	2.9	-	1.8
PeptidIII	<b>4.min</b>	280	49.3	21.0	12.9	-	0.1	16.6
	<b>(-1.4;-1.1)</b>	300	50.0	22.0	11.6	-	0.1	16.3
	<b>1.min</b>	280	56.0	20.4	15.3	-	-	8.3
	<b>(0.6;0.9)</b>	300	49.9	26.9	12.7	-	-	10.5
	<b>2.min</b>	280	58.8	32.9	6.1	1.1	1.1	-
	<b>(0.2;0.6)</b>	300	58.4	30.5	7.6	2.0	1.4	0.1
PeptidIII	<b>3.min</b>	280	49.0	24.4	10.0.	16.5	-	0.1
	<b>(-1.2;-0.4)</b>	300	53.7	25.6	8.0	12.6	-	0.1
PeptidIII	<b>4.min</b>	280	67.5	19.7	2.2	10.6	-	-
	<b>(-1.7;-1.2)</b>	300	67.7	23.8	1.6	6.9	-	-

PeptidII için Şekil 6.33.b' den görülebileceği gibi serbest enerji yüzeyi, özellikle düşük sıcaklıklarda, birkaç yerel minimuma sahiptir ve en derin vadi PC1 $\approx$  -0.6 nm civarında yerleşmiştir. Ek olarak, 280, 300 ve 319 K'deki eğriler benzer davranış gösterirken, 501 K'deki eğrilerin yayvanlaştığı görülmektedir. Minimumlara göre bu peptidin yapısal eğilimlerini belirlemek amacıyla 0.6 <PC1< 1.5, -0.4 <PC1< 0, -1.1 <PC1< -0.3 ve -1.4 <PC1< -1.1 aralığına düşen 4 ayrı bölge seçilmiş ve bu bölgelere ait konformasyonların ikincil yapıları ve bunların yüzde oranları hesaplanarak Çizelge 6.3' te verilmiştir. Çizelgeden PeptidII için, her bölgede çoğunlukla gözlenen ikincil yapının rastgele sarım olmasına karşın birinci bölgede diğer bölgelere kıyasla heliks yapının daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. Ayrıca, birinci bölgedeki beta dönüşü ve kıvrılma yapılarının popülasyonları

birbirine daha yakın çıkmıştır. İkinci ve üçüncü bölgedeki kıvrılma yapıları oranları daha yüksekken, beta dönüşü yapısı oaranının diğerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, 4. bölge için önemli ölçüde  $\beta$ -köprüsü yapısı ve az miktarda  $\beta$ -yaprağı yapısı tespit edilmiştir.

Şekil 6.33.c' den PeptidIII için  $PC1 \approx 0.25$  nm civarında minimum serbest enerji tespit edilmiş ve belirgin minimumları  $0.6 < PC1 < 0.9$ ,  $0.2 < PC1 < 0.6$ ,  $-1.2 < PC1 < -0.4$  ve  $-1.7 < PC1 < -1.2$  değerleri aralıklarında belirlenmiştir. PeptidIII için Çizelge 6.3' te verilen bu bölgelere ait ortalama ikincil yapı popülasyonlarına bakıldığında, 3. ve 4. bölgelerdeki heliks yapı oranlarının diğer bölgelere göre çok daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. Ayrıca en yüksek  $\beta$ -köprüsü popülasyonu 1. bölgede bulunmuştur ve  $\beta$ -yaprağı yapıları yalnızca 2. bölgede gözlenmiştir.

#### 6.4 TEKRARLI PEPTİD DİZİLİMLERİNİN MD SİMÜLASYONLARI

Bölüm 6.2 ve 6.3' de MD ve REMD simülasyon sonuçları verilen PeptidII ve PeptidIII' ün aminoasit dizilimlerinin her birinin ayrı ayrı birbiri ucuna ikili ve üçlü dizimler şeklinde eklenmesi yoluyla SEB'e olan afinitesininin değişip değişmediğinin tespiti yönünde yapılan deneysel çalışmalara destek vermek amacıyla, bu tekrarlı dizilimlerin de MD ve REMD simülasyonları tarafımızdan yapılmıştır. İlgilenilen peptidler aşağıda aminoasit dizilimleri verilen, PeptidII'nin ikili (PeptidIIM2) ve üçlü (PeptidIIM3) ve PeptidIII'ün ikili (PeptidIIIM2) tekrarlı dizilimleridir ve bu bölümde bu peptidlerin klasik MD sonuçları sunulacaktır. REMD simülasyon sonuçları ise bir sonraki bölümde verilecektir.

- PeptidIIM2: Leu-Leu-Ala-Asp(-)-Thr-Thr-His-His-Arg(+)-Pro-Trp-Thr-Leu-Leu-Ala-Asp(-)-Thr-Thr-His-His-Arg(+)-Pro-Trp-Thr
- Peptid IIM3: Leu-Leu-Ala-Asp(-)-Thr-Thr-His-His-Arg(+)-Pro-Trp-Thr-Leu-Leu-Ala-Asp(-)-Thr-Thr-His-His-Arg(+)-Pro-Trp-Thr-Leu-Leu-Ala-Asp(-)-Thr-Thr-His-His-Arg(+)-Pro-Trp-Thr
- PeptidIIM2: Leu-Gln-Gly-Phe-Trp-GlnThr-Asp(-)-Ala-Ser-Tyr-Arg(+)-Leu-Gln-Gly-Phe-Trp-GlnThr-Asp(-)-Ala-Ser-Tyr-Arg(+)

### **6.4.1 Metot**

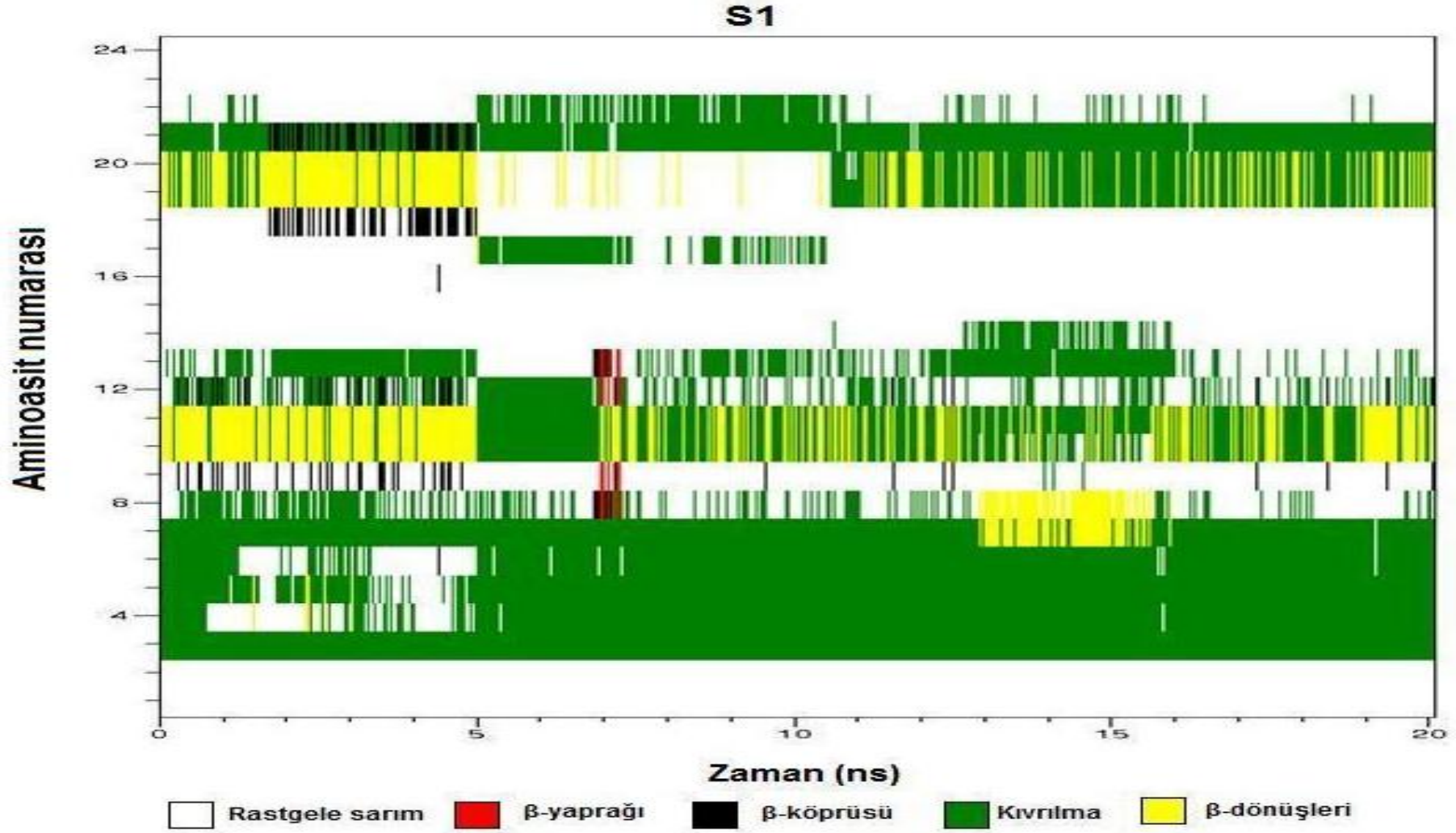
Çalışmamızın bu kısmında klasik MD simülasyonlarındaki yerel minimumlara takılma probleminin üstesinden gelebilmek amacıyla simülasyonu yapılan peptid dizilimlerinin başlangıç yapılarının farklı seçilmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla, Bölüm 6.2' de ayrıntıları verilen vakum aşamasındaki tavlama işlemi iki farklı yoldan yapılmıştır. İlkinde ilgilenilen peptid 1000 K sıcaklıktan bir takım yollarla 300 K sıcaklığa, diğerinde ise yine aynı yollardan 1000 K sıcaklıktan 600 K sıcaklığa soğutulmuştur. Vakum aşamasındaki bu simülasyonlar sonunda, yığın (cluster) analizi (van der Spoel et al 2005) yapılarak her iki sıcaklıktan en çok ziyaret edilen dörder farklı yapı seçilerek çözücü ortamına konulmuş ve normal MD simülasyonlarımız her peptid dizilimi için toplam sekiz ayrı başlangıç yapısından devam ettirilmiştir. MD simülasyonlarının devamında izlenen yol Bölüm 6.2' de anlatılan simülasyon metotları ve detayları kısmında verildiği gibidir. Ancak farklı olarak bu yeni simülasyonlar 20 ns üretim aşamasında gerçekleştirilmiştir.

Bundan sonra sunum sadeliği açısından, vakum aşamasında 300 K sıcaklığa soğutulmuş sistemden seçilen dört farklı başlangıç yapısı ile devam ettirilmiş simülasyonlar S1,S2,S3 ve S4 olarak, 600 K sıcaklığa soğutulmuş sistemden seçilenler ise S5,S6,S7 ve S8 olarak adlandırılacaktır.

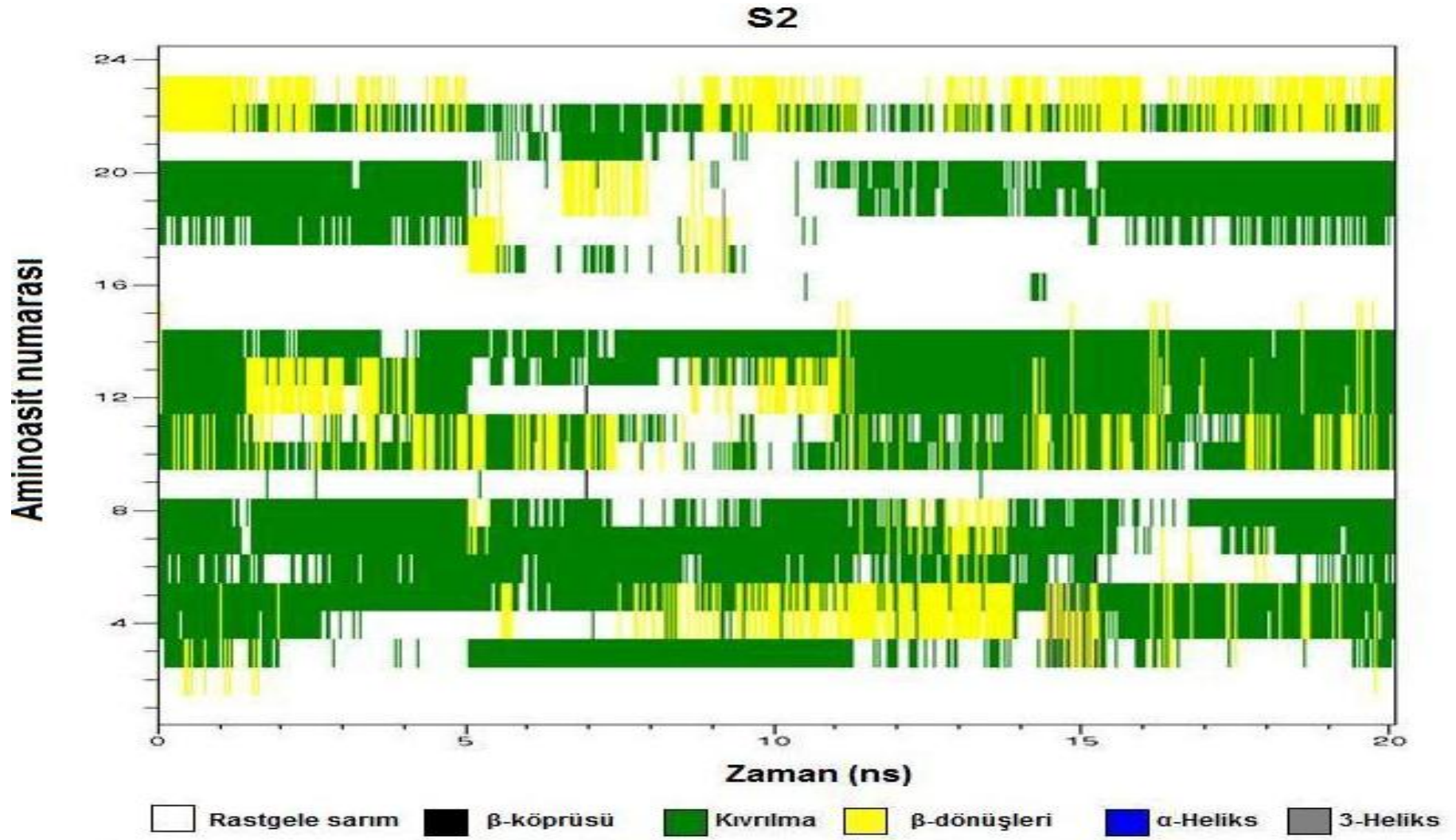
### **6.4.2 Sonuç ve Analizler**

#### **6.4.2.1 İkincil Yapı Analizleri**

İlk olarak sistem tarafından ziyaret edilen konfigürasyonlar hakkında bilgi almak amacıyla, her peptid için yapılan 8 farklı başlangıç yapıları MD simülasyonlarının yörünge dosyalarından DSSP protokolü ile ikincil yapı değişimleri analiz edilmiştir. DSSP sonuçları Şekil 6.34-57 her peptid ve farklı başlangıç yapıları için ayrı ayrı verilmektedir.



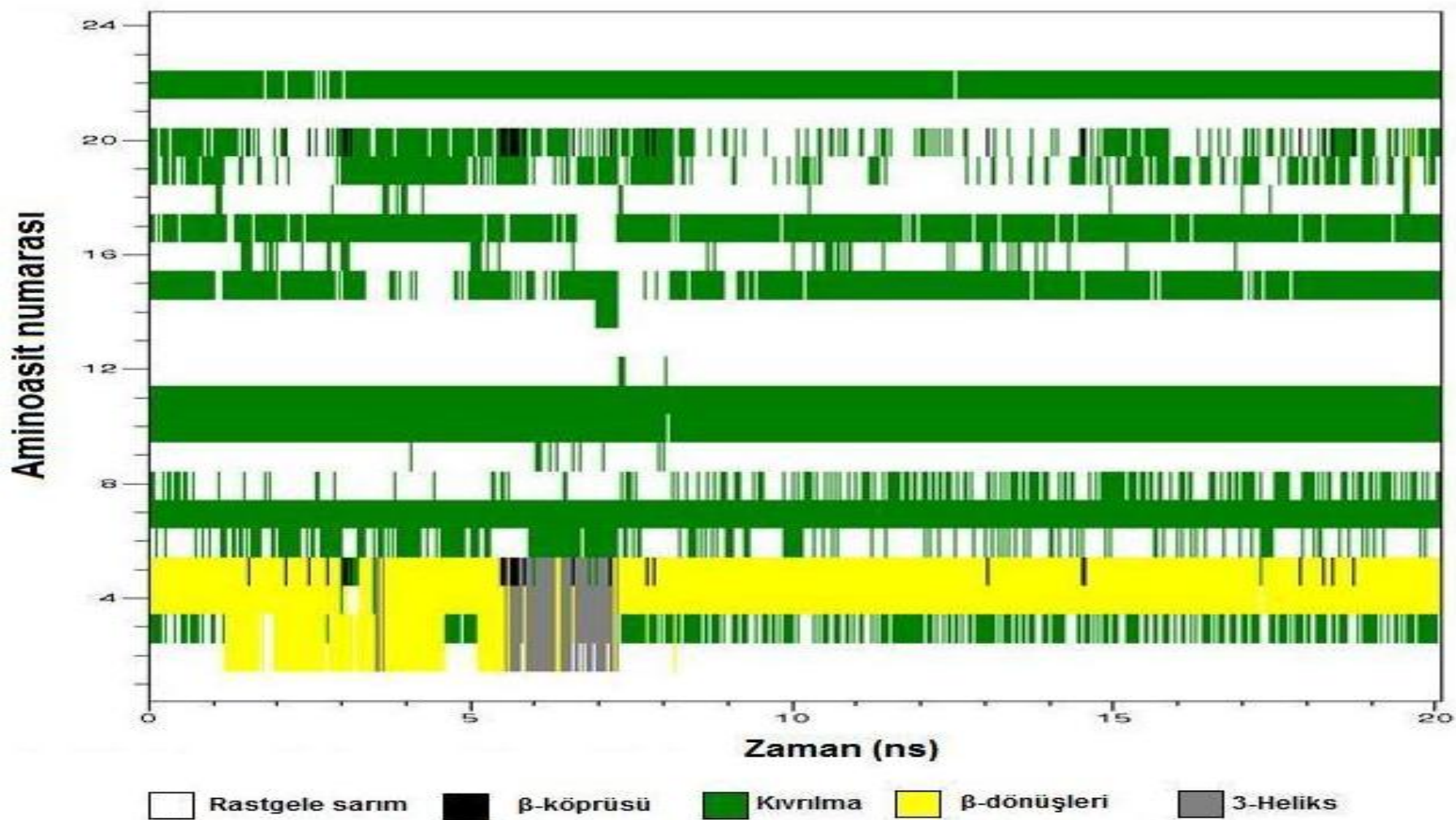
Şekil 6.34 PeptidiIM2 için S1 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



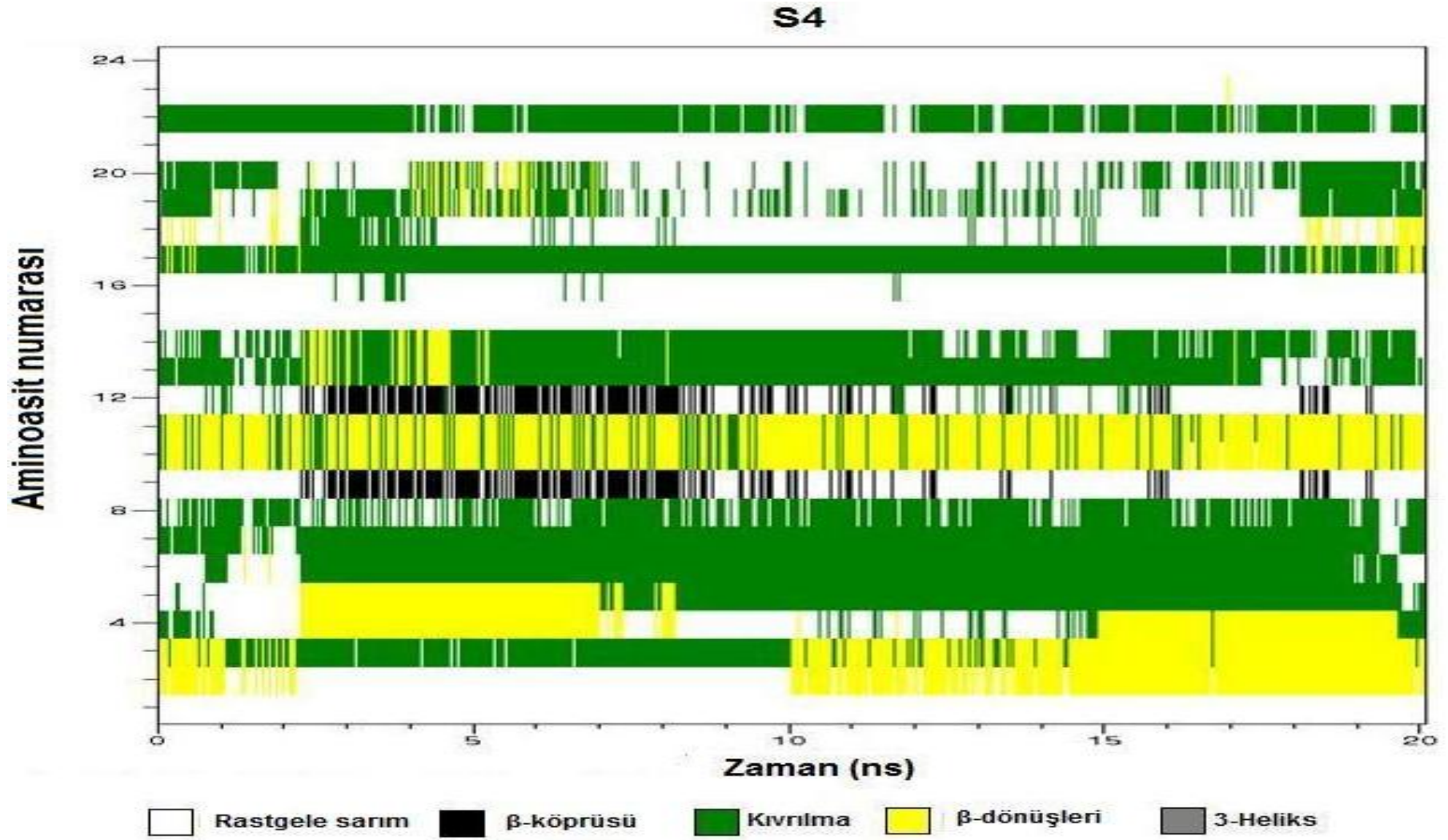
Şekil 6.35 PeptidiIM2 için S2 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



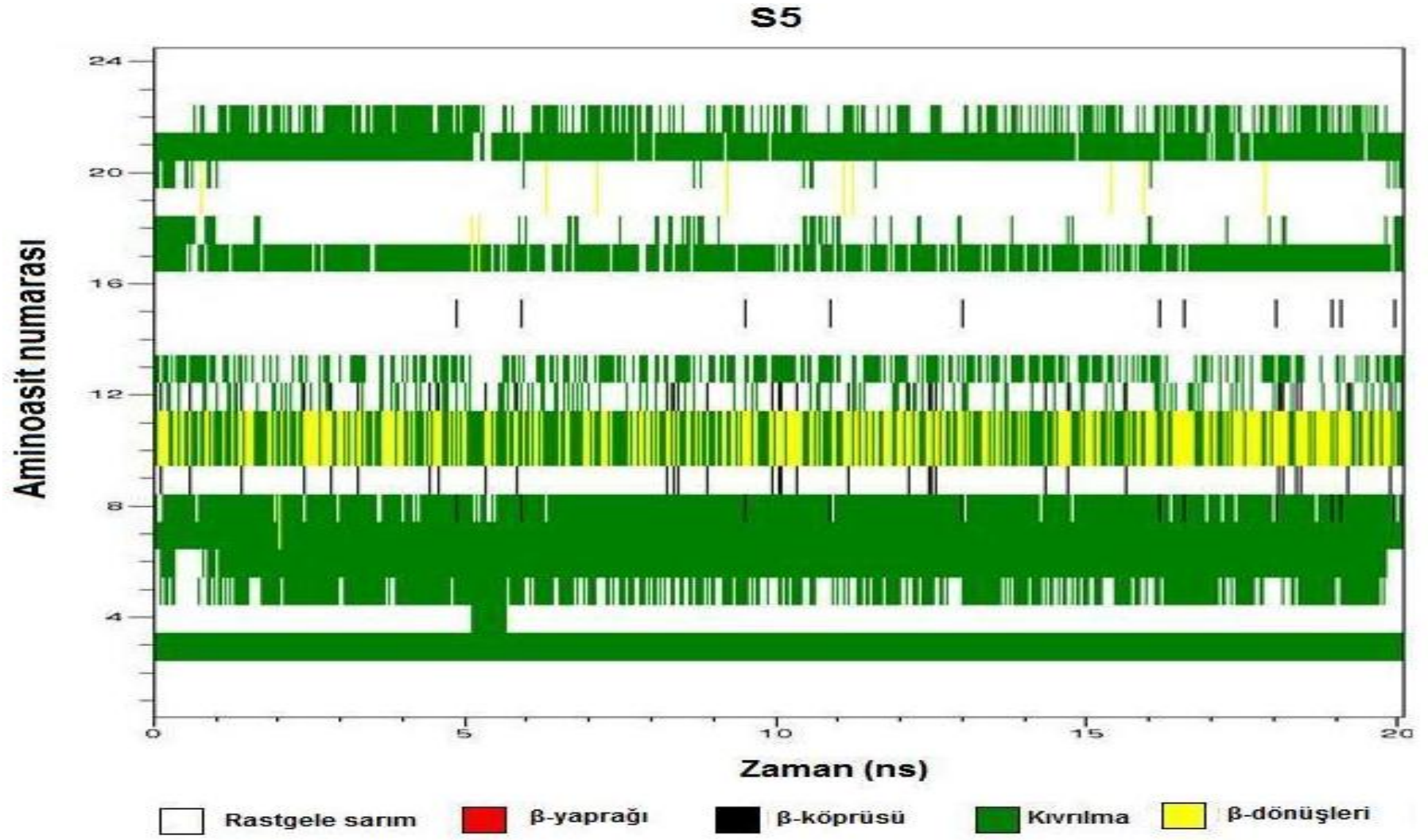
S3



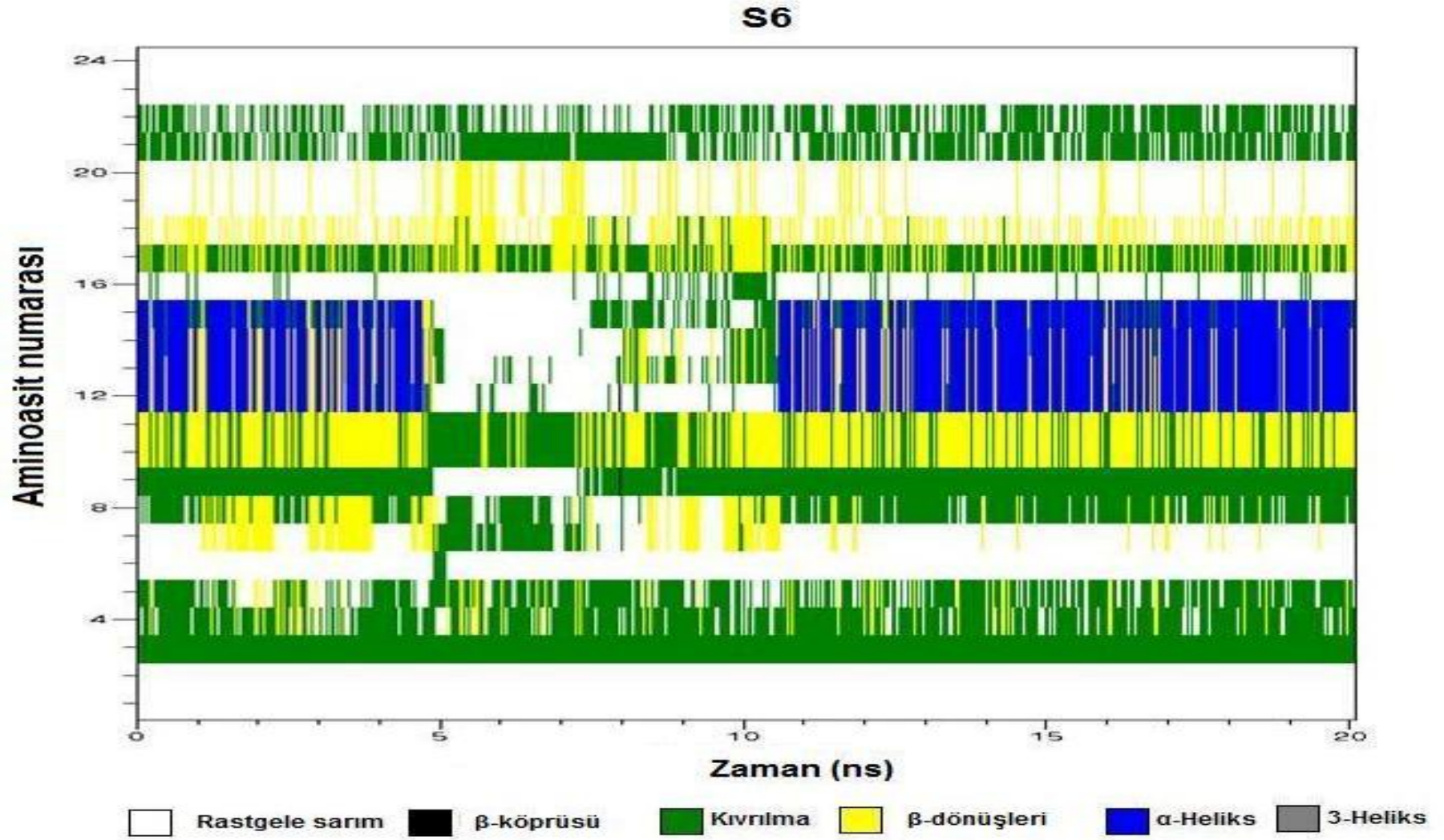
Şekil 6.36 PeptidIIM2 için S3 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



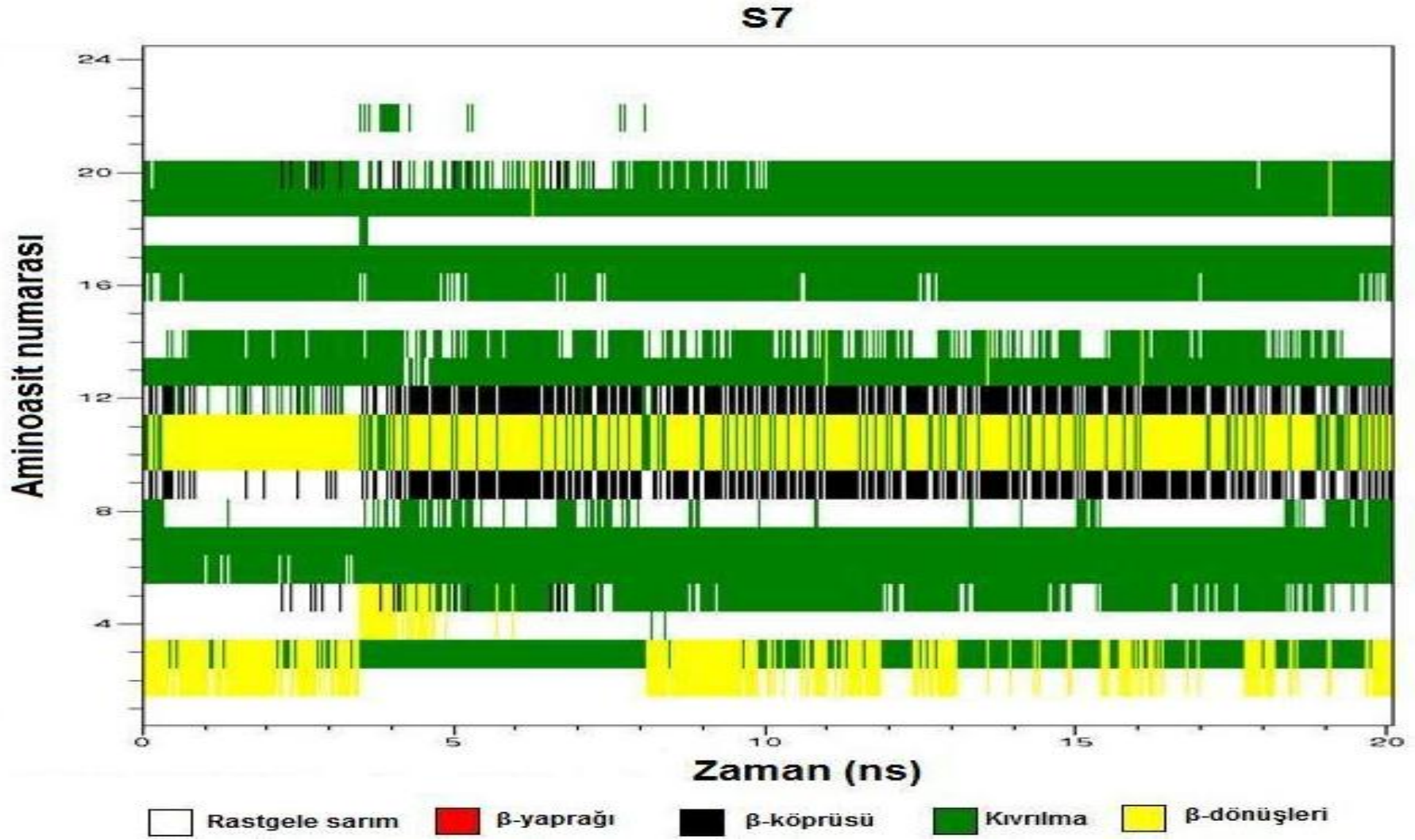
Şekil 6.37 PeptidIIM2 için S4 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



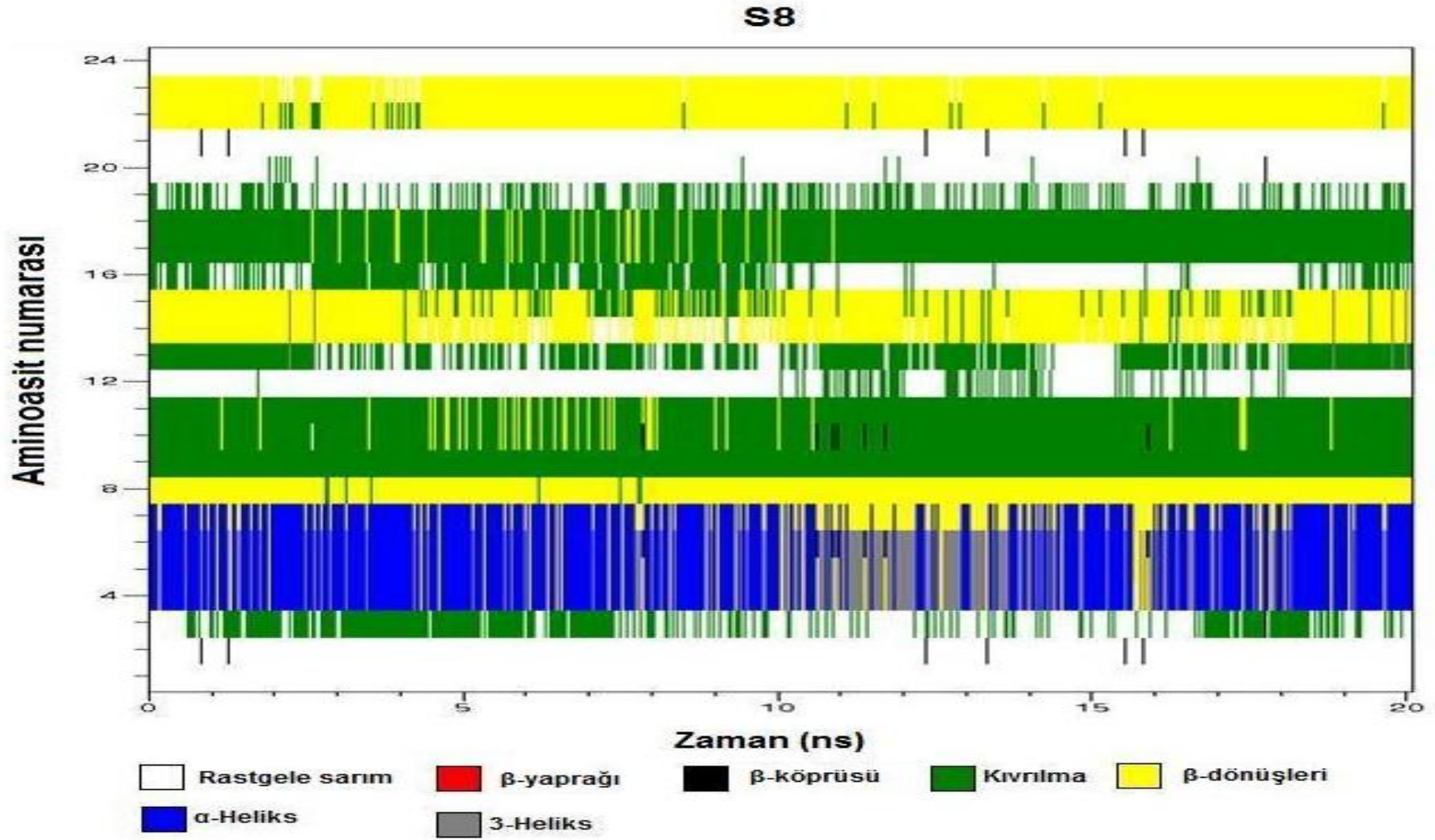
Şekil 6.38 PeptidIIM2 için S5 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



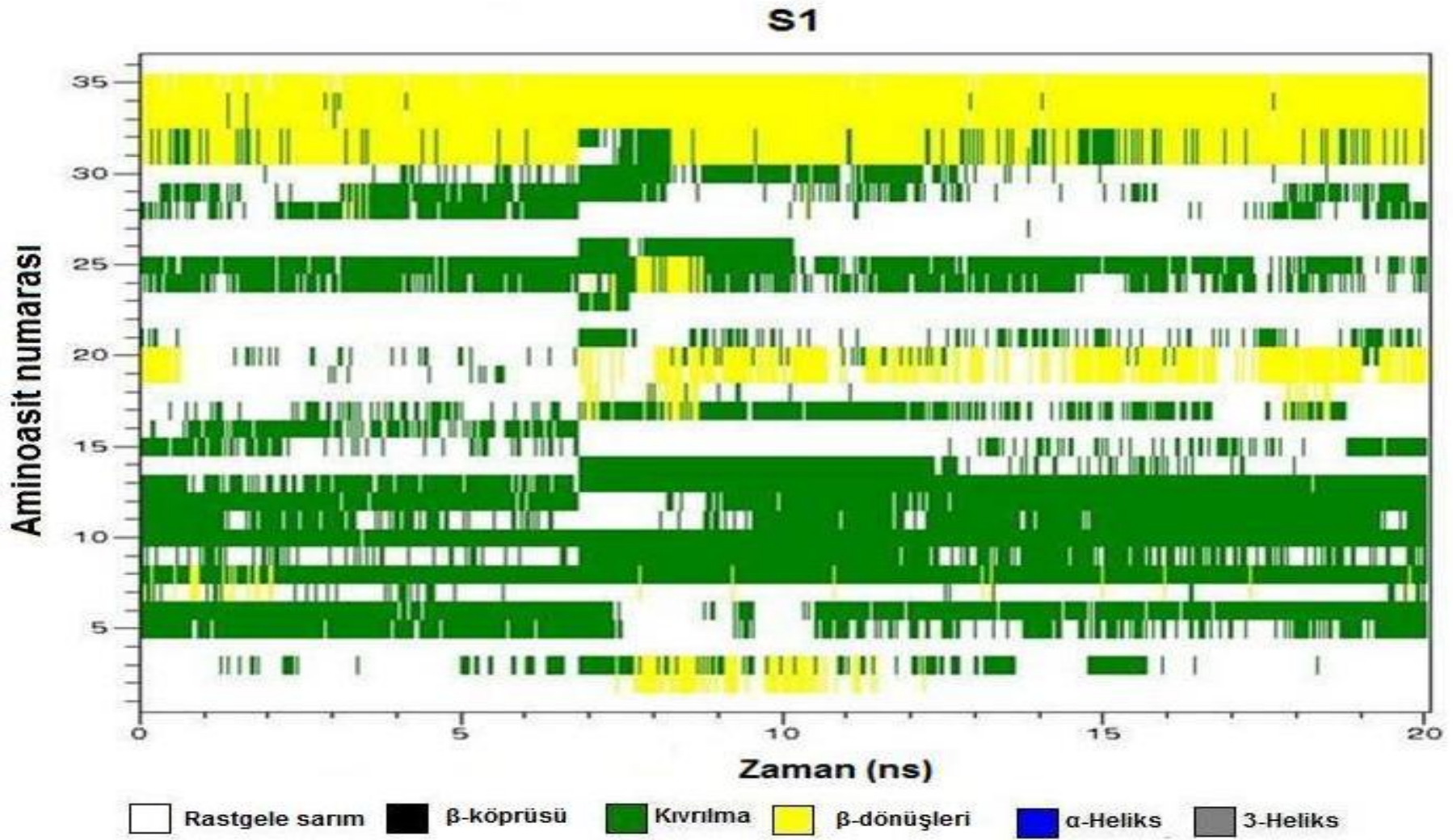
Şekil 6.39 PeptidiiM2 için S6 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



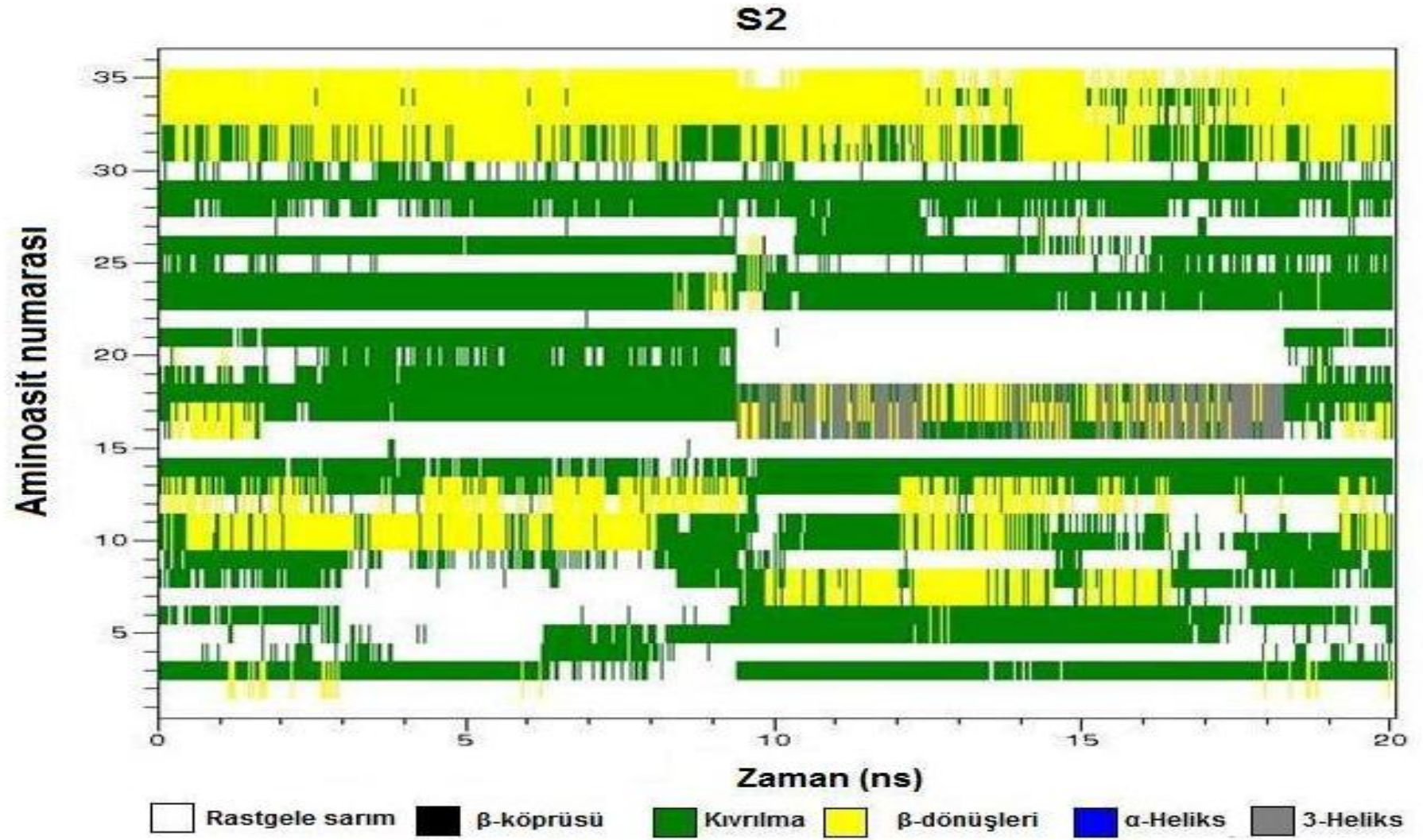
Şekil 6.40 PeptidIIM2 için S7 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.41 PeptidIIM2 için S8 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

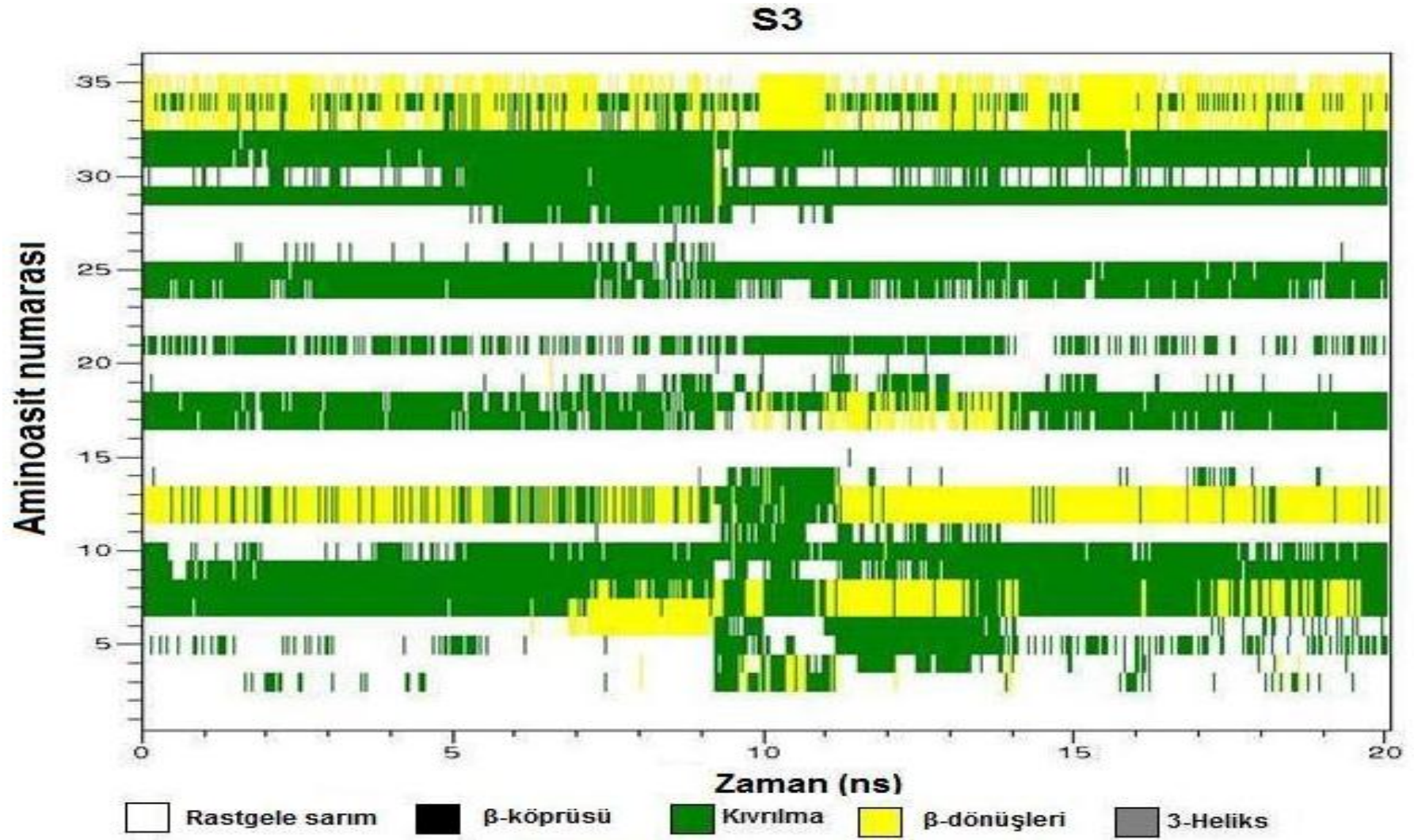


Şekil 6.42 PeptidIIM3 için S1 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

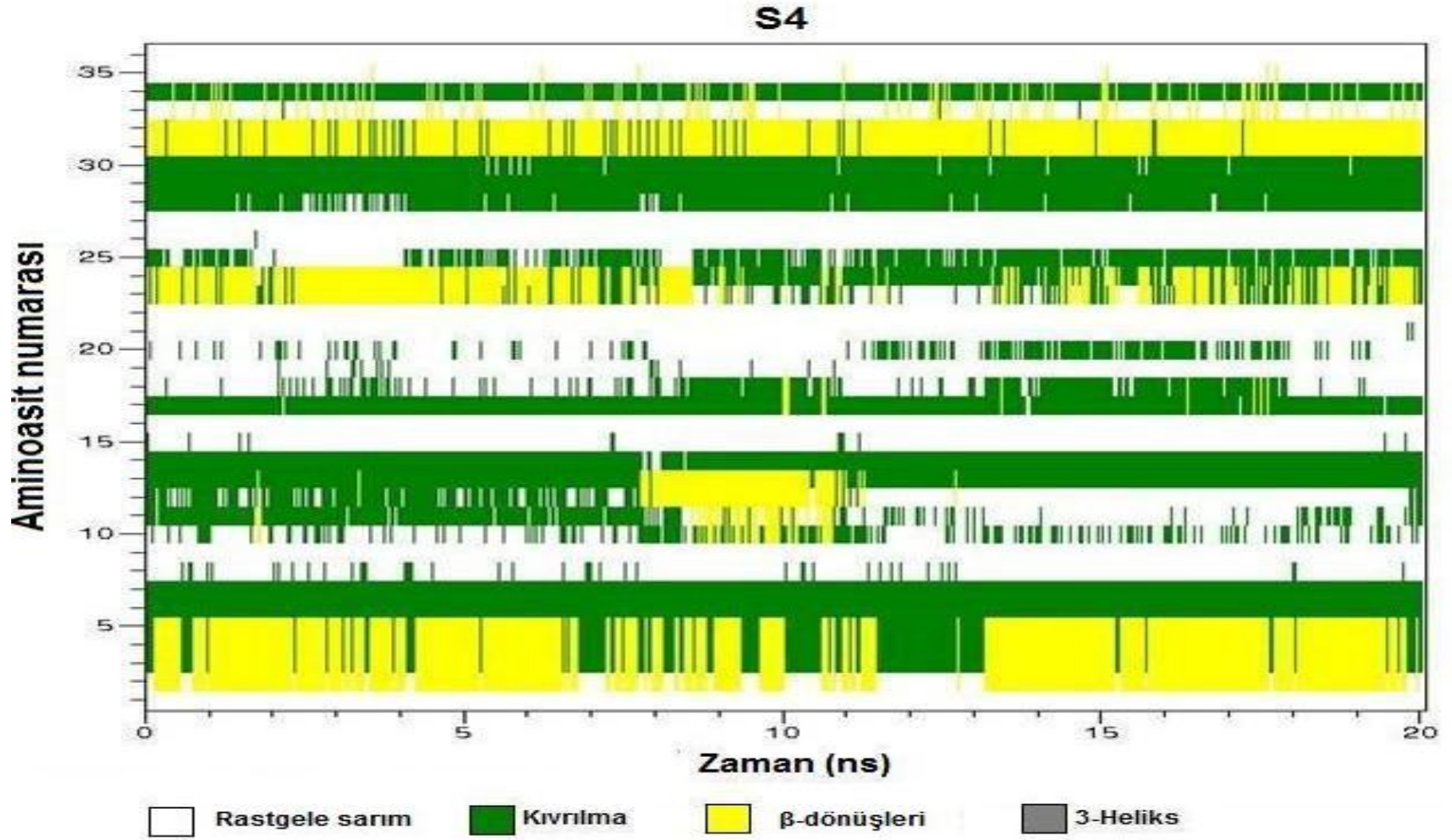


Şekil 6.43 PeptidiIM3 için S2 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

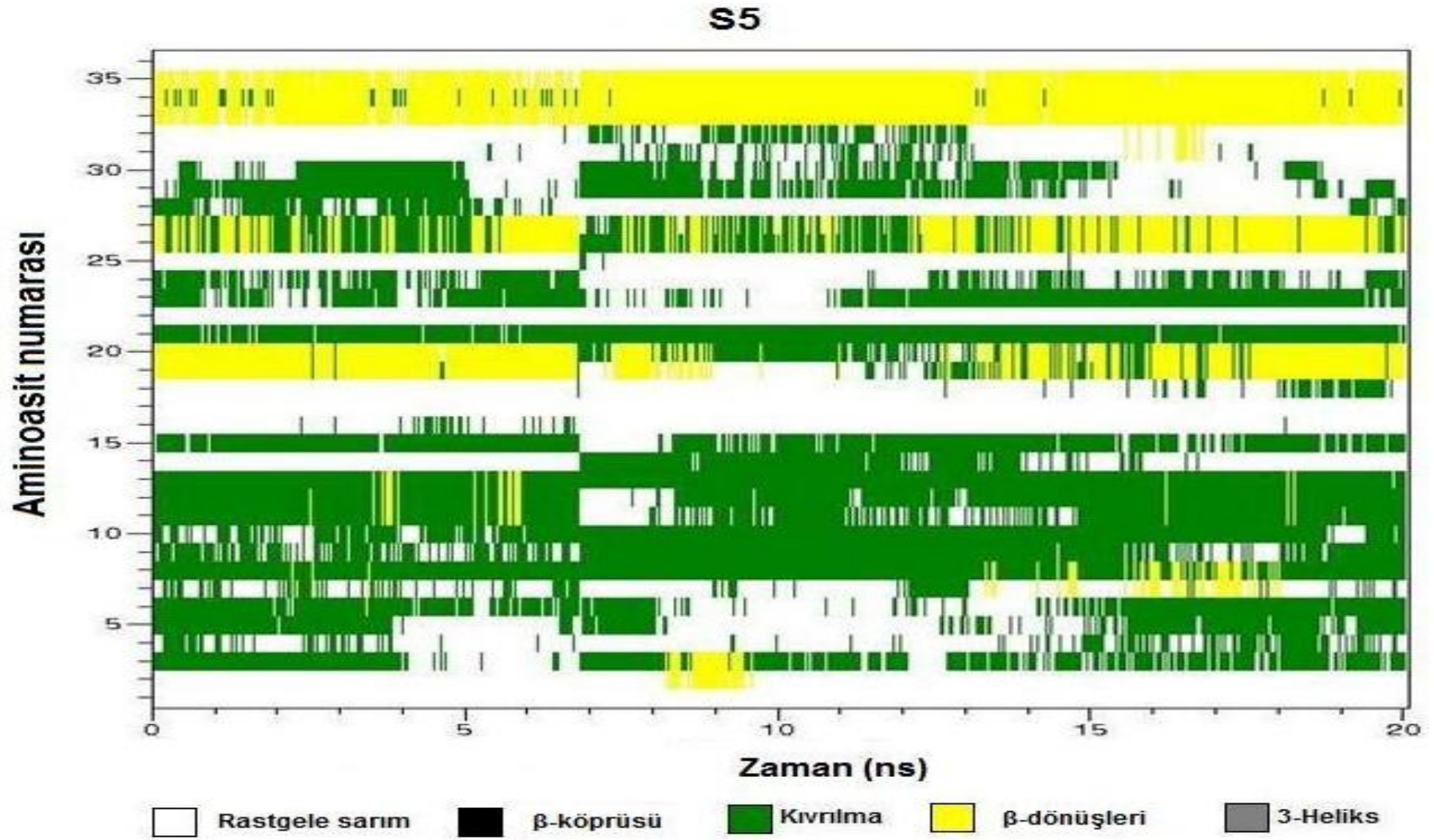




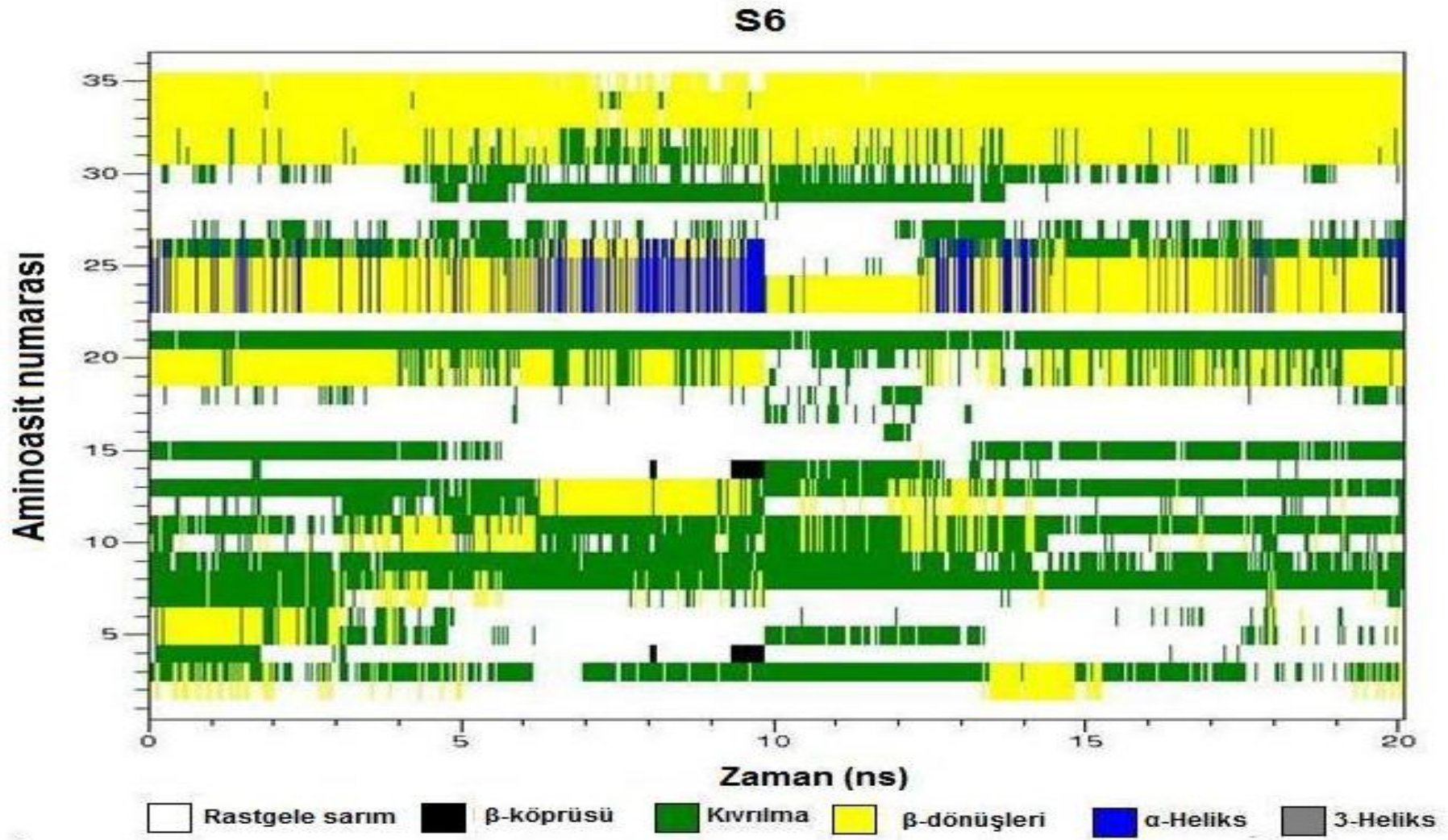
Şekil 6.44 PeptidiiM3 için S3 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



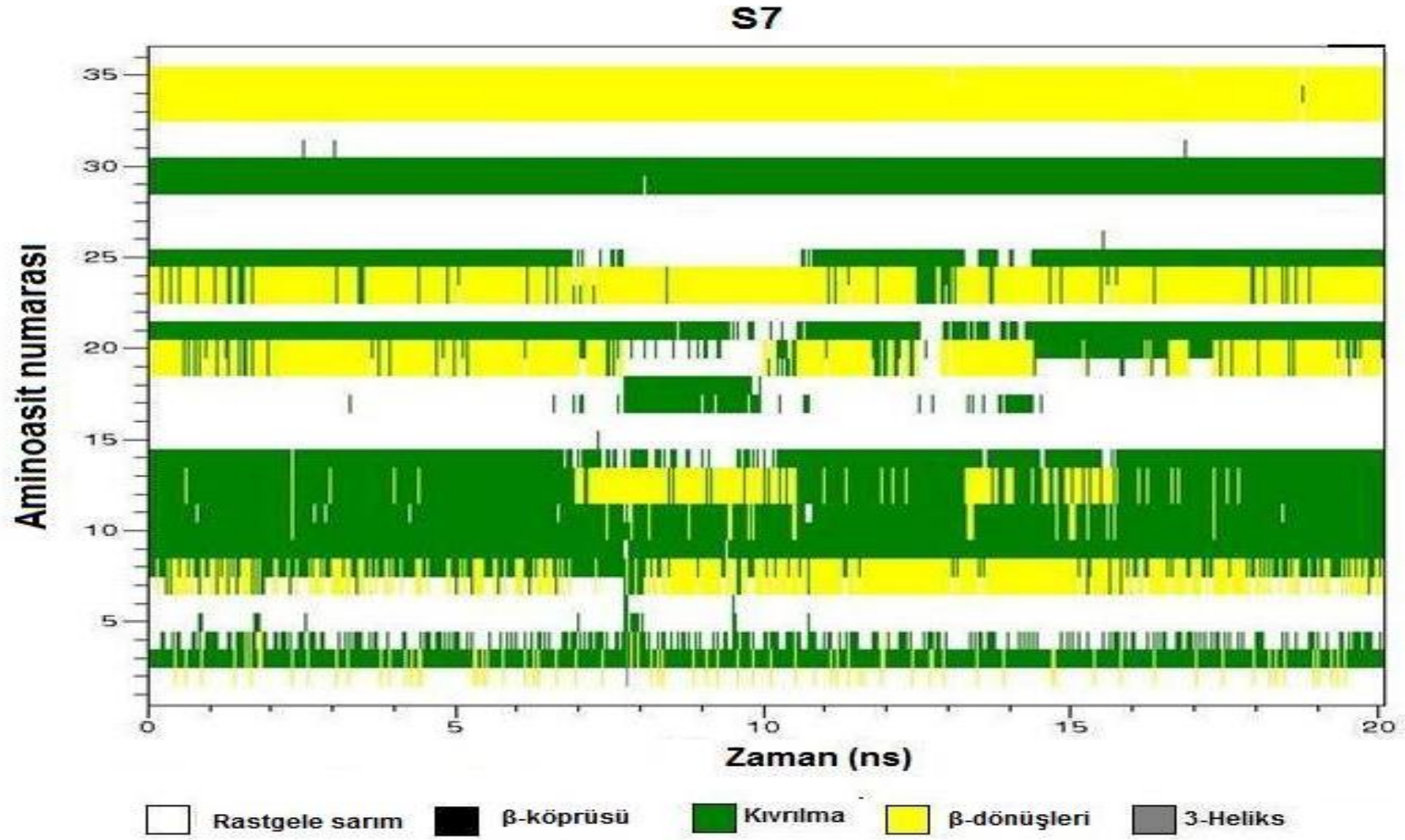
Şekil 6.45 PeptidIIM3 için S4 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



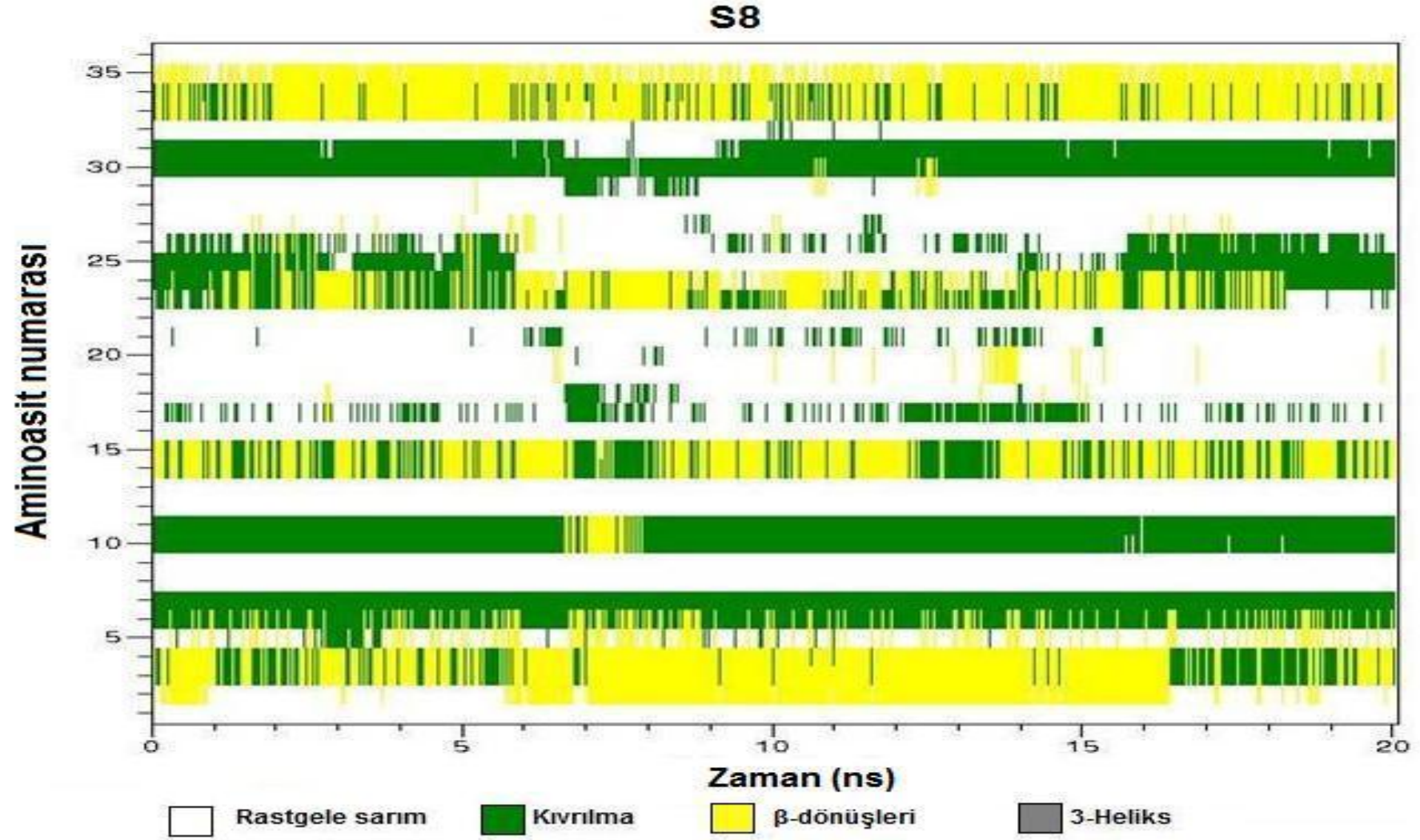
Şekil 6.46 PeptidiiM3 için S5 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



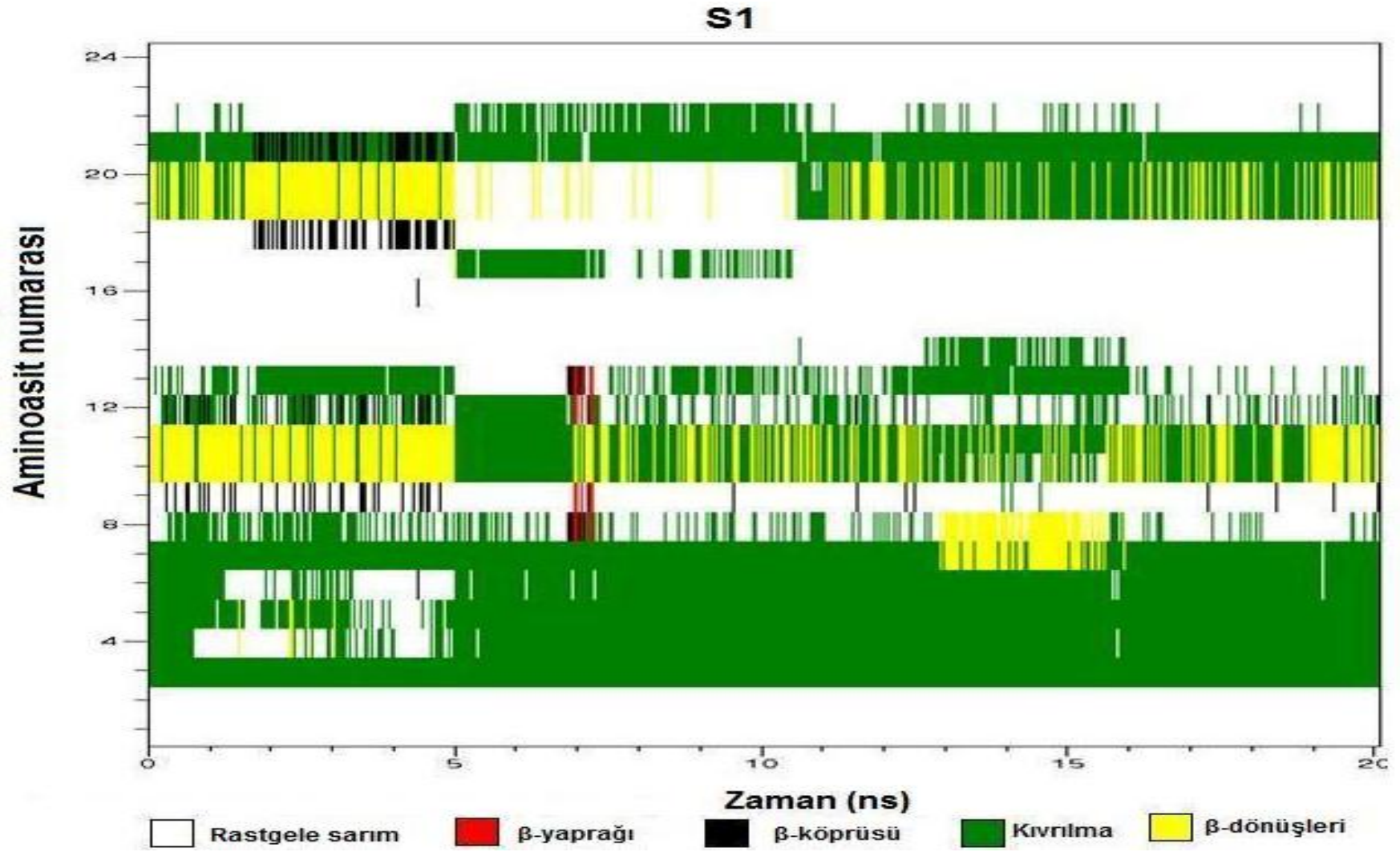
Şekil 6.47 PeptidIIM3 için S6 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



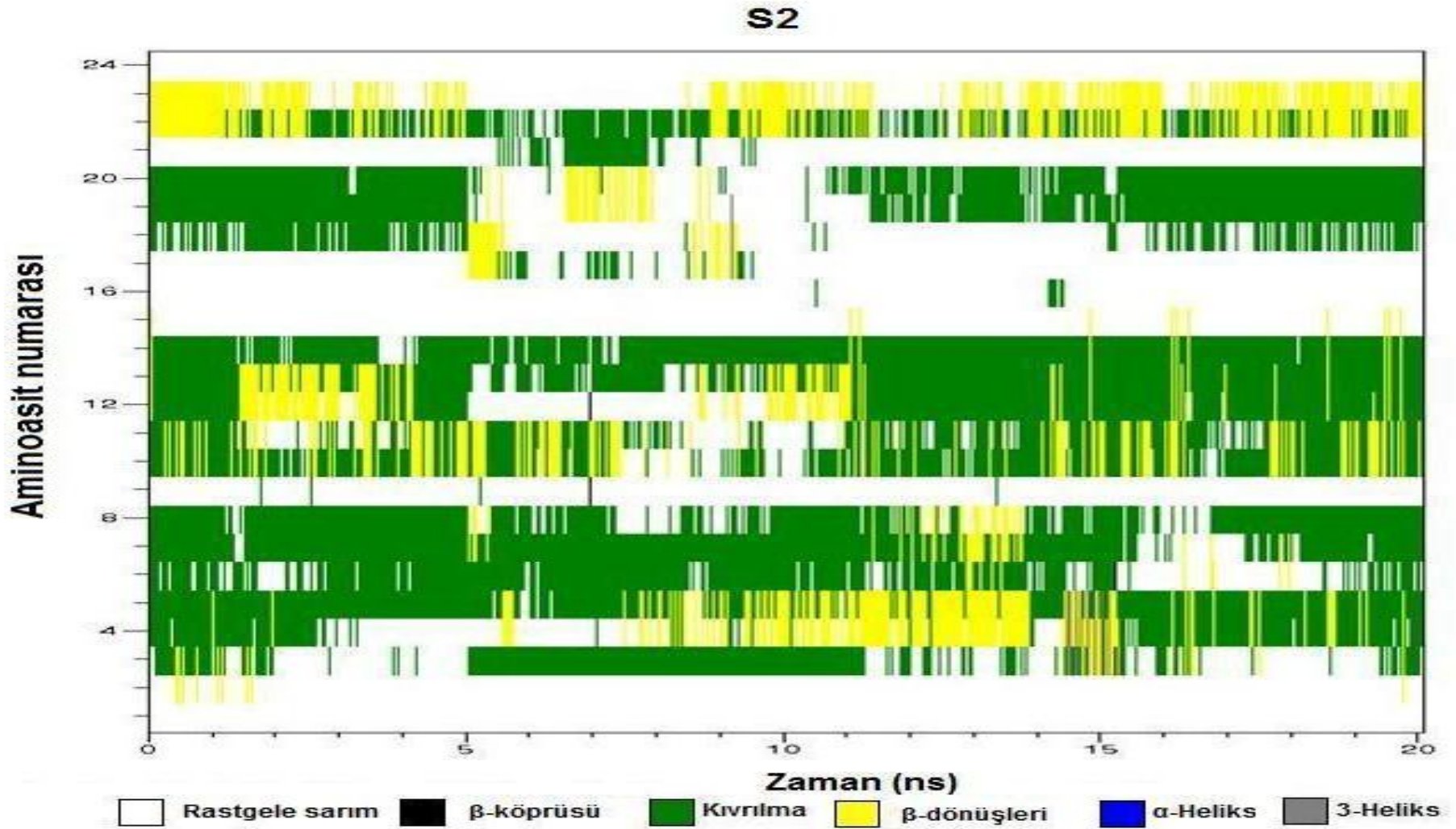
Şekil 6.48 PeptidIIM3 için S7 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.49 PeptidIIM3 için S8 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

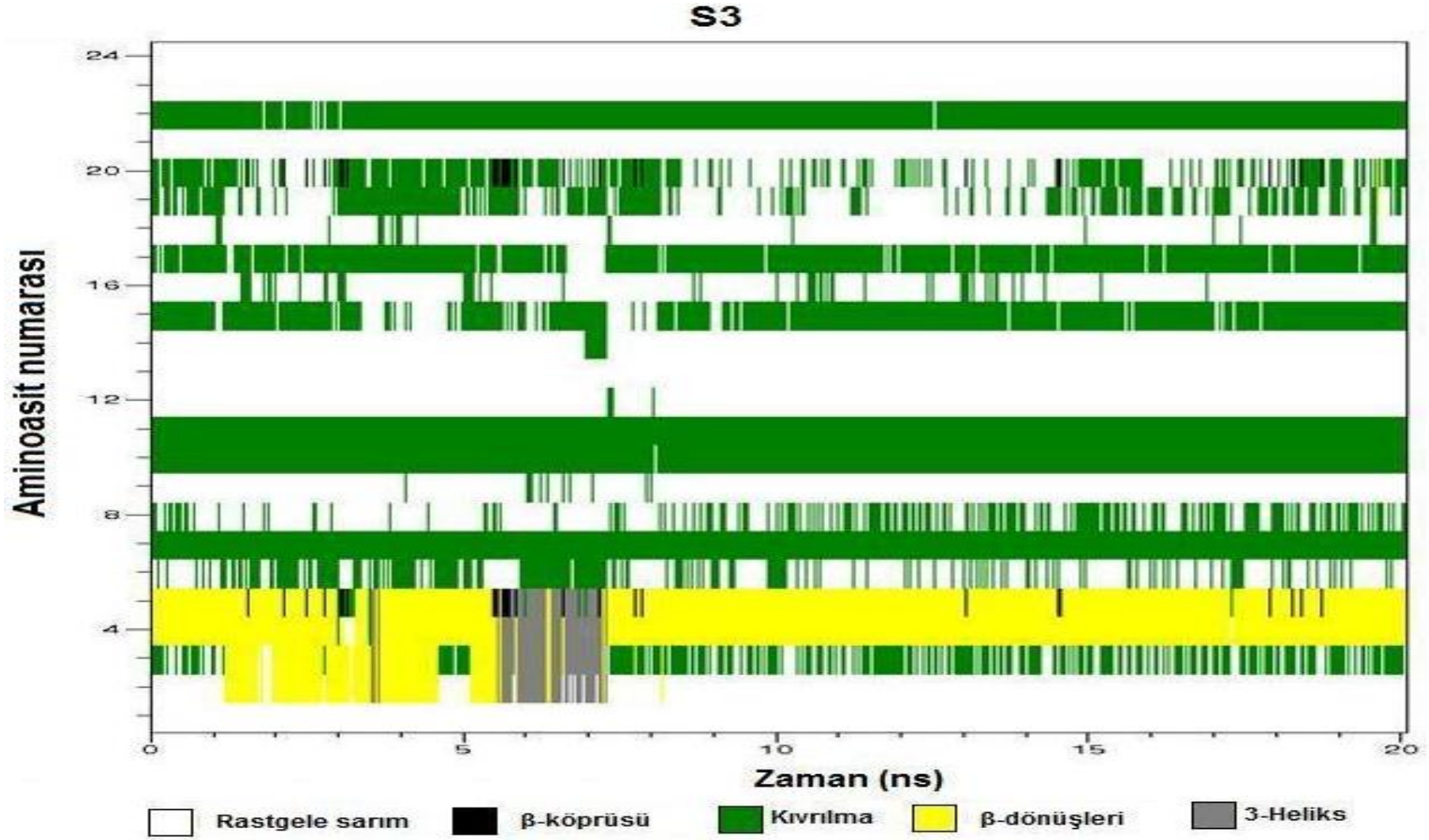


Şekil 6.50 PeptidIIIM2 için S1 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



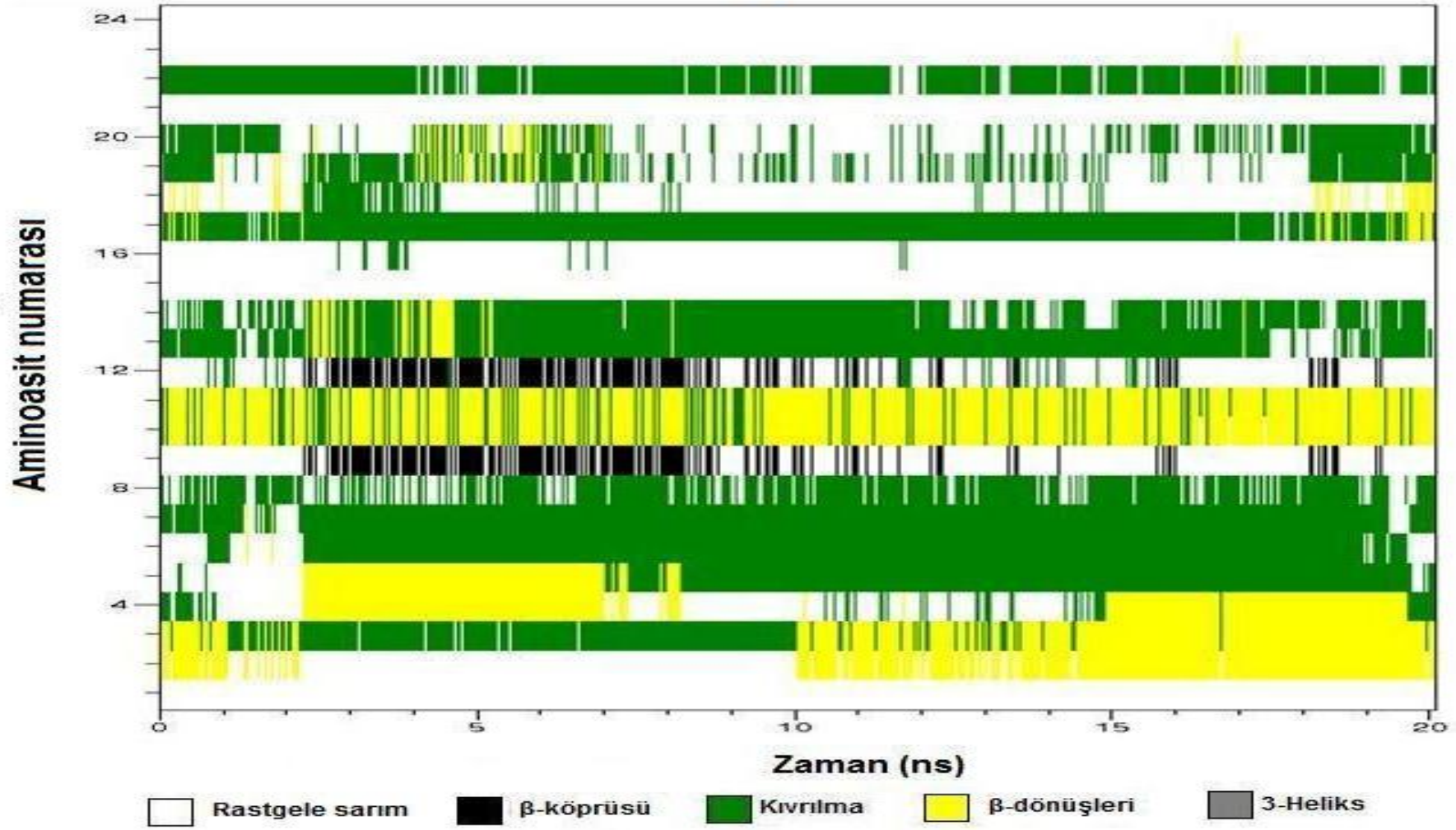
Şekil 6.51 PeptidIIIM2 için S2 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



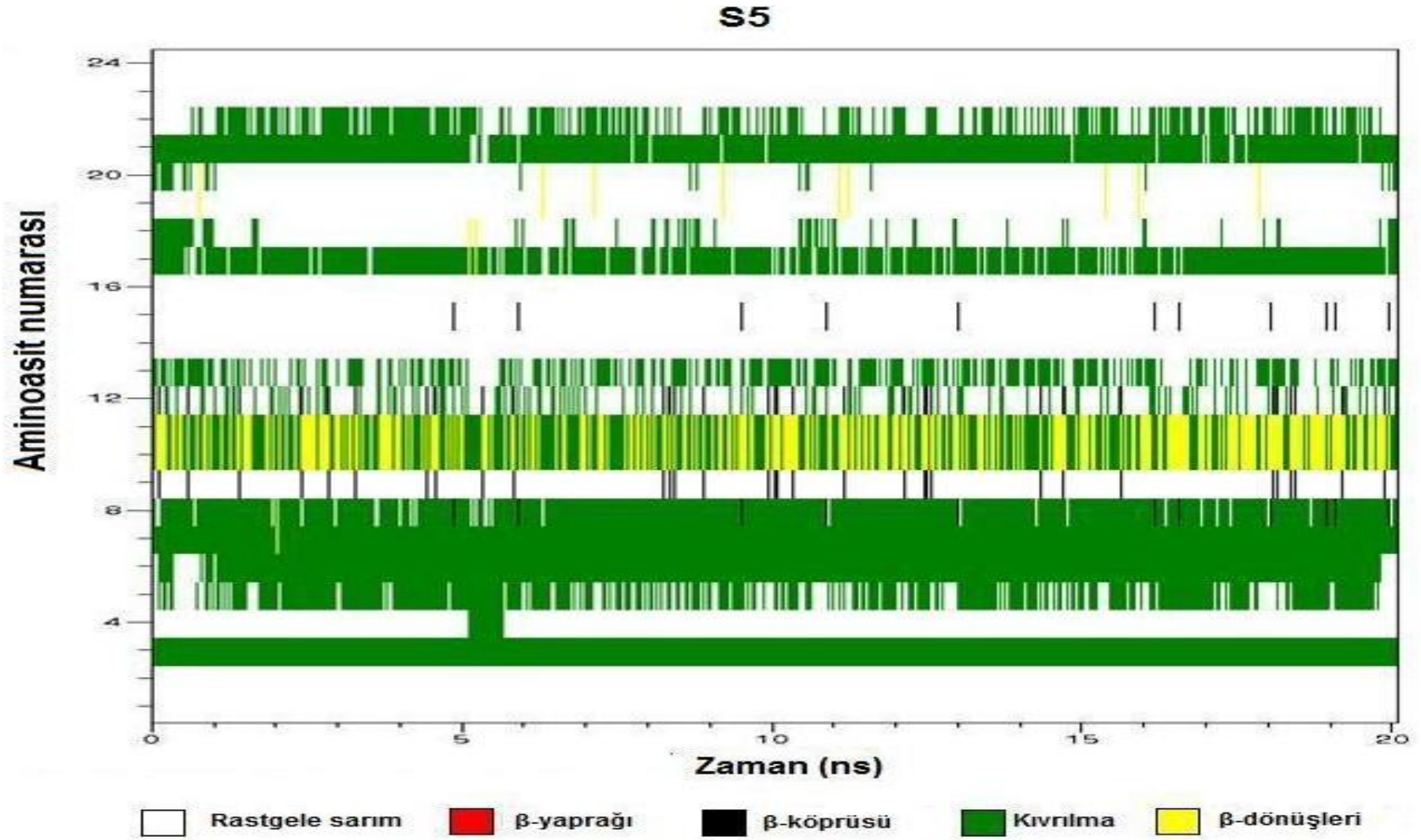


Şekil 6.52 PeptidIIIM2 için S3 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

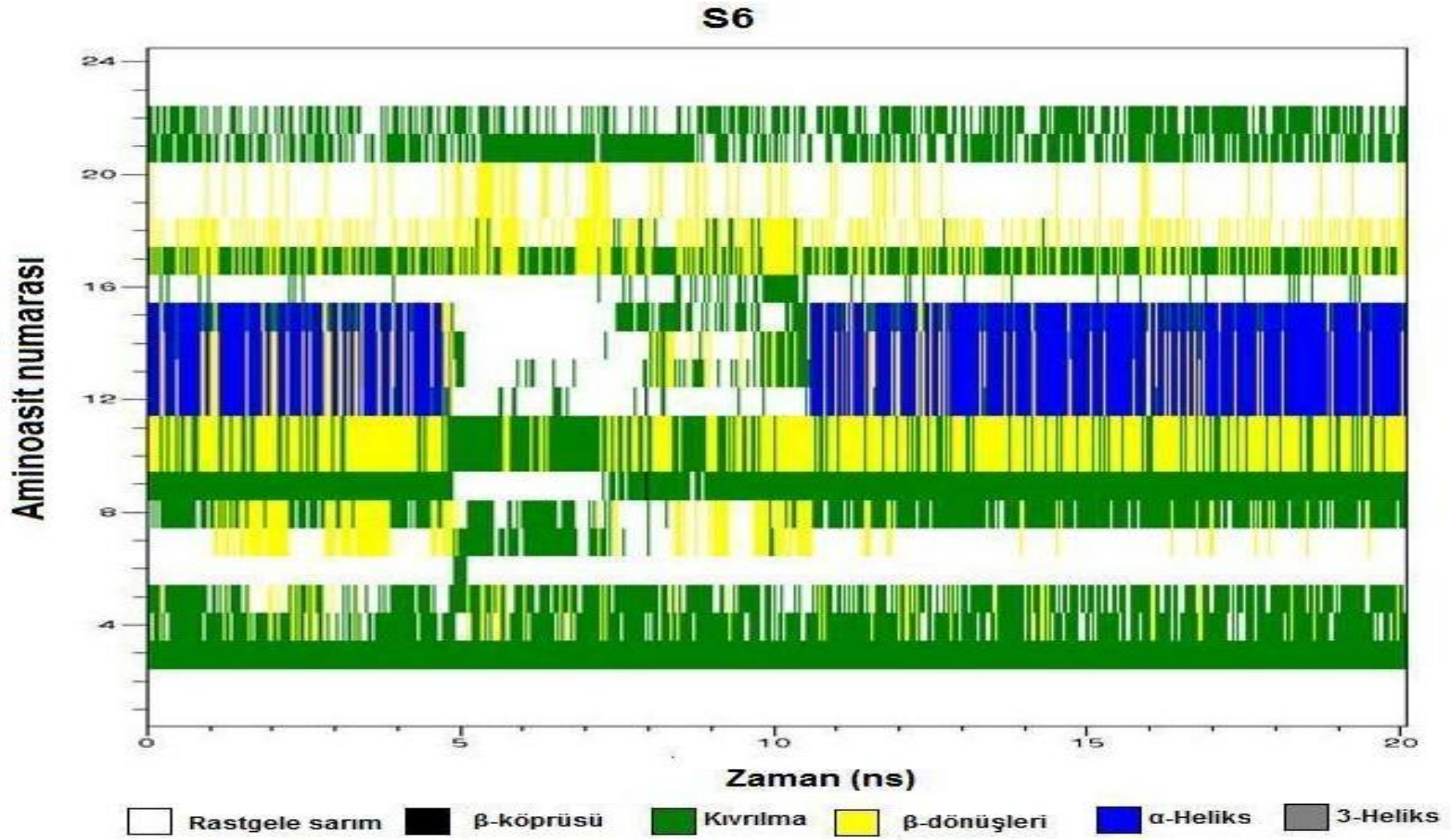
S4



Şekil 6.53 PeptidIIIM2 için S4 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

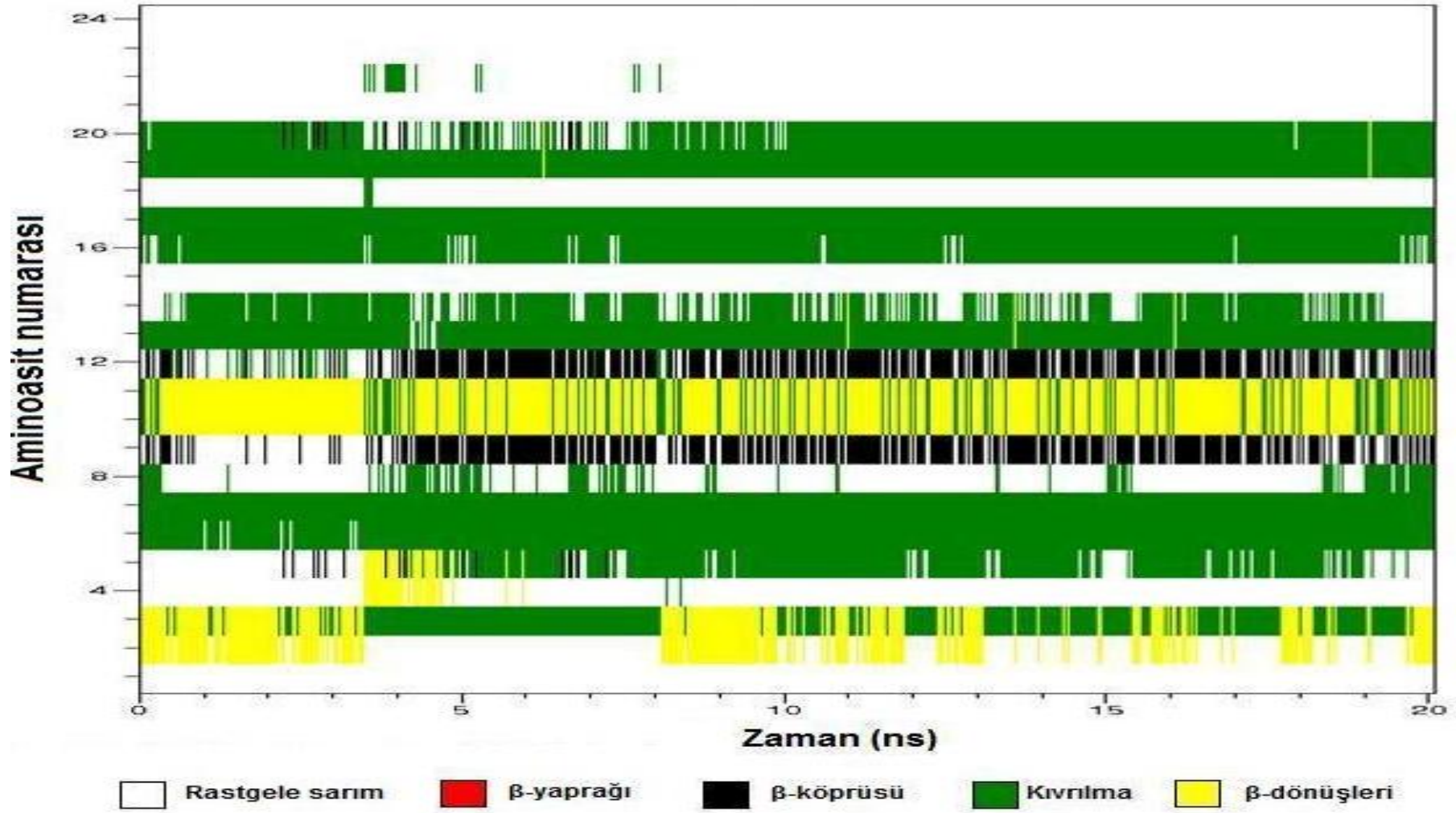


Şekil 6.54 PeptidIIIM2 için S5 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

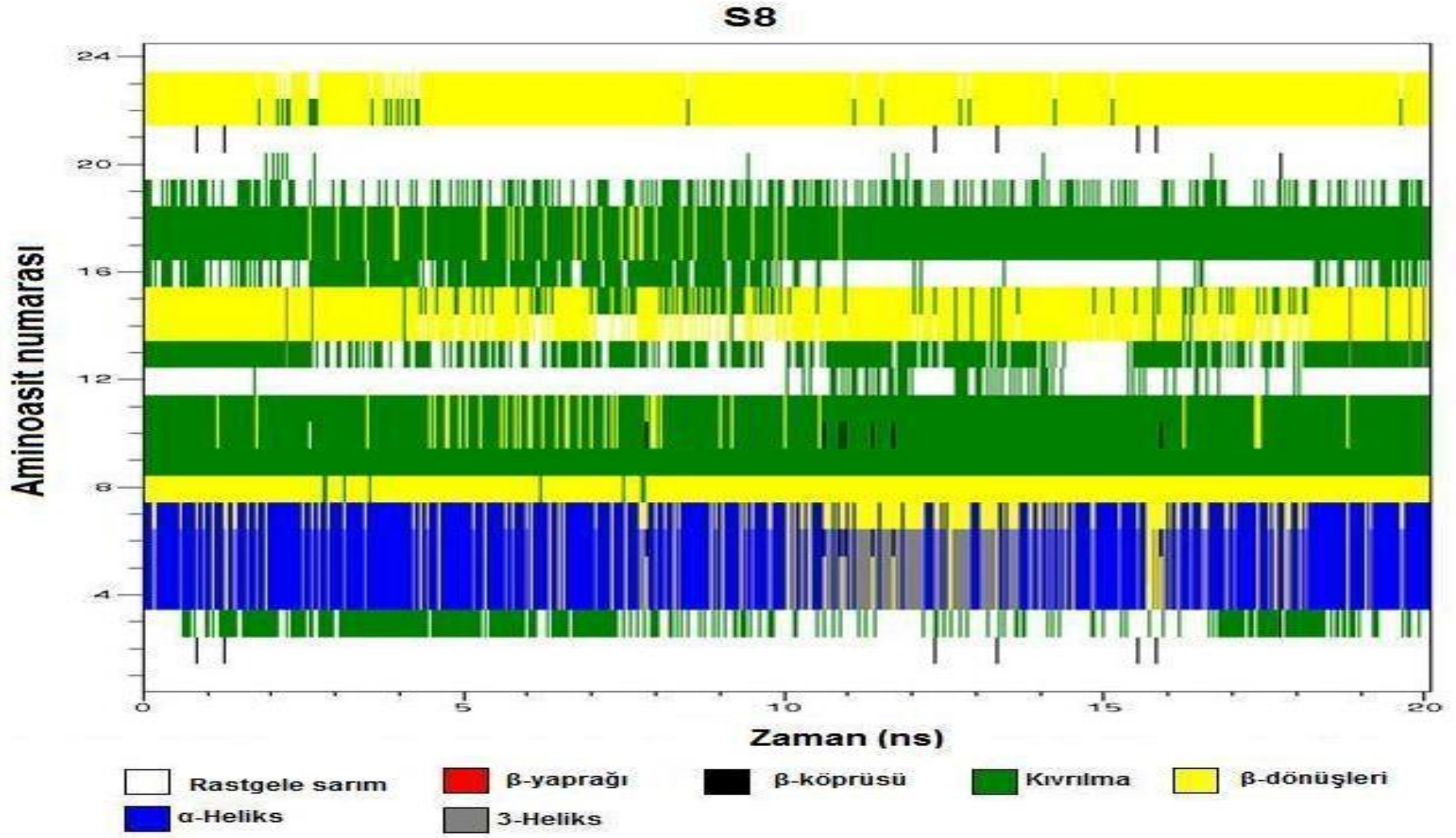


Şekil 6.55 PeptidIIIM2 için S6 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

S7



Şekil 6.56 PeptidIIIM2 için S7 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.57 PeptidIIIM2 için S8 simülasyon süresi boyunca ikincil yapı değişimi.

Şekil 6.34-41' de PeptidIIM2 için zamanın fonksiyonu olarak farklı sekiz başlangıç yapılı simülasyonlardan elde edilmiş olası konformasyonların ikincil yapı elemanlarının zamanla değişimleri gösterilmektedir. Şekillerden, her simülasyon için 8 farklı başlangıç yapısı kullanılmasına rağmen tüm örneklerde rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapılarının baskın olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, S6 ve S8 için sırasıyla 12-15 ve 4-7 aminoasitlerinde temel olarak alfa heliks yapı gözlenirken, beta köprüsü yapısı S4 ve S7 için 9 ve 12. aminoasitlerde görülmektedir. Buna ek olarak, S3, S6 ve S8 için simülasyon boyunca çok az miktarda 3-heliks yapının varlığı da dikkat çekmektedir. Tüm örnekler için ilk ve son aminoasitler tüm simülasyon boyunca rastgele sarım yapıya sahiptir. Terminal aminoasitleri zwitterionic formda olduğundan dolayı bu beklenen bir durumdur. Diğer taraftan PeptidIIM2' nin orta segmentlerindeki ikincil yapı türlerinin çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapıları olduğu ve bunların farklı başlangıç konformasyonlarıyla ilişkili olarak değiştiği görülmektedir. Bu peptid için alfa heliks yapı yalnızca, başlangıç yapıları 600 K sıcaklığına soğutulmuş vakum simülasyonlarından alınmış iki MD simülasyonda (S6 ve S8) ortaya çıkmıştır.

PeptidIIM3' ün farklı sekiz başlangıç yapılı simülasyonlardan elde edilmiş olası konformasyonlarının sahip olduğu ikincil yapı elemanlarının zamanla değişimleri Şekil 6.42-49' da ayrı ayrı gösterilmektedir. Bu peptid için de 8 farklı başlangıç konfigürasyonlu olarak yapılmış simülasyonlarda temel olarak görülen ikincil yapıların, rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapıları olduğu şekillerden görülmektedir. Tüm şekillerde ilk ve son aminoasitler beklenildiği gibi çoğunlukla rastgele sarım yapı gösteriyorken S4 ve S8 için, peptidin ikinci segmenti çoğunlukla beta dönüşü şeklinde bir ikincil yapı sergilemektedir. Bununla birlikte S4 hariç tüm örneklerde, 33-35 aminoasitleri de genelde beta dönüşü formunda kalmaktadırlar. Diğer taraftan, S6 simülasyonu boyunca 23-27 aminoasitlerinde az miktarda alfa heliks ve 3-heliks yapıları görülmektedir. Yine az miktar 3-heliks bir yapı S2 simülasyonu için 9 ve 19 ns arasında 16-18 aminoasit konumlarında gözlemlenmektedir. PeptidIIM3 için yapılan bu 8 simülasyon karşılaştırıldığında, tüm simülasyonlar boyunca başlangıç yapı seçimine bağlı olarak çoğu aminoasitinin ikincil yapısının birkaç simülasyon dışında genellikle kararlı olduğu görülmüştür.

Peptid IIM2' nin DSSP sonuçları ise Şekil 6.50-57' de gösterilmiştir. Şekillerdeki bu 8 farklı başlangıç yapılı simülasyon için rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapılarının en yaygın yapıları olduğu görülmektedir. Önemli ölçüdeki alfa heliks yapı S3 ve S4 hariç tüm

simülasyonlar boyunca gözlemlenmektedir. Bunlar S1, S5-S7 için 9-12 aminoasitlerinde ve S2, S8 için ise 5-9 aminoasitlerinde ortaya çıkmıştır. Bunun yanı sıra ilk iki ve son iki aminoasitlerde, tüm durumlarda tamamen rastgele sarım yapılar görülmektedir. Diğer taraftan, S7 ve S8 için az miktarda 5-heliks ve tüm örneklerde Peptid IIM2' nin çeşitli konumlarında az miktarda 3-heliks görülmektedir.

Çizelge 6.4' te tekrarlı peptid dizilimlerinin S1-S8 simülasyonları sonucunda elde edilen ikincil yapılarının yüzdeleri verilmektedir. PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 simülasyon sonuçları birbiriyle karşılaştırıldığında ilk olarak PeptidIIM3' ün PeptidIIM2' den daha çok beta dönüşü yüzdesine sahip olduğu söylenebilmektedir. İkinci olarak, simülasyonlar boyunca PeptidIIM2, önemli miktarda beta köprüsü ve alfa-heliks yapıları sahipken, bu yapılar PeptidIIM3' de nadiren görülmüştür. Her iki peptid arasındaki bir diğer fark ise, bu peptidlerin çoğunlukla kararlı durumlar göstermelerine karşın bu kararlılık durumunun PeptidIIM3' de daha yaygın olarak görülmesidir. Ek olarak, çizelgeden en az oranda rastgele sarım yapının PeptidIIM2 diziliminde olduğu ve bunun aksine yine aynı peptid diziliminin en yüksek miktarda heliks yüzdesine sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 6.4 Tekrarlı peptid dizilimlerinin S1-S8 simülasyonları sonucu elde edilen ikincil yapıların ortalaması.

	<b>Rastgele</b>		<b><math>\beta</math>-</b>		<b><math>\beta</math>-</b>	<b><math>\beta</math>-</b>
	<b>Sarım</b>	<b>Kıvrılma</b>	<b>dönüşü</b>	<b>Heliks</b>	<b>yaprağı</b>	<b>köprüsü</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
PeptidIIM2	48.0	35.0	12.0	3.2	0.0	1.38
PeptidIIM3	47.0	33.5	18.7	0.67	-	0.0
PeptidIIM2	44.3	31.0	14.2	10.0	0.0	0.25

#### 6.4.2.2 Temel Bileşen Analizi

Bölüm 6.2.2.3' de ayrıntıları anlatılan “Temel Bileşen Analizi (PCA)” temel katsayıların katkısı analiz edilerek konformasyonel yapılar hakkında fikir edinmek ve en sık rastlanan dolayısıyla en kararlı olan konformasyonları belirleyebilmek için MD simülasyonlardan elde edilen yörüngelere uygulanmıştır. PCA uygulayarak elde edilen kovaryans matrisin özvektörleri peptidlerin konformasyonel olasılık dağılımlarını temsil etmek için



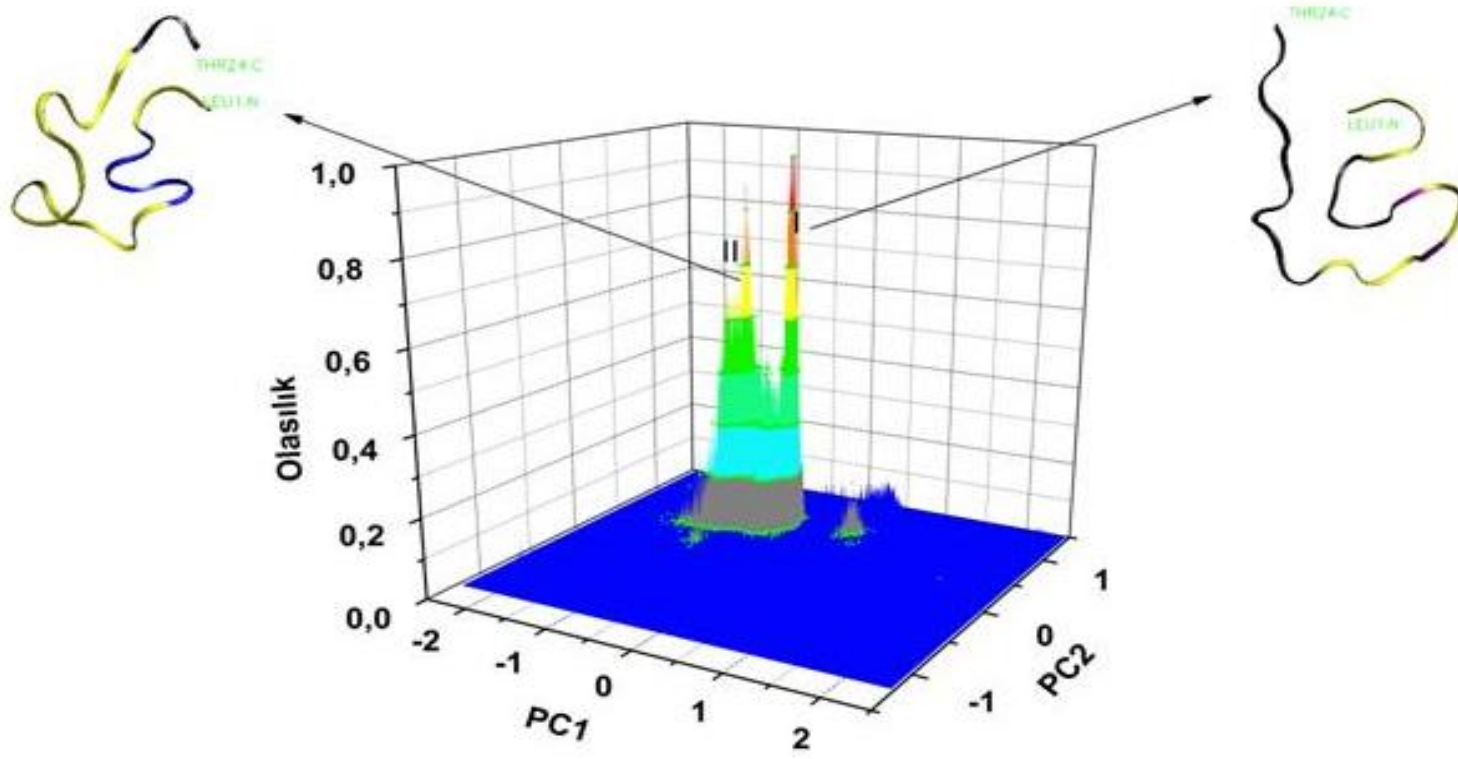
kullanılmıştır. Her peptid için 8 farklı simülasyon sonuçlarına PCA uygulanmıştır. Her dizilim için bu analizin sonuçları ise Şekil 6.58-60' da ayrı ayrı verilmektedir.

Peptid IIM2 için ilk iki temel bileşen hareketi önemli ölçüde (toplam hareketin ortalama %64'ünü) tarif etmek için yeterli olmaktadır. Şekil 6.58' den görüldüğü gibi, PC1 ve PC2 temel bileşenleri boyunca hareketin dağılımı açıkça belli bir bölgede popülasyon göstermekte ve bu bölge PC1 ve PC2 ye göre sırasıyla (-1.0;0.0) ve (0.5;1.0) civarında merkezlenmektedir. Fakat bu bölgede en yüksek olasılığa sahip iki pik görülmektedir. Bu pikleri temsil eden yapılar şeklin solunda ve sağında gösterilmiştir. Bu iki pikin farklı konformasyonlara karşılık geldiği şekilden görülmektedir. KonformasyonI'in, çoğunlukla rastgele sarım, beta dönüşü ve beta köprüsü popülasyon olasılığına sahip olduğu görülürken, KonformasyonII'nin çoğunlukla beta dönüşü, rastgele sarım ve alfa heliks popülasyon olasılığına sahip olduğu görülmüştür.

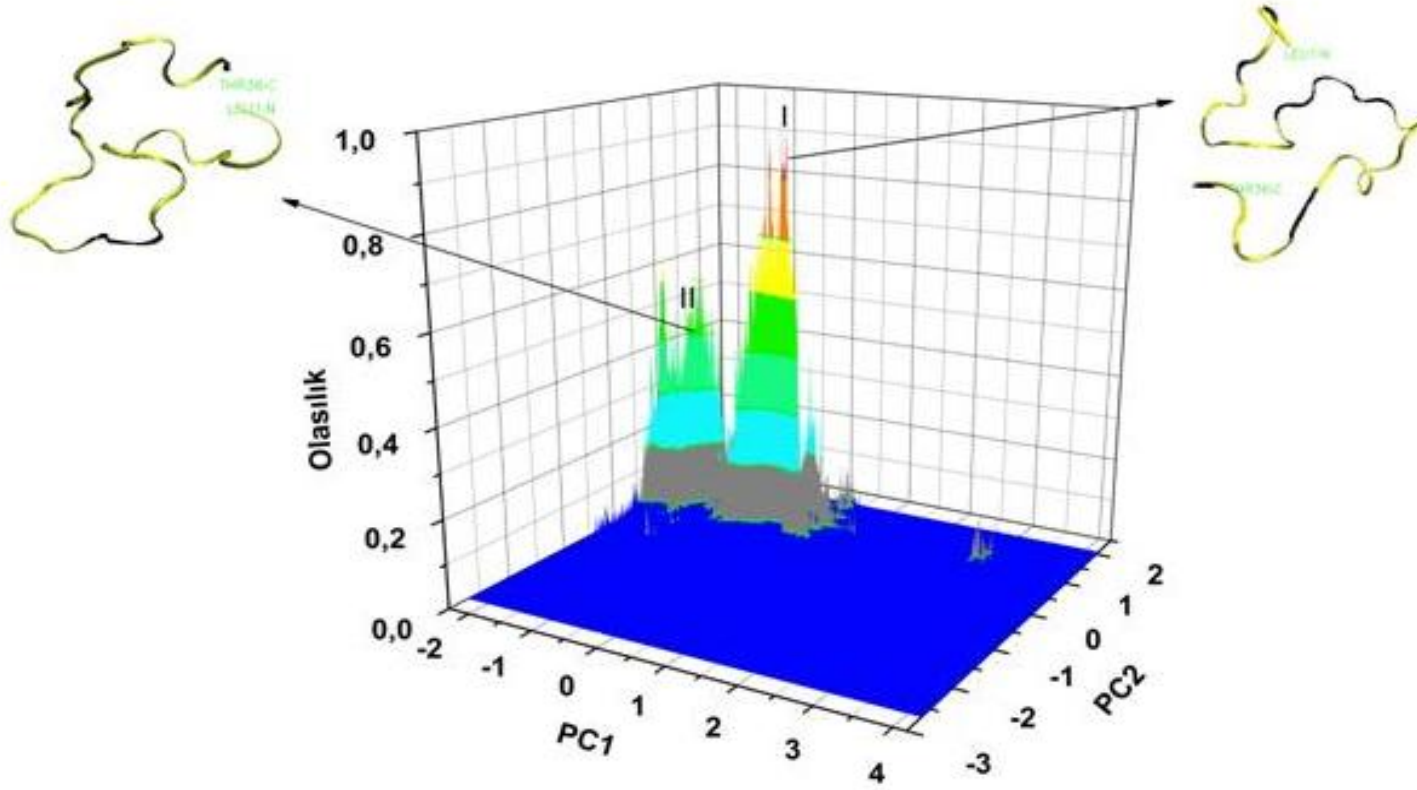
İlk iki özvektörün sonuçları PeptidIIM3' ün toplam hareketinin %66' sını temsil etmektedir. PC1 ve PC2 temel bileşenleri boyunca hareketin dağılımı Şekil 6.59' da verilmiştir. Burada tüm yörüngeler belli iki bölgede popülasyon göstermektedir. PC1 ve PC2 ye göre I. bölge (-1.0;1.0) ve (0.0;2.0) civarında merkezlenmiş iken, II. bölge ise (-2.0;-1.0), ve (0.0;2.0), civarında merkezlenmiştir. Bu piklere karşılık gelen ortalama konformasyonlar şeklin solunda ve sağında gösterilmiştir. Beta dönüşü ve rastgele sarım yapı formları temsili yapılar içinde en dominant yapılar olarak karşımıza çıkarken, en yüksek olasılığa sahip KonformasyonII'nin. ykonformasyonI'den daha çok beta dönüşü formlarına sahip olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, PeptidII'nin ikili ve üçlü dizilimlerini karşılaştırdığımızda Şekil 6.58 ve Şekil 6.59' dan görüldüğü gibi PeptidIIM2' nin PC1 ve PC2 dağılımlarının PeptidIIM3' ün I. bölgesiyle örtüşdüğü görülmektedir. PeptidII' nin her iki dizilimi için de bu bölgede çoğunlukla beta dönüşü ve rastgele sarım yapı ortaya çıkmaktadır.

Peptid IIM2 için PC1 ve PC2' ye göre konformasyonel olasılık dağılımı Şekil 6.60' da gösterilmiştir. Bu bileşenler toplam hareketin % 62' sini karşılamaktadır. Şekil 6.60, en yüksek olasılıklı birkaç bölge içermektedir. Bu bölgelere ait ilgili yapılar I, II ve III oklarıyla gösterilmiştir ve bu bölgeye denk gelen konformasyonların ikincil yapılarının beta dönüşü, rastgele sarım ve heliks formlara sahip olduğu görülmüştür.

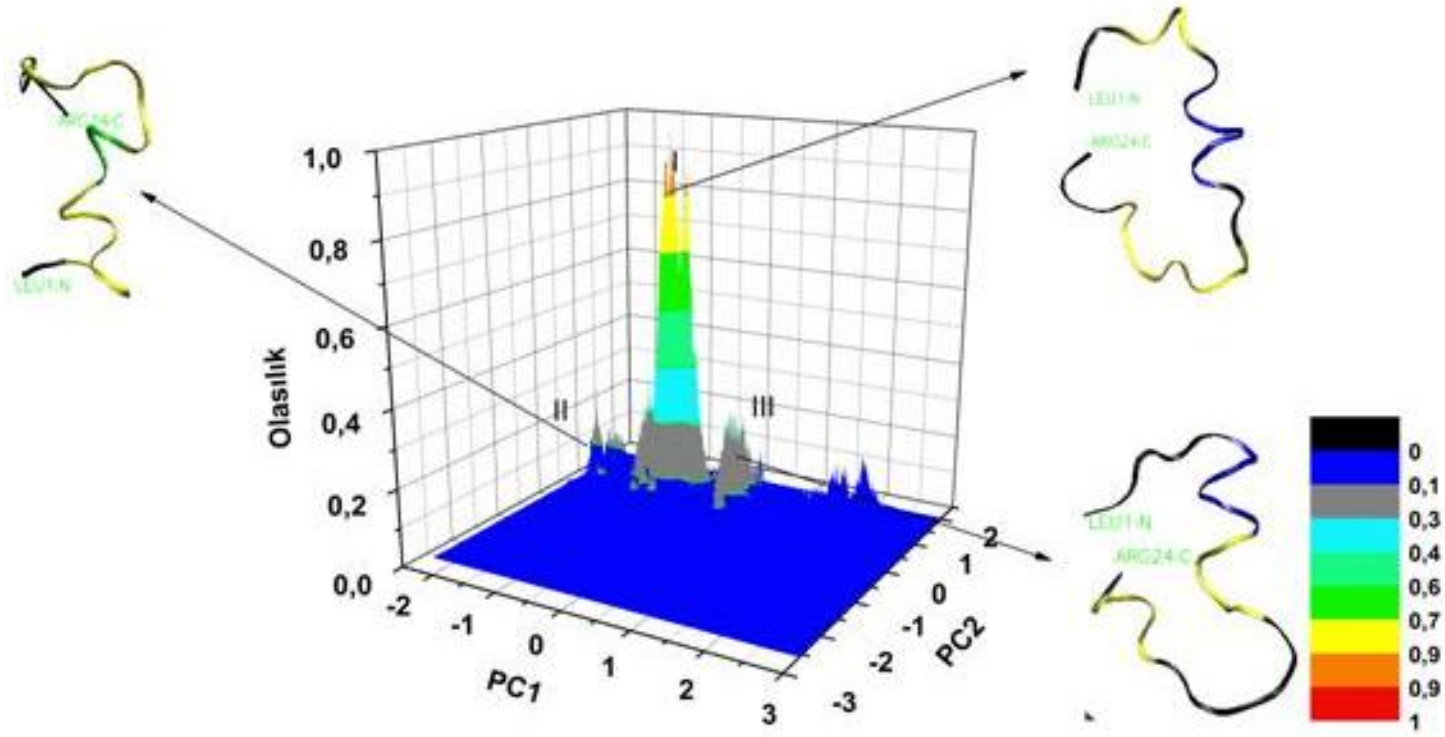
Yukarıda Bölüm 6.4 başlığı altında sunulan, SEB' e afinite gösteren peptidlerin tekrarlı dizilimleri için yapılan MD simülasyonları ve PCA sonuçları bir arada değerlendirilerek, kolabratörlerimiz tarafından elde edilmiş deneysel sonuçlarla birlikte yorumlanmış ve elde edilen çıkarımlar literatürde yayımlanmıştır (Dudak et al. 2012). Sonuçlar özellikle PeptidII nin ikili tekrarlarının afiniteyi 10 kat kadar arttırdığını, ancak beklenmedik bir şekilde üçlü tekrarının ise afiniteyi azalttığını göstermiştir. İlgili çalışmada bu durum üçlü tekrarlı zincirin daha çok katlanması sebebiyle ortalarda bulunan aktif bölgelerin bu katlanmış yapının iç kısımlarda kalmasının bir sonucu olarak açıklanmıştır. Diğer yandan MD sonuçlarına bakılarak ta konformasyonel farklılıkların tekrarlı peptid dizilimlerinin afinitesi için anahtar rol oynadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 6.58 PeptidIIM2 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları.



Şekil 6.59 PeptidIIM3 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları.



Şekil 6.60 PeptidIIIM2 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımları.

## 6.5 TEKRARLI PEPTİD DİZİMLERİNİN REMD SİMÜLASYONLARI

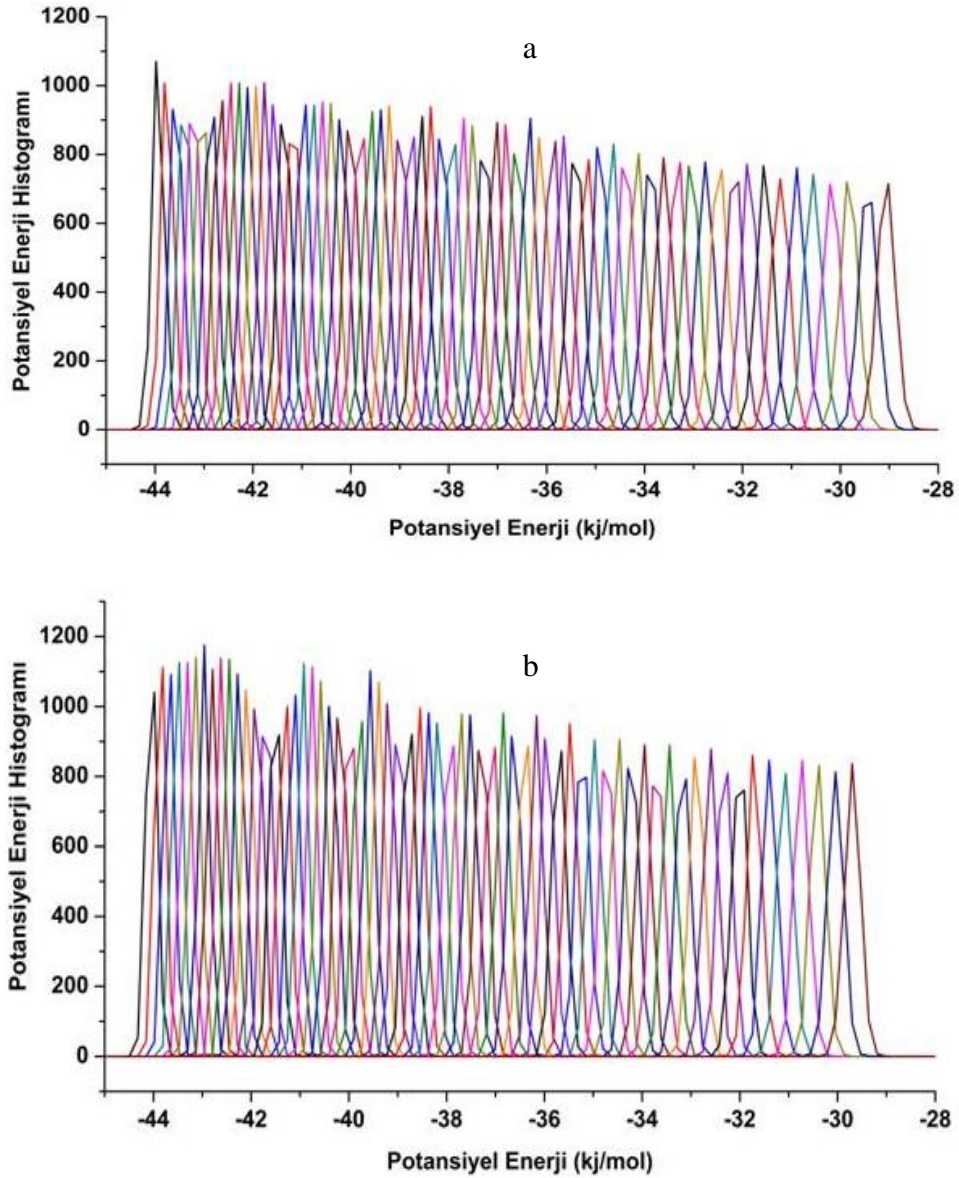
Bu bölümde yine klasik MD simülasyonlarının yerel minimuma takılma probleminden dolayı Bölüm 6.4' te dizilim kodları verilen ve deneysel sonuçlarla birlikte yorumlandığında afinite de artış gözlenen PeptidIIM2 ve katlanmadan dolayı afinite de azalış gözlenen PeptidIIM3 dizilimlerinin konformasyonel değişimlerinin daha detaylı incelenmesi amacıyla REMD simülasyonları yapılmıştır.

### 6.5.1 Metot

Bu bölümde, PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 için 280-510 K sıcaklık aralığında 64 farklı kopya (replica) ile toplam 4 ns simülasyon süresi verilerek yapılan REMD simülasyonlarında izlenen yol ve metotun ayrıntıları Bölüm 6.3.1-2' de anlatıldığı gibidir. Simülasyonlarda seçilen 64 farklı kopya sıcaklıkları PeptidIIM2 için: 280.00, 282.92, 285.86, 288.82, 291.81, 294.82, 297.86, 300.92, 304.00, 307.12, 310.25, 313.41, 316.59, 319.80, 323.04, 326.30, 329.59, 332.90, 336.24, 339.61, 343.01, 346.43, 349.88, 353.36, 356.87, 360.41, 363.97, 367.56, 371.18, 374.84, 378.52, 382.22, 385.96, 389.73, 393.54, 397.37, 401.24, 405.13, 409.06, 413.02, 417.01, 421.03, 425.08, 429.17, 433.29, 437.45, 441.64, 445.86, 450.12, 454.41, 458.73, 463.09, 467.48, 471.92, 476.39, 480.90, 485.44, 490.02, 494.64, 499.28, 503.98, 508.71, 513.48, 518.29 olarak, PeptidIIM3 için: 280.00, 282.87, 285.77, 288.69, 291.63, 294.58, 297.57, 300.57, 303.60, 306.65, 309.73, 312.83, 315.95, 319.10, 322.27, 325.46, 328.68, 331.92, 335.18, 338.47, 341.79, 345.13, 348.51, 351.90, 355.32, 358.77, 362.24, 365.74, 369.26, 372.81, 376.39, 380.00, 383.64, 387.30, 390.99, 394.72, 398.47, 402.25, 406.05, 409.89, 413.75, 417.65, 421.57, 425.53, 429.51, 433.53, 437.58, 441.66, 445.77, 449.91, 454.08, 458.29, 462.53, 466.80, 471.11, 475.45, 479.82, 484.23, 488.67, 493.15, 497.65, 502.19, 506.77, 511.40 K olarak belirlenmiştir (Patrikson and van der Spoel 2008).

## 6.5.2 Sonuç ve Analizler

PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 dizilimleri için 64 farklı kopya sıcaklığı seçilerek yapılan REMD simülasyonlarının başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için her bir kopya sıcaklığın potansiyel enerji histogramları çizilerek elde edilen sonuçlar Şekil 6.61.a ve b' de verilmiştir. Şekillerden her iki peptid dizilimi için de komşu kopyaların enerji histogramlarının örtüştüğü ve kopyalar arasındaki değiş tokuşun başarılı bir biçimde gerçekleştiği görülmektedir.



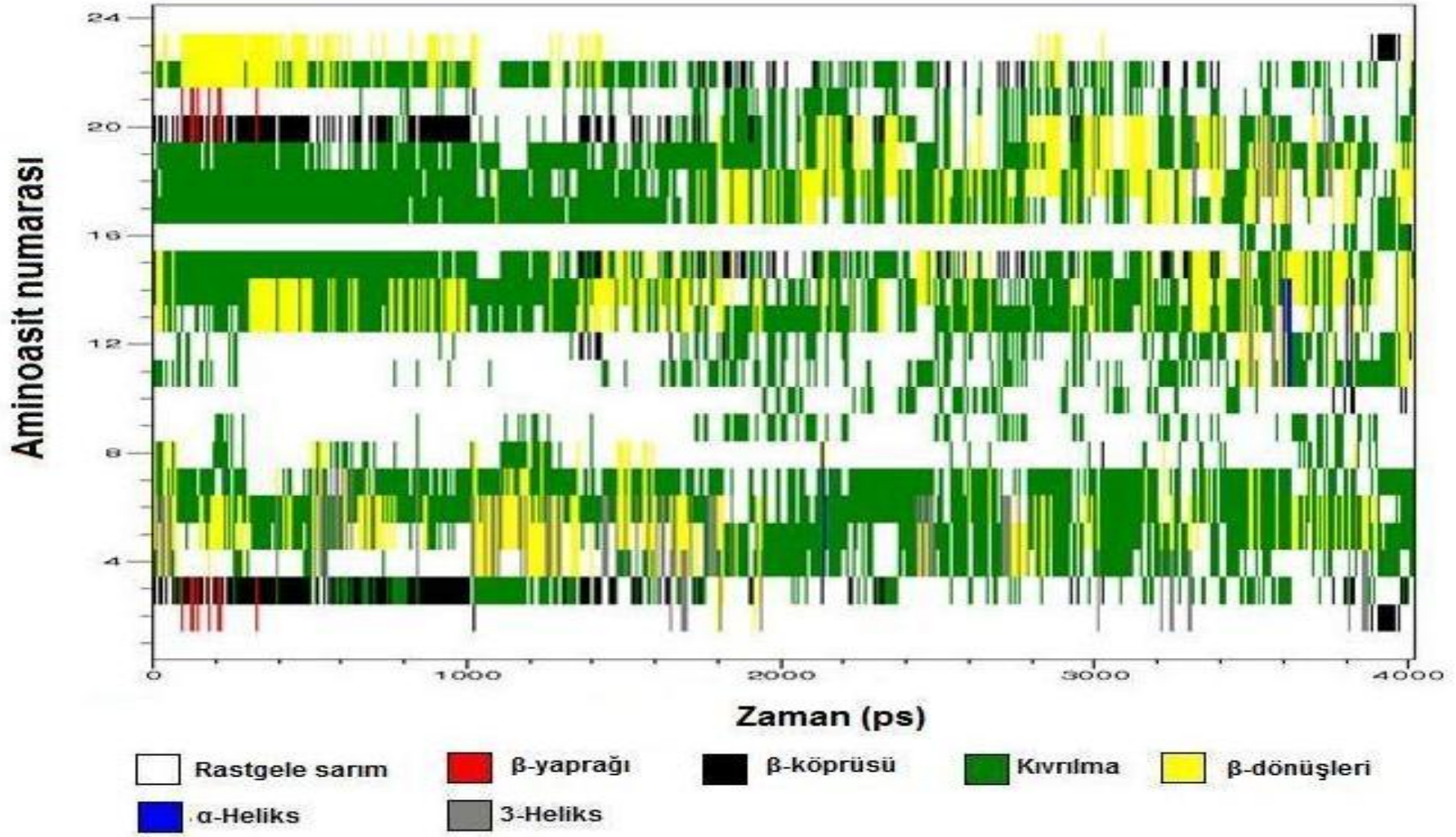
Şekil 6.61 a) PeptidIIM2 b) Peptid IIM3 için potansiyel enerji histogramları.

### 6.5.2.1 İkincil Yapı Analizi

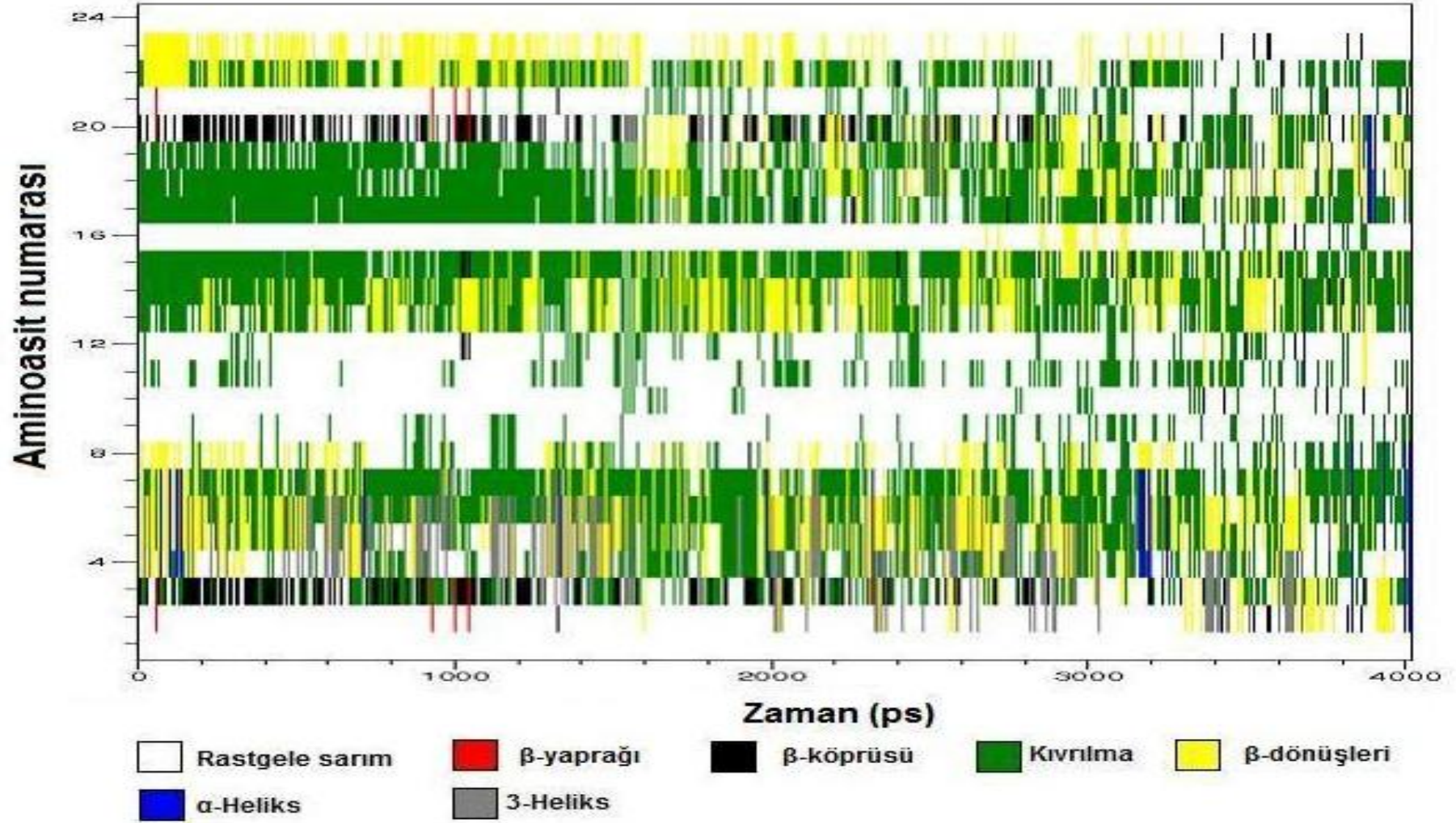
İkincil yapıların sıcaklığa bağlı değişimlerini incelemek amacıyla 280, 300, 319 ve 518 K sıcaklıklardaki kopyaların DSSP sonuçları her iki peptid için ayrı ayrı Şekil 6.62-69' da verilmiştir. Bu şekillerdeki düşey eksen peptidteki aminoasitlerin sıra numarasını ve yatay eksen ise simülasyon zamanını göstermektedir. Her iki peptid için de ilk ve son terminal aminoasitlerinin diğer simülasyonlara benzer şekilde rastgele sarım yapıya sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 6.62-65 bir arada incelendiğinde, PeptidIIM2' nin 280, 300 ve 319 K' de benzer ikincil yapı formları göstermesine karşın, 518 K' de yapısal olarak birtakım değişiklikler meydana geldiği görülmektedir. Şekil 6.62-64' te Ala<sup>3</sup> ve His<sup>20</sup> aminoasitlerinin çoğunlukla  $\beta$ -köprüsü yapısına sahip olduğu görülmektedir. Her 4 sıcaklık için Thr<sup>16</sup>, Arg<sup>21(+)</sup> ve His<sup>7</sup>-Thr<sup>12</sup> aminoasitleri arası genel olarak rastgele sarım yapı gösterirken, 319 K' de az miktarda heliks yapı ortaya çıkmıştır. Yine 280, 300 ve 319 K sıcaklıkta Thr<sup>17</sup>-His<sup>20</sup> arasındaki aminoasitler simülasyon başlarında kıvrılma yapıları gösterirken, simülasyonun son bölümlerinde bu yapı yerini yer yer beta dönüşü ve rastgele sarım yapı formlarına bırakmıştır. PeptidIIM2 daha önce anlatıldığı gibi iki adet PeptidII diziliminin peşpeşe bağlanmış halidir. Bunlardan ilki birinci diğeri de ikinci dizilim olarak adlandırılmıştır. Bu peptid için tüm sıcaklıklarda ikincil yapılar bakıldığında peptidin birinci dizilimindeki aminoasitlerin genel olarak ikinci dizilimde farklı ikincil yapılar sergilediği gözlenmiştir. İlk 2 aminoasite karşılık gelen Leu birinci dizilimde rastgele sarım yapıya sahipken, ikinci dizilimde 13. ve 14. aminoasite karşılık geldiğinde çoğunlukla kıvrılma ve beta dönüşü yapıları göstermiştir. Bununla birlikte ilk dizilimde 11. ve 12. aminoasitlere karşılık gelen Trp ve Thr, ikinci dizilimde 23. ve 24. aminoasitlerde de rastgele sarım yapı göstererek kendini tekrar etmiştir. İlk üç sıcaklıkta genel olarak  $\beta$ -köprüsü formu gösteren Ala<sup>3</sup>, ikinci dizilimde ise genel olarak kıvrılma formu göstermiştir. Ayrıca, ikinci dizilimde  $\beta$ -köprüsü formu gösteren His<sup>20</sup> ise ilk dizilimde genel olarak rastgele sarım yapı sergilemiştir.

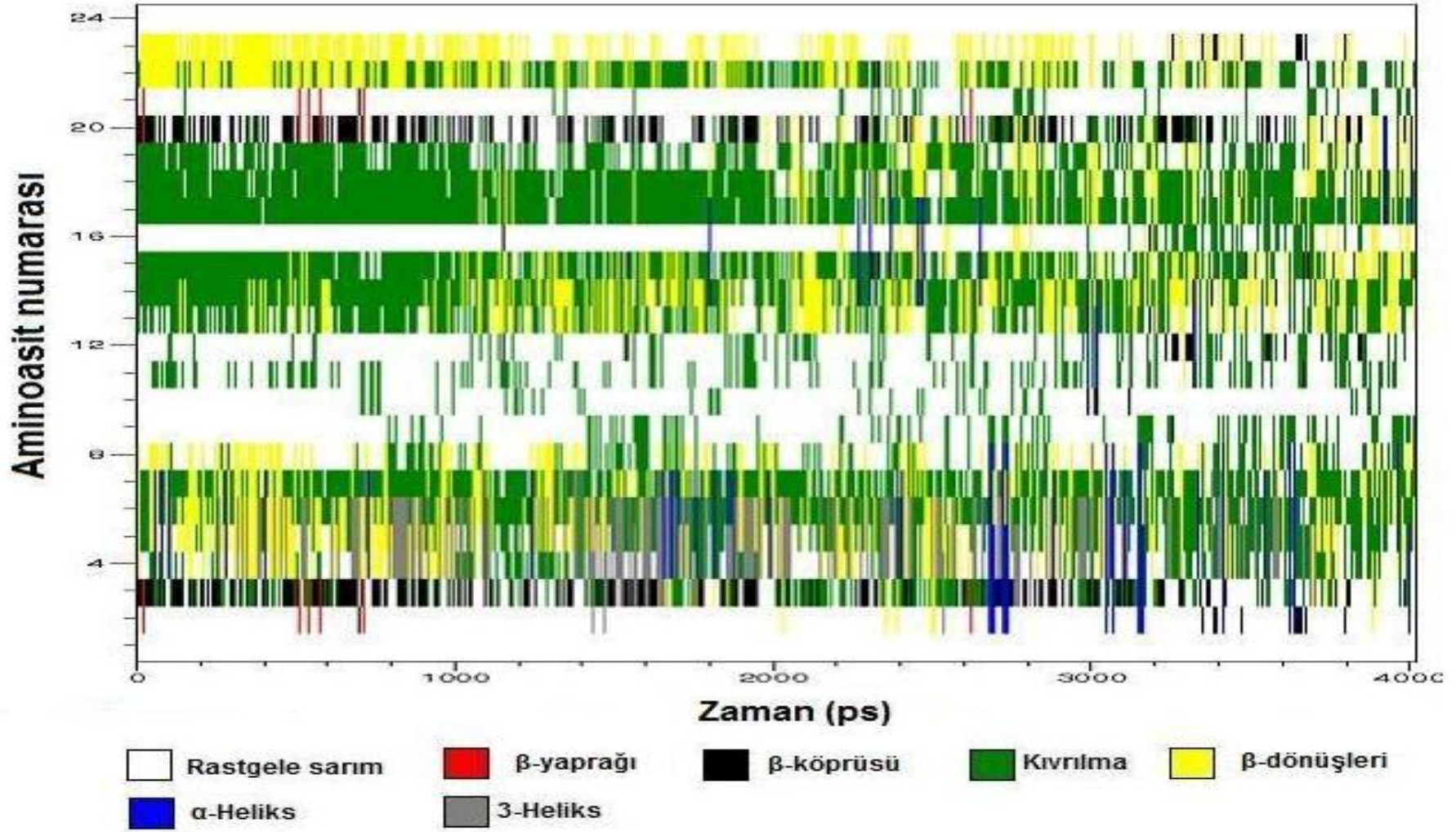




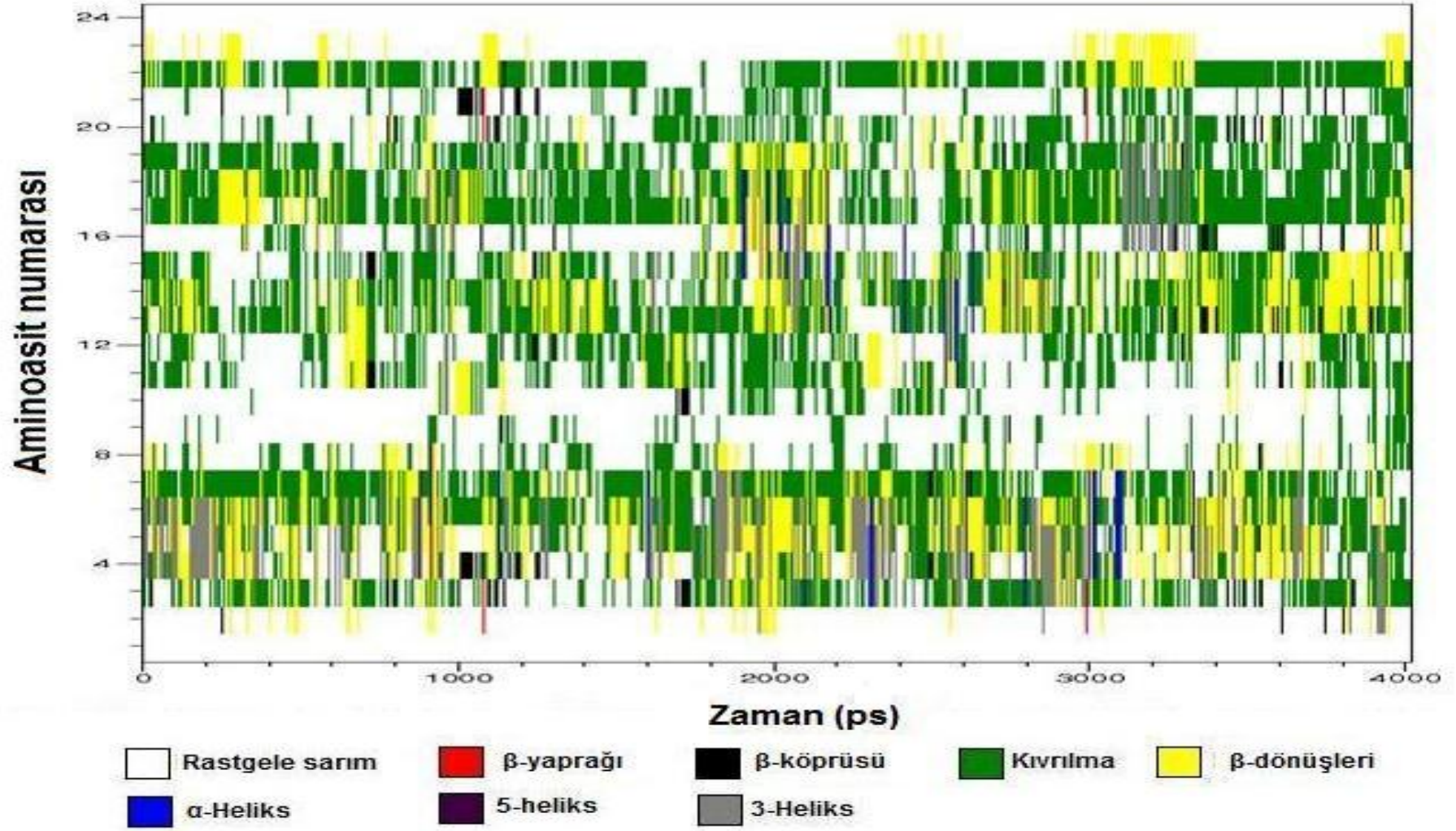
Şekil 6.62 PeptidIIM2 için 280 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



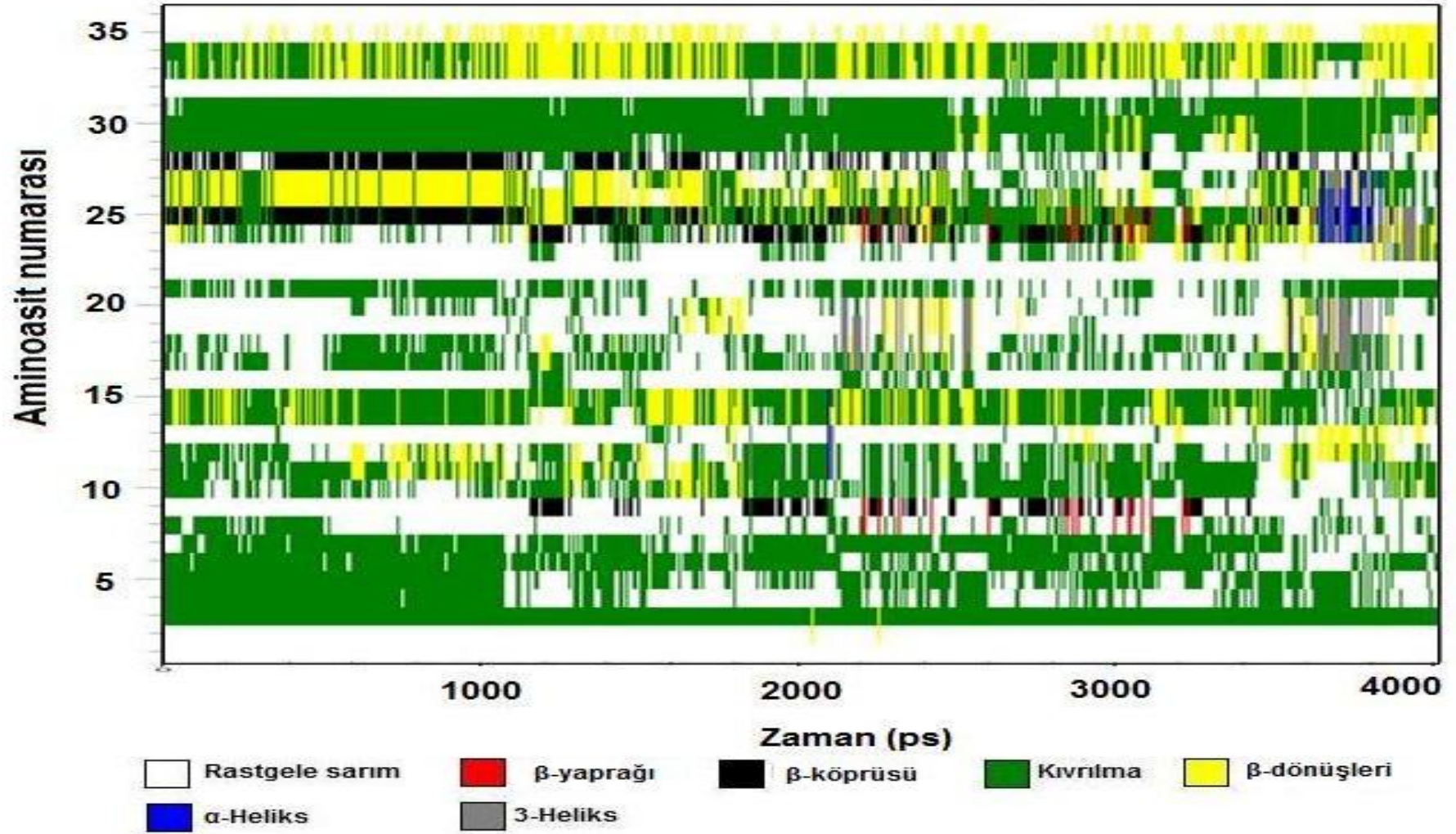
Şekil 6.63 PeptidIIM2 için 300 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



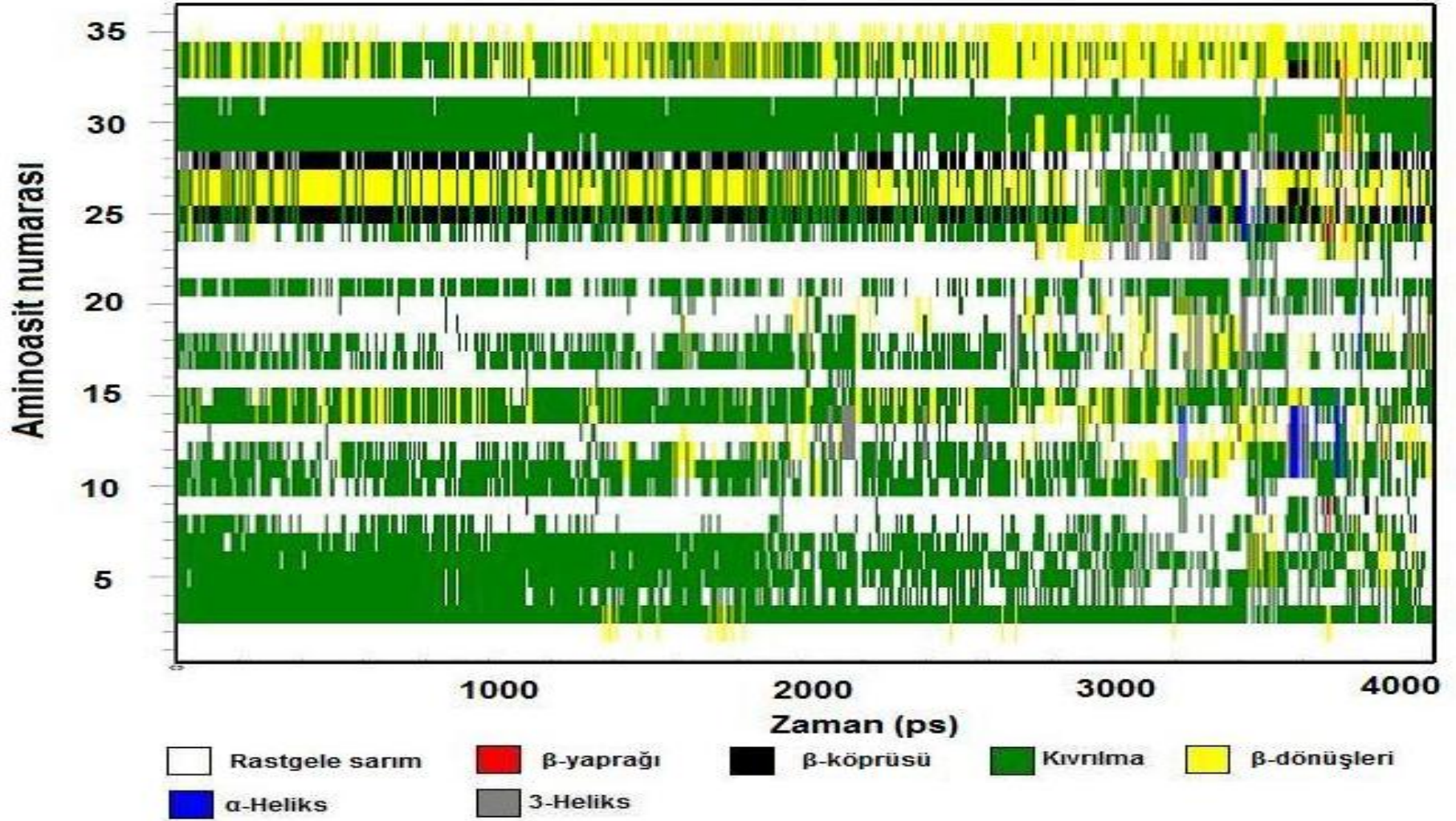
Şekil 6.64 PeptidIIM2 için 319 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



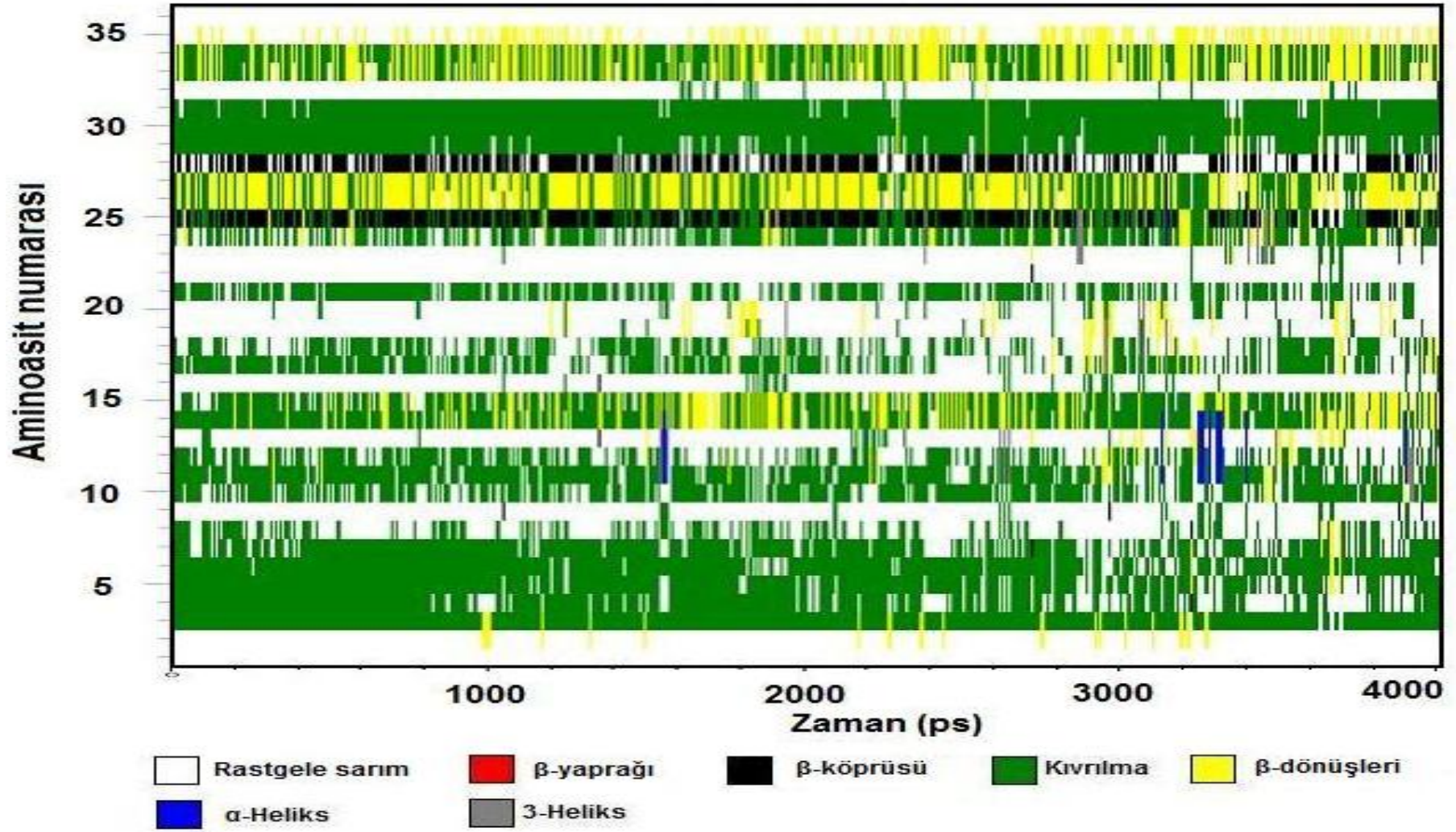
Şekil 6.65 PeptidIIM2 için 518 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



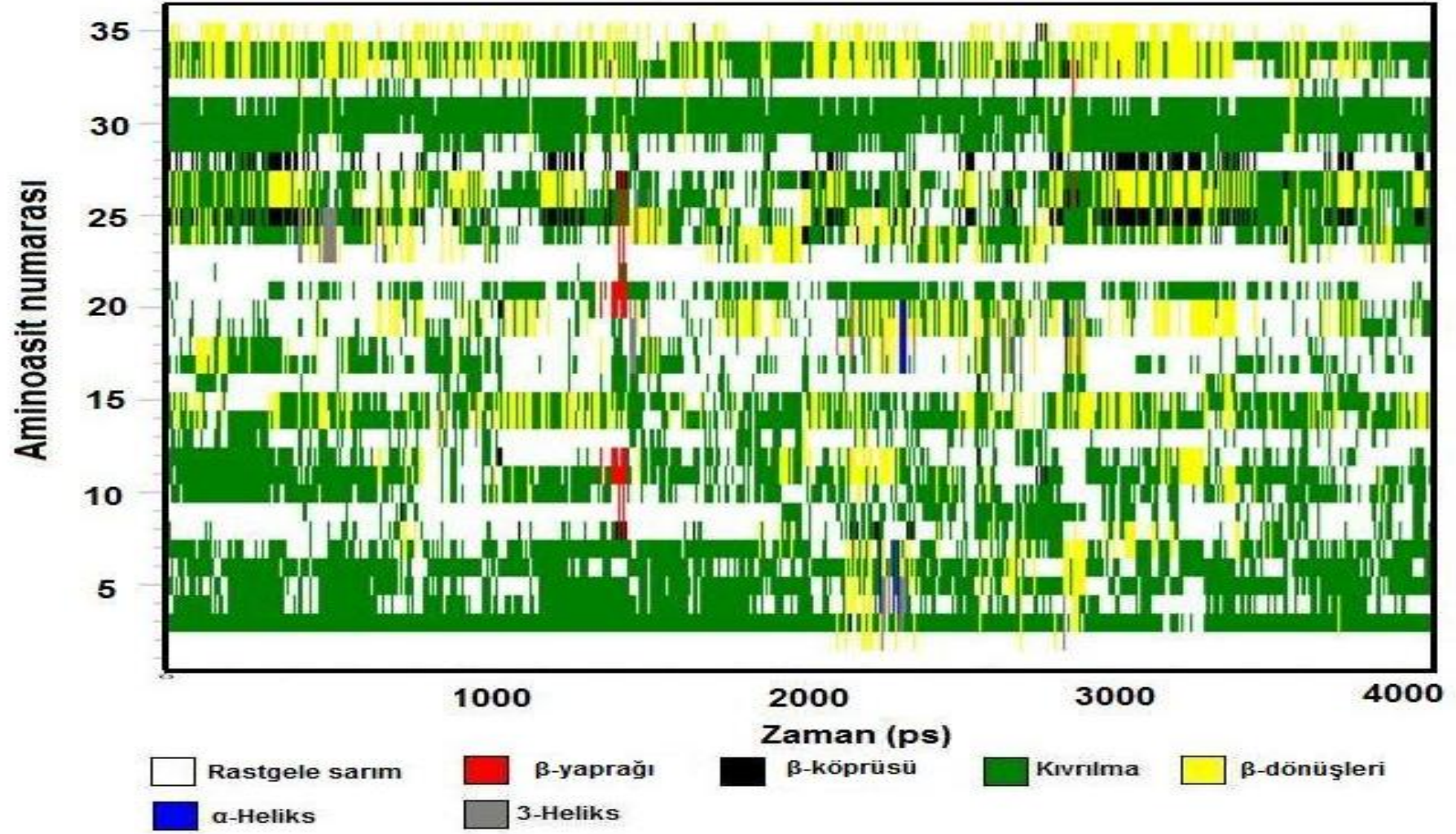
Şekil 6.66 PeptidIIM3 için 280 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.67 PeptidIIM3 için 300 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.68 PeptidIIM3 için 319 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



Şekil 6.69 PeptidIIM3 için 511 K sıcaklıkta ikincil yapı değişimi.



PeptidIIM3 için DSSP ile elde edilmiş ikincil yapıların zamanla değişimleri 4 farklı sıcaklık için Şekil 6.66-69’ da verilmiştir. Bu peptid dizilimi de Peptid IIM2’ deki gibi 280, 300 ve 319 K sıcaklıktaki ikincil yapı eğilimlerine benzer davranış gösterirken yüksek sıcaklığa çıkıldığında bazı bölgelerde farklılıklar göstermektedir. Şekillerden, tüm sıcaklıklardaki Ala<sup>3</sup>-His<sup>8</sup>, Thr<sup>29</sup>-His<sup>31</sup> aralıklarındaki aminoasitlerin çoğunlukla kıvrılma formunu tercih ettiği görülmektedir. Ayrıca yine tüm sıcaklıklarda ilk ve son aminoasitlerin yanı sıra Arg<sup>9</sup>(+), Leu<sup>13</sup>, Asp<sup>16</sup>(-), Thr<sup>18</sup>-His<sup>20</sup>, Pro<sup>22</sup>-Trp<sup>23</sup> ve His<sup>32</sup> aminoasitlerinin genelde rastgele sarım formu aldıkları görülmektedir. Bunların yanı sıra özellikle 280, 300 ve 319 K sıcaklıklarda Leu<sup>25</sup> ve Asp<sup>28</sup>(-) aminoasitlerinde  $\beta$ -köprüsü yapıları ortaya çıkarken Leu<sup>26</sup> ve Ala<sup>27</sup> aminoasitlerinde beta dönüşü yapıları gözlenmiştir. Ek olarak, tüm sıcaklıklarda Arg<sup>33</sup>(+) ve Pro<sup>34</sup> aminoasitlerinin zamanla dönüşümlü olarak beta dönüşü ve kıvrılma yapıları formları kazandıkları görülmüştür. PeptidII’ nin ikili dizilimlerinde görüldüğü gibi üçlü dizilimlerinde de ikincil yapı formunu bire bir koruyan aminoasitler çok nadir olarak görülmektedir.

Yukarıda detayları anlatılan ve Şekil 6.62-69’ da sunulan, farklı sıcaklıklar için PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 dizilimlerinin REMD simülasyonları süresince kazandığı 3 boyutlu konformasyonlarının ikincil yapı analizlerine genel olarak bakıldığında, peptid diziliminin tekrarlanması ile beklenildiği gibi birinci dizilimdeki her aminoasitin ikinci ve üçüncü dizilimlerinde de aynı ikincil yapı formunda kalmadığı, bu eklenen dizilimler ile daha önce kazanılan ikincil yapı formlarının değiştiği görülmektedir. Eklenen dizilimler ile peptidlerin farklı şekillerde katlanabilmesi, bu yapının çözücü ile etkileşimlerinin farklılaşabilmesi ve peptid içerisinde aminoasitler arasında kurulabilecek farklı bağların ortaya çıkabilmesi sebepleriyle böyle bir sonuç bulunması olağandır. Diğer yandan yine şekillerden sıcaklığın da bu kazanılan ikincil yapı formlarında etkin rol aldığı da görülmektedir. Sonuç olarak peptid dizilimlerinin bu konformasyonel farklılıklarının afinite için anahtar rol oynadığı söylenebilir.

REMD simülasyonları süresince peptidlerin sahip oldukları ikincil yapılarının yüzde ağırlıkları Çizelge 6.5’ de bir arada verilmiştir. Çizelgeden PeptidIIM2’ nin rastgele sarım ve heliks yapı yüzdesinin her sıcaklık için PeptidIIM3’ünkinden daha fazla olduğu görülürken, kıvrılma yapılarının yüzdesinin ise daha düşük olduğu görülmektedir. Diğer yandan her iki peptid dizilimi için en ağırlıklı yapılar olan rastgele sarım ve kıvrılma yapılarının sıcaklıkla çok fazla değişmediği görülmektedir. PeptidIIM2 dizilimindeki heliks oranının sıcaklıkla artmasına karşın PeptidIIM3’ te tam tersi bir durum söz konusu olmuştur. Bunun yanında çok

az miktarda rastlanan  $\beta$ -köprüsü yapısı ise her iki peptid dizilimi için de en yüksek oranda 319 K sıcaklıkta ortaya çıkmıştır.

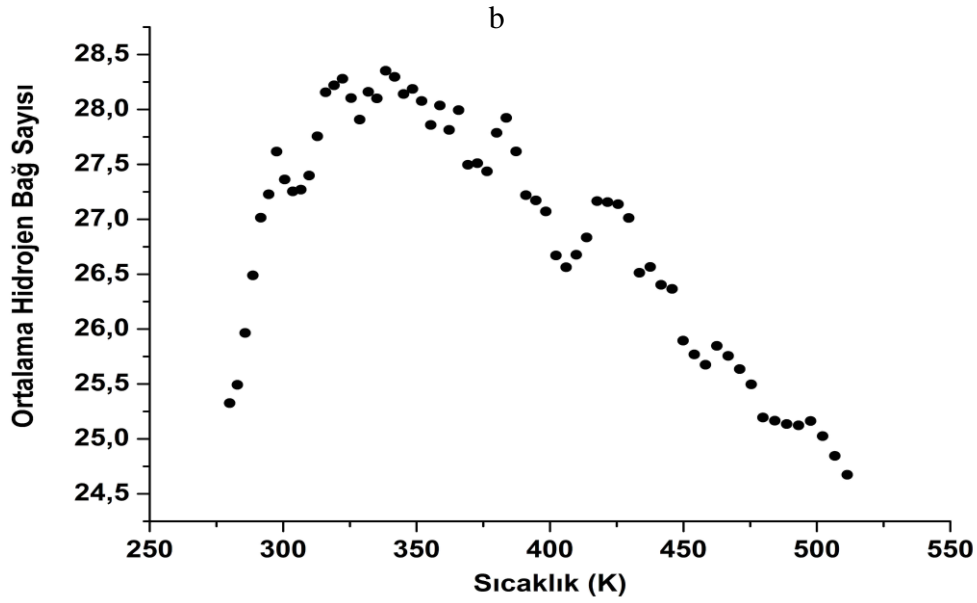
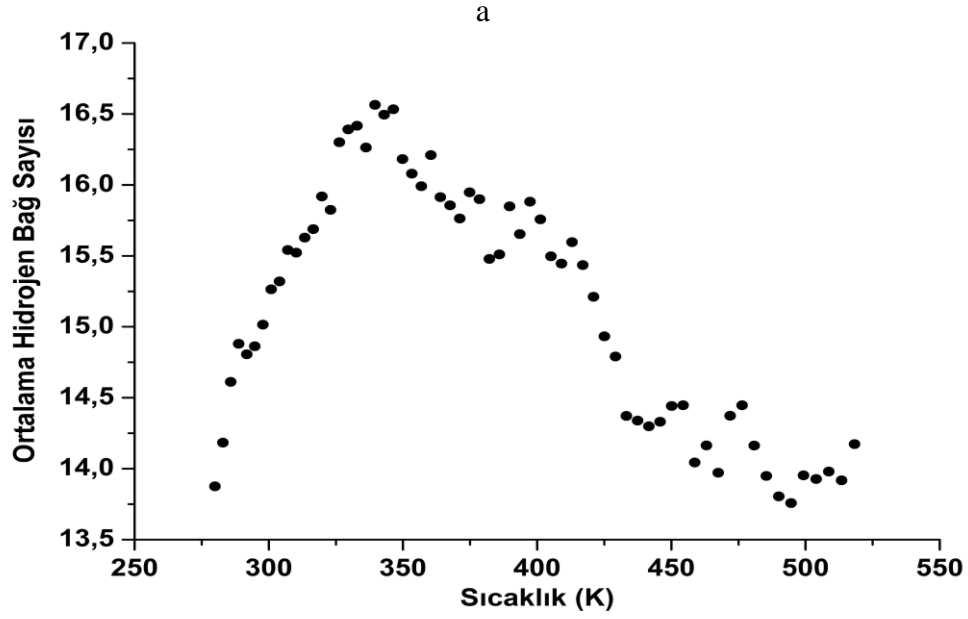
Çizelge 6.5 PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 için 4 farklı sıcaklıktaki ikincil yapı yüzdeleri.

	T[K]	Rastgele		$\beta$ -	$\beta$ -	$\beta$ -	
		Sarım (%)	Kıvrılma (%)	dönüşü (%)	Heliks (%)	yaprağı (%)	köprüsü (%)
<b>PeptidIIM2</b>	280	53.1	31.0	9.8	2.93	0.25	2.82
	300	52.3	28.2	12.0	4.54	0.12	2.69
	319	50.7	28.1	12.6	5.10	0.19	3.27
	518	51.8	29.2	12.1	5.68	0.00	1.01
<b>PeptidIIM3</b>	280	46.5	38.5	10.1	1.29	0.24	3.21
	300	45.1	39.7	10.4	1.28	0.02	3.38
	319	44.4	41.7	9.7	0.66	0.00	3.43
	511	47.4	39.2	10.5	0.84	0.23	1.28

### 6.5.2.2 Hidrojen Bağı ve Çözelti Erişim Yüzey Alanları (SASA)

Bu bölümde PeptidII' nin ikili ve üçlü dizilimlerinin kendi içinde yaptıkları hidrojen bağ sayıları her kopya sıcaklığı için hesaplanmıştır ve PeptidIIM2 için Şekil6.70 a' da ve Peptid IIM3 için ise Şekil 6.70 b' de gösterilmiştir. PeptidIIM2 için Şekil 6.70 a' dan görülebileceği gibi hidrojen bağ sayısında yaklaşık olarak 330 K sıcaklıkta maksimum bir pik görülmüş ve ardından 356 K sıcaklıkta bir dönüm noktası göstermiştir. Bu sıcaklıktan sonra hidrojen bağ sayısında genel olarak azalan bir davranış gözlenmiştir. PeptidIIM3 için hidrojen bağ sayısındaki değişimin sıcaklıkla bağlılığı Şekil6.70 b' den takip edildiğinde 320 K sıcaklığa kadar hidrojen bağ sayısında sürekli bir artış gözlenmiş ve 330 K sıcaklıkta eğri bir dönüm noktası özelliği sergilemiştir.

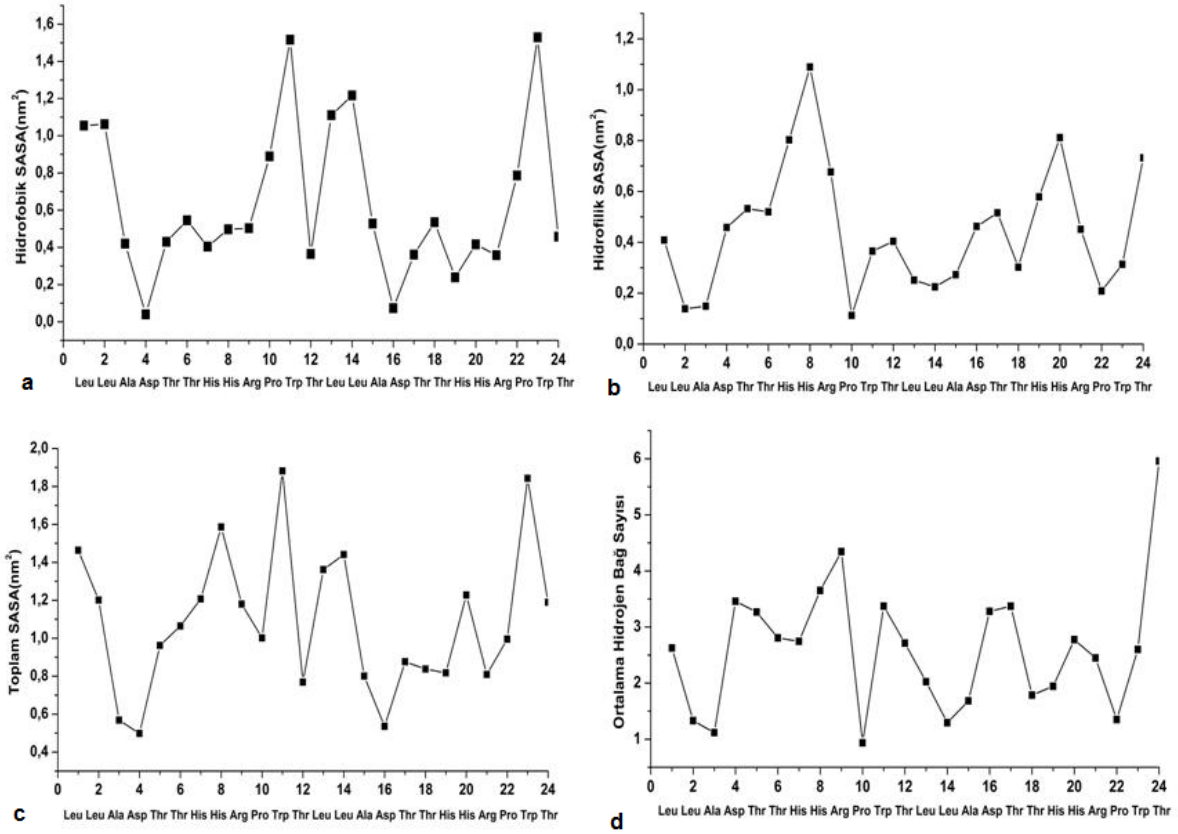
Her peptidin konformasyonel yapılarına hidrofobik kuvvetlerin etkisini görmek için 300 K sıcaklıkta hidrofobik, hidrofilik ve toplam çözelti erişim yüzey alanları (SASA) hesaplanmıştır.



Şekil 6.70 a. PeptidIIM2 b. PeptidIIM3 için tüm kopya sıcaklıklarının molekül içi ortalama hidrojen bağ sayısı.

Şekil 6.71 a' dan görüldüğü gibi PeptidIIM2' ye en fazla hidrofobik katkı Trp<sup>11</sup> aminoasitinden gelirken, en düşük katkıları ise Asp<sup>4(-)</sup> ve Asp<sup>16(-)</sup> aminoasitlerinden gelmektedir. Thr<sup>5</sup>-Arg<sup>9(+)</sup> segmentinde hidrofobik katkı yaklaşık olarak sabit kalmış ve benzer davranış aynı aminoasitlerin peptidin 2. diziliminde karşılığı olan Thr<sup>17</sup>-Arg<sup>21(+)</sup> aralığında da tespit edilmiştir. Bu peptid için en büyük hidrofilik katkı His<sup>8</sup> ve yine 2. dizilimdeki His<sup>20</sup> aminoasitinden gelmektedir. En düşük hidrofilik katkı ise, Leu<sup>2</sup>, Ala<sup>3</sup>,

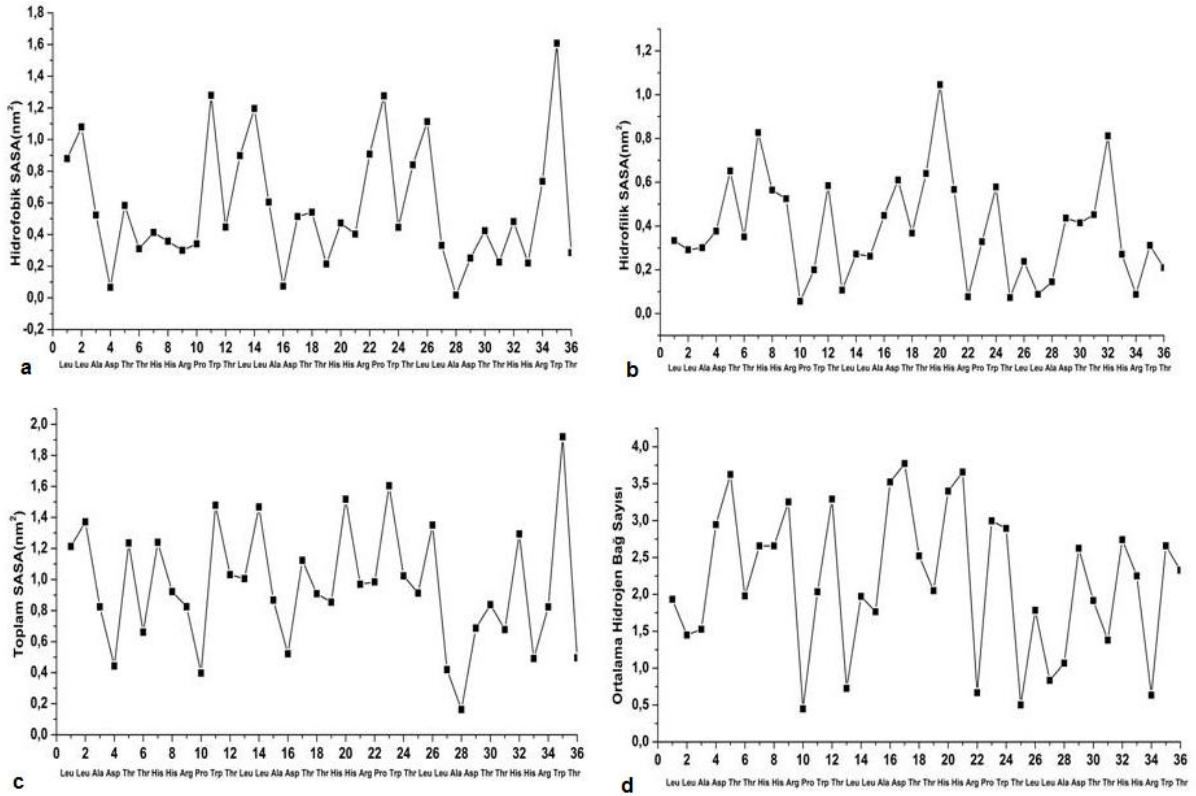
Prp<sup>10</sup> ve Thr<sup>22</sup> aminoasitlerinden gelmektedir. Hem hidrofobik hem de hidrofilik katkılar birlikte incelendiğinde maksimum ve minimum katkıyı veren ilk dizilimdeki aminoasitler, ikinci dizilimde de benzer davranışlar sergilemişler ancak sağladıkları katkıların şiddeti azalmıştır. Ayrıca, peptidlerin su ile yaptıkları hidrojen bağ sayısı hesaplanmış ve PeptidIIM2 için Şekil 6.71 d' de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi en fazla sayıda hidrojen bağı son terminal aminoasidi olan Thr<sup>24</sup> aminoasitinde görülmektedir. Çözücü ile en az sayıda hidrojen bağ yapanlar ise Pro<sup>10</sup> ve onun 2.dizilimdeki karşılığı olan Pro<sup>22</sup> ve Leu<sup>2</sup>-Ala<sup>3</sup> aminoasitleri olduğu görülebilir. Yine yüksek sayıda hidrojen bağı yapan aminoasitlerin Arg<sup>9</sup>(+), Asp<sup>4</sup>(-) ve Trp<sup>11</sup> aminoasitleri oldukları ve dolayısıyla yüklü aminoasitlerin suyla daha çok hidrojen bağ yapma eğiliminde oldukları söylenebilmektedir.



Şekil 6.71 PeptidIIM2 için a. hidrofobik SASA b. hidrofilik SASA c. toplam SASA d. moleküller arası ortalama hidrojen bağ sayısı.

Şekil 6.72 a' ya bakıldığında ise PeptidIIM3 dizilimine en yüksek hidrofobik katkıyı üçüncü dizilimdeki Trp<sup>35</sup> aminoasitinin verdiği görülmektedir. Bu davranış aynı aminoasitin 1. dizilimindeki karşılığı Trp<sup>11</sup> ve 2. dizilimdeki karşılığı olan Trp<sup>23</sup>, de de görülmektedir. En düşük hidrofobik katkılar Asp<sup>4</sup>(-) ve yine bu aminoasitin 2. ve 3. dizilimlerdeki karşılıklarından gelmektedir. Peptid dizilimindeki aminoasitlerin verdikleri hidrofobik

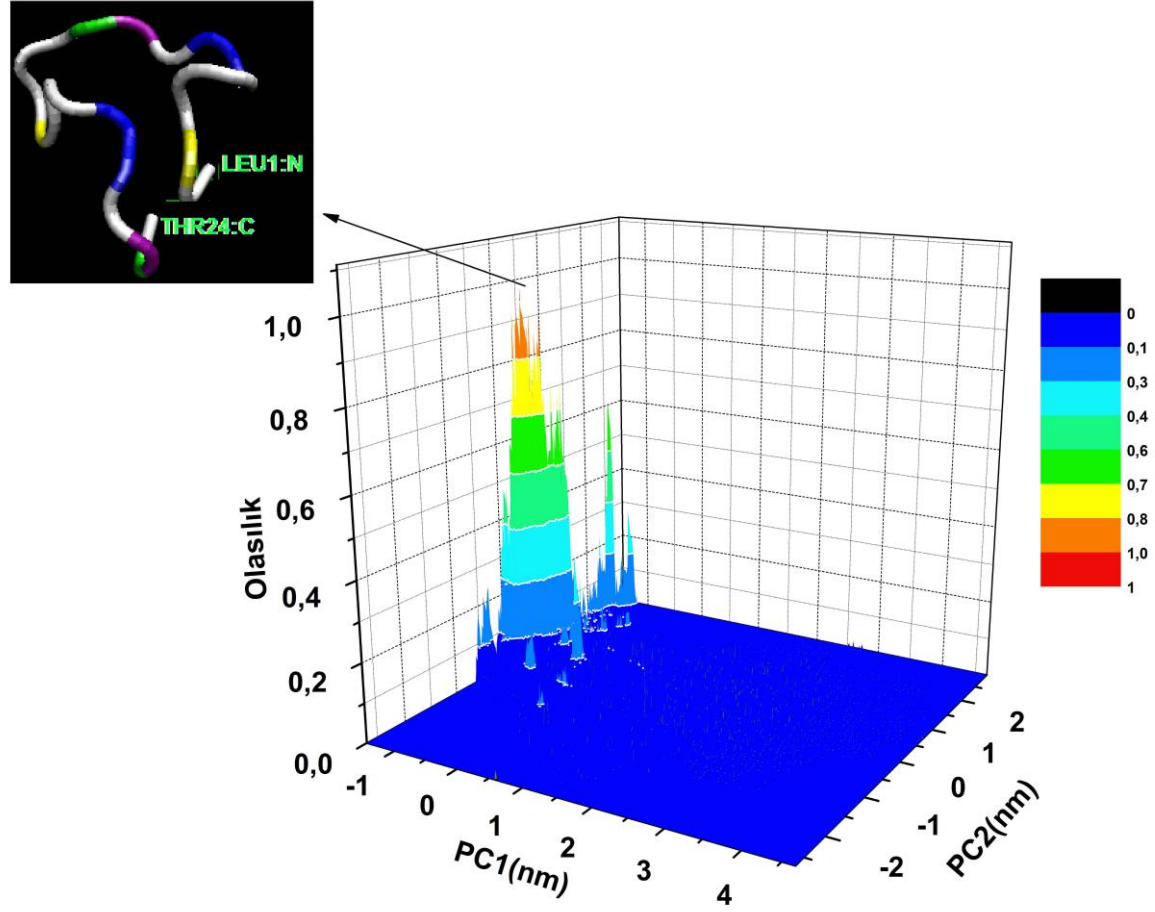
katkıların şiddeti 1. ve 2. dizilimler için hemen hemen aynı olmakla birlikte 3. dizilimde biraz daha farklılık göstermiştir. Aminoasitlerin sağladıkları hidrofilik katkıya bakıldığında en yüksek katkı His<sup>20</sup>, His<sup>7</sup> ve His<sup>32</sup>'den gelmektedir. En düşük hidrofilik katkıyı ise Pro<sup>10</sup> ve onun 2. ve 3. dizilimlerdeki karşılığı olan Pro<sup>22</sup>, Pro<sup>34</sup> ve Leu<sup>3</sup>, Leu<sup>25</sup>, Leu<sup>26</sup> aminoasitleri sağlamaktadır. PeptidIIM3 diziliminin çözücü ile yaptığı hidrojen bağ sayısına Şekil6.72 d'den bakıldığında en yüksek değere Thr<sup>5</sup>, Thr<sup>17</sup>, Arg<sup>21</sup>(+) aminoasitlerinin sahip olduğu ve en düşük değere ise Pro<sup>10</sup> ve onun 2. ve 3. tekrarda karşılığı olan Pro<sup>22</sup> ve Pro<sup>34</sup> aminoasitlerinde görülmektedir.



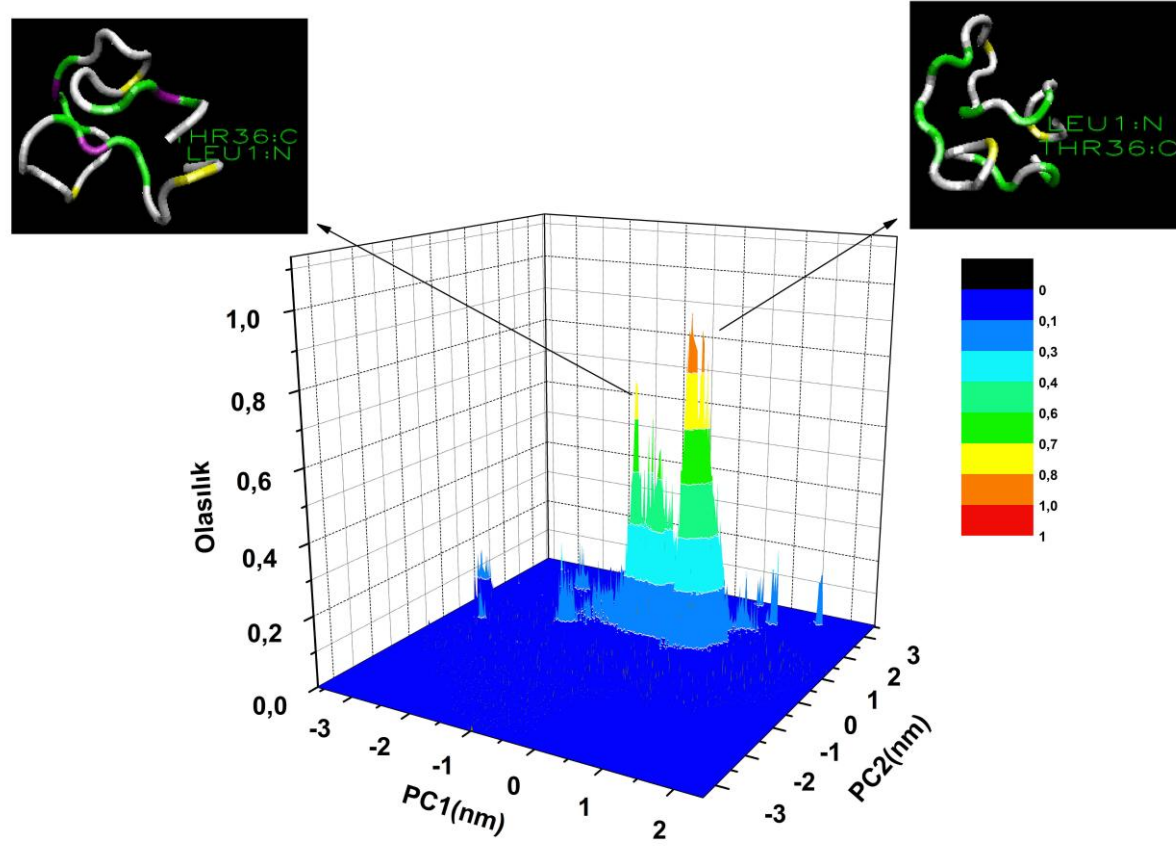
Şekil 6.72 PeptidIIM3 için a. hidrofobik SASA b. hidrofilik SASA c. toplam SASA d. moleküller arası ortalama hidrojen bağ sayısı

### 6.5.3.3 Temel Bileşen Analizi (PCA)

PeptidII'nin ikili ve üçlü dizilimlerinin 64 kopyadan oluşan REMD simülasyonlardan elde edilen yörüngeler birleştirilerek Temel Bileşen Analizi uygulanmıştır. Bu analiz sonucu elde edilen konformasyonel olasılık dağılımları Şekil 6.73-74' de verilmektedir.



Şekil 6.73 PeptidIIM2 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımı.



Şekil 6.74 PeptidIIM3 için PC1 ve PC2 ye göre konformasyonel olasılık dağılımı.

PeptidIIM2 için PC1 ve PC2' ye göre konformasyonel olasılık dağılımları Şekil 6.73' den görüldüğü gibi belli bir bölgede toplanmıştır. Bu konformasyonların toplandığı bölge PC1 ve PC2' ye göre sırasıyla (-1.5; 0.0) ve (-1.5; 1.0) civarında merkezlenmiştir. En yüksek konformasyonel olasılık dağılımına karşılık gelen yapıların bir temsili şeklin solunda okla gösterilmiştir. Bu konformasyon çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma, beta dönüşleri yapılarının yanı sıra beta köprüsü ve heliks yapılarına sahiptir. PeptidIIM3 için ise ilk iki temel bileşene göre tüm yörüngeler iki bölgede popülasyon göstermiştir. Maksimum olasılığa sahip I. bölge PC1 ve PC2' ye göre (0.0;1.5) ve (-1.0; 1.0) civarında, II. bölge ise (-1.0; 0.0) ve (-1.0; 1.0) civarında merkezlenmiştir (Şekil 6.74). Bu piklere karşılık gelen yapılar, şeklin sağında ve solunda oklarla gösterilmiştir. Birinci pike karşılık gelen en olası yapıların temsili olan bir yapı rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşleri ikincil yapılarına sahipken, ikinci pike karşılık gelen konformasyon ise bu üç yapıya ek olarak beta köprüsü yapısına da sahiptir.





## BÖLÜM 7

### SONUÇ

Proteinlerin katlanarak aldığı üç boyutlu formlarının belirlenmesi onların işlevleri hakkında önemli bilgiler verirken, tıpta ilaç dizaynı için önemli bir katkı sağlayacağı gibi endüstriyel kullanımı en yaygın olan polimerlerden, biyosensörlere, gıda güvenliği ve teknolojisine kadar geniş bir alanda değerlendirme olanağı sağlamaktadır.

Bir proteinin termodinamik özellikleri ile kararlı yapılarının belirlenmesinde deneysel yöntemler önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle 3 boyutlu yapılarının belirlenmesinde X-ışınları, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) gibi değişik spektral yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber, herhangi bir peptid veya proteinin dinamik davranışı ya da meydana gelen katlanma olayının anlaşılmasında yeterli bilgi, deneysel yöntemlerden elde edilemeyebilir. Ya da, sentezlenen herhangi bir peptid veya proteinin yaşam ömrü kısa olması durumunda deneysel yöntemleri kullanma imkanı olmayabilir. Bu gibi durumlarda sistemin anlaşılması için kuramsal yöntemlere başvurulması kaçınılmaz olmaktadır. Protein yapılarının oldukça yüksek esnekliğe sahip olması, anormal sayıda mümkün konformasyonlara neden olduğundan, çok sayıda serbestlik derecesine sahip bu tür sistemlerin kuramsal açıdan anlaşılması oldukça zordur. Tamamı ile yeni matematiksel yaklaşımlarla bu sistemler izah edilmeye çalışılmasına rağmen, en önemli bilgilerin simülasyon çalışmaları ile elde edileceği bilinmektedir.

Protein katlanma mekanizmalarını anlamak, ilaç dizaynı için önerilebilecek yeni peptid dizilimlerinin yapısal ve termodinamik özelliklerini araştırmak için sıkça kullanılan simülasyon yöntemleri MC ve MD simülasyon yöntemleridir. Bu tez kapsamında deterministik bir yöntem olan MD ve REMD simülasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler, protein ve peptidlerin ikincil yapılarını araştırmak için uygulanan en popüler hesaplama araçlarındandır. Bu tez çalışmasında kolabrotörlerimiz tarafından deneysel yöntemlerle sentezlenmiş ve gıda zehirlenmelerine neden olan SEB toksinlerinin

saptanmasında biyosensör olarak kullanılabilirlikleri öngörölmüş üç farklı peptidin ve bunların tekrarlı dizilimlerinin MD ve REMD simölasyonları ile yapısal ve termodinamiksel özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, protein ve peptidlerin oluşturduğu sistemlerin enerji düzeylerinin yüksek enerji bariyerleriyle ayrılmış çok sayıda yerel minimumlara sahip olmasından dolayı, MD simölasyonlarımızı gerçekleştirirken bu minimumlardan herhangi birine takılma olasılığını en aza indirebilmek için literatürde de benzerleri olan bir yol haritası belirlenerek, en açık yapıdan başlayarak gerçekleştirdiğimiz MD simölasyonlarında, özellikle vakum aşamasında daha kararlı yapılara erişebilmek amacıyla 1000 K den 300 K sıcaklığa tavlama işlemi yapılmıştır. Ön görölen her üç peptid diziliminin sulu ortamdaki tekli formlarının MD simölasyonları 30 ns' lik bir simölasyon zamanında gerçekleştirmiş ve ziyaret edilen konformasyonlarının ikincil yapıları DSSP protokü ile ayrı ayrı belirlenmiştir ve bunların yüzde ağırlıkları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında tüm peptidler için ağırlıklı ikincil yapıların rastgele sarım, beta dönüşü ve kıvrılma yapıları olduğu ve ilk ve son aminoasitlerin simölasyonlar boyunca rastgele sarım yapı formu gösterdiği görölmüştür. Terminal aminoasitlerin zwitter-iyon forma sahip olmalarından dolayı bu rastgele sarım yapı gözlenmesi beklenen bir durumdur. Çalışmamızda peptitlerin diğer orta bölgelerinin kazandıkları ikincil yapı formları RMSD değerlerinin değişimine de bakılarak ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur. Her üç peptid dizilimi için klasik MD simölasyonu yapılarak elde edilmiş sonuçların, kolabratörlerimizin aynı şartlarda geçmişte elde ettiği sonuçlarla uyustuğu saptanmıştır (Oğuz 2011). Bunun yanında bu sonuçlar kolabratörlerimiz tarafından yorumlanarak, deneysel sonuçlarla karşılaştırılmış ve aralarındaki uyumlar yorumlanarak literatürde yayımlanmıştır (Dudak et al. 2010).

Protein katlanma (folding) simölasyonlarında, özellikle düşük sıcaklıkta, simölasyonlar çok sayıda yerel minimum enerji durumlarından birine takılma eğilimi gösterebildiğinden, klasik simölasyon metotlarıyla tam bir kanonik dağılımın elde edilmesinin zor olduğu bilinmektedir. Bu problemin üstesinden gelmek için genelleştirilmiş topluluk algoritmalarına başvurulmaktadır. Genelleştirilmiş topluluk algoritmalarından biri de GROMACS yazılımına uygunluğu da olan REMD algoritmasıdır. Bu sebepten dolayı çalışmamızda tekli peptid dizilimleri için yapılan MD simölasyonları yanında 52 farklı sıcaklığı temsil eden kopya ile REMD simölasyonları da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enerji histogram eğrilerinin örtüşmesinden REMD simölasyonlarımızın başarı olduğu sonucuna varılmıştır. REMD

simülasyonlarımızdan faydalanarak yine her peptid dizilimi için DSSP protokolü ile seçilen dört farklı sıcaklık için ikincil yapı analizleri yapılmış ve bu yapıların yüzde ağırlıkları saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar tüm peptidlerde ilk iki ve son iki aminoasitlerin rastgele sarım yapıyı tercih etmesinin yanında, aynı MD simülasyonlarında olduğu gibi, ağırlıklı ikincil yapı tiplerinin rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Literatürdeki bu peptidler için yapılmış deneysel CD spektroskopi sonuçlarında ise (Dudak et al. 2010), baskın ikincil yapıların her üç peptid için rastgele sarım,  $\beta$ -strand ve beta dönüşleri şeklinde olduğu rapor edilmiştir. Bahsedilen bu deneysel çalışmada ayrıca az miktarda heliks yapının mevcut olduğu ve yüksek  $\beta$ -strand oranının kısa peptidler için fitting metotta kaynaklanabileceği de vurgulanmıştır. Bu fitting metotta yüksek moleküler boyutlu proteinler referans olarak kullanıldığı için metodun yetersiz olabileceği de vurgulanmıştır. Tüm bu noktalar ele alındığında, REMD simülasyon sonuçlarımızın literatürdeki deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu söylenebilir.

Çalışmanın REMD ile yapılan bu kısmında, ayrıca temel bileşen analizi (PCA) uygulanarak çok sayıda serbestlik derecesine sahip olan peptid sistemlerimizin sadece iki temel bileşen vasıtasıyla betimlenebildiği de ortaya konulmuştur. Bu iki temel bileşenin dağılımına bakılarak peptidlerimizin sahip olduğu konformasyonel olasılık dağılımları ve en yüksek olasılığa sahip olan konformasyonel yapıları tespit edilmiştir. PeptidI ve PeptidII için bu en olası bölgede 1 pik tespit edilirken PeptidIII için 2 pik saptanmıştır. PeptidI ve PeptidII için ilk iki temel bileşene göre en baskın yapıların ağırlıklı olarak rastgele sarım, beta dönüşü ve kıvrılma yapıları olduğu tespit edilmiştir. PeptidIII içinse yine ikincil yapıların ağırlıklı olarak rastgele sarım ve kıvrılma yapıları şeklinde olmasına karşın, 1. pik için beta dönüşü yapısı ve 2. pik için ise heliks yapının önemli ölçüde ortaya çıktığı görülmüştür.

Ayrıca tekli peptid dizilimleri için yapılan REMD simülasyonlarının sonuçları ile 300 K sıcaklıklı klasik MD sonuçları karşılaştırıldığında, her iki simülasyon sonucunda da baskın yapıların çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşleri şeklinde olduğu ve uç terminal aminoasitlerinin tümüyle rastgele sarım yapı gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, PeptidII için klasik MD simülasyonlarında gözlenmeyen  $\beta$ -köprüsü yapılarının REMD simülasyonlarında ortaya çıktığı ve klasik MD simülasyonlarında çok az oranda rastlanan heliks yapının ise REMD simülasyonlarında daha fazla olduğu söylenebilir. Bu farklılıklar PeptidII konfigürasyonlarının klasik MD simülasyonları esnasında herhangi bir yerel minimuma takılmış olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda ayrıca, PeptidII ve PeptidIII' ün aminoasit dizilimlerinin her birinin ayrı ayrı birbiri ucuna ikili ve üçlü dizilimler şeklinde eklenmesi yoluyla SEB'e olan afinitesininin değişip değişmediğinin tespiti yönünde yapılan deneysel çalışmalara destek vermek amacıyla, bu tekrarlı dizilimlerin de MD ve REMD simülasyonları da tarafımızdan yapılmıştır.

Tekrarlı yapıların klasik MD simülasyonlarında yine yerel minimumlara takılma probleminin üstesinden gelebilmek amacıyla diğer MD simülasyonlarından ayrı olarak, simülasyonu yapılan peptid dizilimlerinin başlangıç yapılarının farklı seçilmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla, vakum aşamasındaki tavlama işlemi iki farklı yoldan yapılmıştır. İlkinde ilgilenilen peptid 1000 K sıcaklıktan bir takım yollarla 300 K sıcaklığa, diğerinde ise yine aynı yollardan 1000 K sıcaklıktan 600 K sıcaklığa soğutulmuştur. Vakum aşamasındaki bu simülasyonlar sonunda, yığın (cluster) analizi (van der Spoel et al 2005) yapılarak her iki sıcaklıktan en çok ziyaret edilen dörder farklı yapı seçilerek çözücü ortamına konulmuş ve normal MD simülasyonlarımız her peptid dizilimi için toplam sekiz ayrı başlangıç yapısından devam ettirilmiştir. Her peptid dizilimi için elde edilen ikincil yapı değişimleri ve bu yapıların ağırlıklı yüzdelere analizleri ışığında, 8 farklı başlangıç yapısı kullanılmasına rağmen tüm örneklerde rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşü yapılarının baskın olduğu, ilk ve son aminoasitlerin tüm simülasyon boyunca rastgele sarım yapıya sahip olduğu görülmüştür. PeptidIIM2 ve PeptidIIM3 simülasyon sonuçları birbiriyle karşılaştırıldığında, PeptidIIM3' ün PeptidIIM2' den daha çok beta dönüşü yüzdesine sahip olduğu, simülasyonlar boyunca PeptidIIM2 önemli miktarda beta köprüsü ve alfa-heliks yapılarına sahipken, bu yapıların PeptidIIM3' de nadiren görüldüğü tespit edilmiştir. Her iki peptid arasındaki bir diğer fark ise, bu peptidlerin çoğunlukla kararlı durumlar göstermelerine karşın bu kararlılık durumunun PeptidIIM3' de daha yaygın olarak görülmesidir.

Bu tekrarlı yapıların MD sonuçlarına PCA uygulanarak en olası konformasyonlar da belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde, tüm dizilimler için ilk iki temel bileşenin hareketin önemli bir bölümünü karşıladığı görülmüştür. PeptidIIM2 için hareketin dağılımı belli bir bölgede toplanmış iki keskin pikli bir olasılık dağılımı şeklinde karşımıza çıkmıştır. Bu piklere karşılık gelen I. Konformasyon çoğunlukla rastgele sarım, beta dönüşü ve beta köprüsü popülasyon olasılığına sahip iken, II. Konformasyonda çoğunlukla beta dönüşü, rastgele sarım ve alfa heliks popülasyonlarına rastlanmıştır. PeptidIIM3 için tüm yörüngeler belli iki ayrı bölgede popülasyon göstermiştir. Bu bölgelere karşılık gelen ortalama konformasyonların için beta dönüşü ve rastgele sarım şeklindeki ikincil yapılar en dominant

yapılar olarak karşımıza çıkmıştır. Diğer taraftan, PeptidII' nin ikili ve üçlü dizilimleri karşılaştırıldığında, PeptidIIM2' nin PC1 ve PC2 dağılımlarının PeptidIIM3' ün I. bölgesiyle örtüştüğü görülmüştür. PeptidII'nin her iki dizilimi için de bu bölgede çoğunlukla beta dönüşü ve rastgele sarım yapı ortaya çıkmıştır. Peptid IIM2 dizilimi için yapılan analizde ise, en yüksek olasılıklı birkaç bölge ortaya çıkmış ve bu bölgeye denk gelen konformasyonların ikincil yapılarının da beta dönüşü, rastgele sarım ve heliks formlara sahip olduğu görülmüştür.

SEB' e afinite gösteren peptidlerin tekrarlı dizilimleri için yapılan bu MD simülasyonları ve PCA sonuçları bir arada değerlendirilerek, kolabratörlerimiz tarafından elde edilmiş deneysel sonuçlarla birlikte yorumlanmış ve elde edilen çıkarımlar literatürde yayımlanmıştır (Dudak et al. 2012). Sonuçlar özellikle PeptidII' nin ikili tekrarlarının afiniteyi 10 kat kadar arttırdığını, ancak beklenmedik bir şekilde üçlü tekrarının ise afiniteyi azalttığını göstermiştir. İlgili çalışmada bu durum, üçlü tekrarlı zincirin daha çok katlanması sebebiyle, dizilimlerin ortalarında bulunan aktif bölgelerin, bu katlanmış yapının iç kısımlarda kalmasının bir sonucu olarak açıklanmıştır. Diğer yandan MD sonuçlarına bakılarak da konformasyonel farklılıkların tekrarlı peptid dizilimlerinin afinitesi için anahtar rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

Deneysel sonuçlarla birlikte klasik MD sonuçları yorumlandığında tekli peptid dizilimlerine göre afinite artış sağlayan PeptidIIM2 ve azalış gösteren PeptidIIM3 dizilimlerinin konformasyonel değişimlerinin daha detaylı incelenmesi amacıyla çalışmamızda, 64 farklı sıcaklığı temsil eden kopya ile REMD simülasyonları da yapılmıştır. Her iki tekrarlı peptid dizilimi için elde edilen enerji histogramları eğrilerinin örtüşmesinden REMD simülasyonlarımızın başarı olduğu sonucuna varılmıştır. REMD simülasyonlarımızdan faydalanarak yine her peptid dizilimi için DSSP protokolü ile seçilen dört farklı sıcaklık için ikincil yapı analizleri yapılmış ve bu yapıların yüzde ağırlıkları saptanmıştır. REMD simülasyonları süresince peptidlerin sahip oldukları ikincil yapılarının yüzde ağırlıkları Çizelge 6.5' de bir arada verilmiştir. Çizelgeden PeptidIIM2' nin rastgele sarım ve heliks yapı yüzdesinin her sıcaklık için PeptidIIM3' ünkinden daha fazla olduğu görülürken, kıvrılma yapılarının yüzdesinin ise daha düşük olduğu görülmektedir. Diğer yandan her iki peptid dizilimi için en ağırlıklı yapılar olan rastgele sarım ve kıvrılma yapılarının sıcaklıkla çok fazla değişmediği görülmektedir. PeptidIIM2 dizilimindeki heliks oranının sıcaklıkla artmasına karşın PeptidIIM3' te tam tersi bir durum söz konusu olmuştur. Bunun yanında çok az

miktarda rastlanan  $\beta$ -köprüsü yapısı ise her iki peptid dizilimi için de en yüksek oranda 319 K sıcaklıkta ortaya çıkmıştır.

Tekrarlı peptid dizilimlerinin 64 kopyadan oluşan REMD simülasyonları süresince ziyaret ettiği konformasyonların en olası olanlarının tespit edilmesi için temel bileşen analizi uygulanmıştır. PeptidIIM2 diziliminin konformasyonel olasılık dağılımının belli bir bölgede yoğunlaştığı görülürken, PeptidIIM3 diziliminin yoğunlaştığı bölgenin iki pike sahip olduğu görülmektedir. PeptidIIM2 için en olası yapıların bir temsilinin çoğunlukla rastgele sarım, kıvrılma, beta dönüşleri yapılarının yanı sıra az miktarda beta köprüsü ve heliks yapılarına sahip olduğu tespit edilmiştir. PeptidIIM3 için ise ilk iki temel bileşene göre iki bölgede yoğunlaşan yapılardan birincisinin rastgele sarım, kıvrılma ve beta dönüşleri ikincil yapılarına sahipken, ikinci pike karşılık gelen konformasyonun ise bu üç yapıya ek olarak beta köprüsü yapısına sahip olduğu belirlenmiştir.

Klasik MD ve gelişmiş bir algoritma olan REMD simülasyonlarıyla ayrıntılı olarak yapısal ve termodinamik özelliklerini incelediğimiz bu peptidlerin SEB'e olan afinitesinin, hangi yapısal bölgelerinden kaynaklandığının ve bu afiniteyi arttırmanın yollarının ortaya net olarak koyulabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sadece sulu ortamda çeşitli farklı protokoller izleyerek en kararlı yapılara ulaşmayı hedeflediğimiz bu çalışmalara ek olarak, seçilen peptid dizilimlerinin SEB'ile birlikte simüle edilebilmesi yolundaki çalışmaların daha ileri bilgiler sunacağını düşünmekteyiz. Bunun yanında farklı ortam şartlarının da yapısal etkilerinin araştırılması ve bu peptid dizilimlerine yakın mutant çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen sonuçlar ve simülasyonlar için izlediğimiz protokollerin ileriki çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Andersen H C** (1983) RATTLE: A “Velocity” Version of the SHAKE Algorithm for Molecular Dynamics Calculations. *Journal of Computational Physics*, 52: 24–34.
- Anon** (1994) Biyofizik Ders Notları. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Genişletilmiş İkinci Baskı, p: 111-112.
- Arkin H** (2007) Multikanonik Simülasyon Yöntemi ile Peptidlerin Sıvı İçerisindeki Yapılarının İncelemesi. *SU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11-1: 1-7.
- Baysal C and Meirovitch H** (1997) Novel procedure for developing implicit solvation models for peptides and proteins. *J. Phys. Chem. B*, 101: 7368- 7370.
- Berendsen H J C, Postma J P M, van Gusteren W F and Hermans J** (1981) In Intermolecular Forces. B. Pullman Ed., Reidel, Dordrecht.
- Berendsen H, Postma J, DiNola A and Haak J** (1984) Molecular Dynamics with coupling to an external water bath. *J. Chem. Phys.*, 81:3684-3690.
- Bilsel M** (2009) Elastin Kökenli Peptid Zincirlerinin Yapısal Geçişlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bussi G, Donadio D and Parrinello M** (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.*, 126, 014101:1-7.
- Copps J, Murphy R F and Lovas S** (2008) Peptide-Based Drug Design, p 115-126.
- Cornell W D, Cieplak P, Bayly C, Gould IR, Merz K M Jr, 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. *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 5179–5197.
- Darden T, York D and Pedersen L** (1993) Particle mesh Ewald: An N-log (N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98: 10089.
- Dudak F C, Soykut E A, Oğuz M E, Yaşar F and Boyacı İ A** (2010) Thermodynamic and structural analysis of interactions between peptide ligands and SEB. *J. Mol. Recognit.*, 23: 369–378.
- Dudak F C, Kilic N, Demir K, Yasar F and Boyaci I H** (2012) Enhancing the affinity of SEB-binding peptides by repeating their sequence. *Peptide Science*, 98: 145-154.



## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Eisenberg D and McLachan A D** (1986) Solvation energy in protein folding and binding. *Nature*, 319: 199-203.
- Eisenberg D, Wesson M and Yamashita M** (1989) Interpretation of protein folding and binding with atomic solvation parameters. *Chem. Scripta*, 29A, 217-221.
- Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H and Pedersen L G** (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem Phys.*, 103: 8577-8593.
- Haile J M** (1992) Moleküler Dynamics Simulation Elementary Methods. 2nd ed., John Wiley Sans Inc., Canada.
- Hansmann U H and Okamoto Y** (1993) Prediction of peptide conformation by multicanonical algorithm: new approach to the multiple-minima problem. *J. Comput. Chem.*, 14: 1333-1338.
- Hao M H and Scheraga H A** (1994) Monte Carlo Simulation of A first- order transition for protein folding. *J. Phys. Chem.*, 98: 4940-4948.
- Hess B, Bekker H, Berendsen H J C and Fraaije J G E M** (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, 18: 1463-1472.
- Humphrey W, Dalke A and Schulten K** (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph*, 14: 33-38.
- ITAP** (2008) Biyobilişim ve Polimerlerin İstatistiksel Fiziği Çalıştayı Ders Notları, Marmaris Kuramsal ve Uygulamalı Fizik Araştırma Enstitüsü.
- 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. *J. Chem. Phys.*, 79:926-936.
- Jorgensen W L and Madura J D** (1985) Temperature and Size Dependence for Monte Carlo Simulations of TIP4P Water. *Mol. Phys.*, 56: 1381-1392.
- Jorgensen W L and Severance D L** (1990) Aromatic-aromatic interactions: free energy profiles for the benzene dimer in water, chloroform, and liquid benzene. *J. Am. Chem. Soc.*, 112: 4768-4774.
- Kabsch W and Sander C** (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22: 2577-2637.
- Kim A** (1990) Amino acid side chain contribution to free energy of transfer of tripeptides from water to octanol distertation. University of California.
- Kirkpatrick S, C D Gelatt and M P Vecchi** (1983) Optimization by Simulated Annealing, *Science*. 220: 671-680.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Leach A R** (2001) *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Second Edition, Pearson Education, England, 1.p.
- MacKerell A D, Bashford D, Bellott M, Dunbrack R L, Evanseck J D, Field M J, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-McCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau F T K, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen D T, Brodhom B, Reiher W E, Roux B, Schlenkrich M, Smith J C, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz J-Kuczera, Yin D and Karplus M.** (1998) All Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies for Proteins. *J. Phys. Chem. B* (1998) 102: 3586-3616.
- Mahoney M W and Jorgensen W L** (2000) A five-site model liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, non-polarizable models. *J. Chem. Phys.*, 112: 8910-8922.
- Meirovitch H and Meirovitch E** (1997) Efficiency of Monte Carlo minimization procedures and their use in analysis of NMR data obtained from flexible peptides. *J. Comput. Chem.*, 18: 240- 253.
- Oğuz M E** (2011) Moleküler Dinamik Simülasyon Metodu ile Bazı Peptidlerin İkincil Yapılarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Okamoto Y** (1998) Nonextensive Statistical Mechanics and Its Applications. Recent Res. Devel. In Pure & Applied Chem., 2.
- Ooi T, Obatake M, Nemethy G and Scheraga H A** (1987) Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides. *Prod. Natl. Acad. Sci.*, 84: 3086.
- Papaleo E, Mereghetti P, Fantucci P, Grandori R and De Gioia L** (2009) Free-energy landscape, principal component analysis, and structural clustering to identify representative conformations from molecular dynamics simulations: The myoglobin case. *J. Mol. Graphics Mod.*, 27: 889-899.
- Parrinello M and Rahman A** (1981) Polymorphic transitions in single-crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52: 7182–7190.
- Patriksson A and van der Spoel D** (2008) A temperature predictor for parallel tempering simulations. *Phys. Chem.*, 10: 2073-2077.
- Pehlivan F** (1997) *Biyofizik*. Hacettepe Taş Kitapçılık, İkinci Baskı, Ankara.
- Ryckaert J P, Ciccotti G and Berendsen H J C** (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints; molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.*, 23:327–341.

## KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Schiffer C A, Caldwell J W, Kollman P A and Stroud R M** (1993) Protein structure prediction with a combined solvation free energy-molecular mechanics force field. *Mol. Simul.*, 10: 121.
- Sippl M J, Nemethy G and Scheraga H A** (1984) Intermolecular potentials from crystal data. 6. Determination of empirical potentials for O-H...O = C hydrogen bonds from packing configurations. *J. Phys. Chem.*, 88:6231–6233.
- Sugita Y and Okamoto Y** (1999) Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, 314:141-151.
- Telefoncu A** (1999) Biyosensörler. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- URL-1** (2012) [http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders\\_Notlari/Proteinler.html](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Proteinler.html), Ankara Üniversitesi, Ders Notları.
- URL-2** (2012) <http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/proteinler.pdf>, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Ders Notları.
- Van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark A E and Berendsen H J C** (2005) Gromacs: Fast, Flexible, and free. *J. Comp. Chem.*, 26: 1701-1718.
- Van Gunsteren W F, Billeter S R, Eising A A, Hünenberger P H, Krüger P, Mark A E, Scott W R P and Tironi I G** (1996) Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and user guide . Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, p 1-1024.
- Verlet L** (1967) Computer experiments on classical fluids. i. thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.*, 159:98–103.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Nesrin KILIÇ 1981'de Karabük'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladıktan sonra 1998'de Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Fizik Bölümü'ne girdi. 2002 yılında bu bölümden mezun olduktan sonra aynı yıl yine KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Fizik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2006 yılında yüksek lisanstan mezun olduktan sonra aynı yıl Bülent Ecevit Üniversitesi (BEÜ) Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Fizik Anabilim dalında doktora programı'na başladı 2008 yılında BEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak göreve başlamış ve halen devam etmektedir.

### **ADRES BİLGİLERİ**

Adres : BEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü  
67100 İncivez/ ZONGULDAK

Tel : (372) 257 4010/1745

Faks : (372) 257 2140

E-posta : nesrinkilic@karaelmas.edu.tr