



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OKSİGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİF MERKEZ

ÖZELLİKLERİNİN MODEL YAPI KATEKOL

OKSİDAZ (E.C. 1.10.3.1) ÜZERİNDE MOLEKÜLER

MODELLEME YOLU İLE İNCELENMESİ

Enis ÜNAL

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 13.12.2013

Bornova-İZMİR

2013

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**OKSİGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİF MERKEZ
ÖZELLİKLERİNİN MODEL YAPI KATEKOL
OKSİDAZ (E.C. 1.10.3.1) ÜZERİNDE MOLEKÜLER
MODELLEME YOLUYLA İNCELENMESİ**

Enis ÜNAL

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 13.12.2013

Bornova-İZMİR

2013

Enis ÜNAL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Oksigenaz Enzimlerinin Aktif Merkez Özelliklerinin Model Yapı Katekol Oksidaz (E.C 1.10.3.1) Üzerinde Moleküler Modelleme Yoluyla İncelenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş vetarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

ÖZET**OKSİGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİF MERKEZ
ÖZELLİKLERİNİN MODEL YAPI KATEKOL OKSİDAZ
(EC 1.10.3.1) ÜZERİNDE MOLEKÜLER MODELLEME YOLUYLA
İNCELENMESİ**

ÜNAL, Enis

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ

Aralık 2013, 83 sayfa

Bu tezde katekol oksidaz (E.C.1.10.3.1) enzimin aktif merkez özellikleri moleküler modelleme yöntemleri ile incelendi. “Protein Data Bank” üzerinden elde edilen kristal yapılar üzerinden aktif merkez hazırlandı. Native ve inhibe (Katekol oksidaz-PTU) enzim formları ile farklı yük ve çok katlılık koşullarında hesaplamalar gerçekleştirildi. Hesaplamalar için MM-UFF, PM6, PM3tm, B3LYP/Gen (LANL2DZ, 6-311G**) yöntemleri kullanıldı. Ayrıca aktif merkezde yer alan bakır atomları mangan ile değiştirildi ve hesaplamalar gerçekleştirildi. Elde edilen veriler ile aktif merkez geometrisi, substrat bağlanma modu, reaksiyon için uygun yük durumu ve elektronik yapı değerlendirildi. Katekol oksidaz aktif merkezde yer alan iki bakır atomu her biri üçer histidin tarafından koordine edilmektedir. Bu nedenle tez kapsamında histidin molekülü ayrıca incelenmiştir. Üç farklı imidazol formu ile olası tüm yük durumları kapsayan 12 farklı histidin yapısının Spartan 08 programı ile MM-Sybyl yöntemi kullanılarak konformer analizi gerçekleştirildi. Elde edilen yapılar Gaussian 09 programı ile B3LYP/cc-pVDZ yöntemi kullanılarak optimize edildi ve frekans analizi yapıldı.

Anahtar Sözcükler: Katekol oksidaz, Tip-3 bakır, Histidin, Histidin konformerleri, Moleküler modelleme, DFT.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE ACTIVE SITE PROPERTIES OF
OXYGENASE ENZYMES ON THE CATECHOL OXIDASE (EC
1.10.3.1) AS MODEL STRUCTURE WITH MOLECULAR
MODELLING METHODS**

UNAL, Enis

MSc in Biochemistry Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cenk SELÇUKİ

December 2013, 83 pages

In this study, the properties of active site of catechol oxidase (E.C. 1.10.3.1) was investigated by molecular modelling methods. Initial structures were prepared from crystal structures obtained from “Protein Data Bank”. Calculations were performed in variable charge and multiplicity states with native and inhibited (Catechol oxidase-PTU complex) forms of catechol oxidase. MM-UFF, PM6, PM3tm and B3LYP/Gen (LANL2DZ, 6-311G**) methods have been used in calculations. In addition, copper ions in active site were replaced with manganese ions and calculations were performed. Calculated data on, active site geometry, substrat binding mode, charge state and the electronic structure were analyzed.

Both copper ions in active site of catechol oxidase are coordinated by three histidine residues. For this reason, histidine was investigated separately in detail. Twelve different forms of histidine that include all possible charge and terminal states, conformation distribution analyzes were performed by Spartan (MM-Sybyl). Obtained structures were optimized with Gaussian 09 quantum calculation program using B3LYP/cc-pVDZ and frequency analyzes calculations were performed.

Key Words: Catechol oxidase, Type-3 copper, Histidine, Histidine conformers, Molecular modelling, DFT.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince öncelikli olarak bana maddi ve manevi olarak destek olan aileme teşekkür ederim. Çalışma boyunca bilgisine başvurduğum ve her konuda yardım aldığım danışmanım Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ'ye özel bir teşekkürü borç bilirim. Ayrıca çalışmam boyunca bilgi alışverişinde bulunduğum tüm lisans üstü öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamda yer alan bazı hesaplamaların yapılmasında bize yardımcı olan TUBİTAK-ULAKBİM'e (TRUBA KAYNAKLARI) teşekkür ederiz.

Enis ÜNAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1.GİRİŞ	1
1.1 Katekol Oksidaz	2
1.2 Katekol Oksidaz Aktif Merkez Özellikleri	4
1.3 Tip-3 Bakır Ailesi.....	5
1.4 Histidin.....	6
2.METHOD.....	9
2.1 Moleküler Modelleme	9
2.2 Enerji Hesaplama ve Geometri Optimizasyonu	10
2.3 Konformasyonel Analiz	10
2.4 Kuantum Mekaniği.....	10

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.1 PM3TM (Parameterized number 3 transition metals)	11
2.4.2 Yoğunluk Fonsiyoneli Teorisi (Density Functional Theory)	11
2.4.3 B3LYP Yöntemi	12
2.5 Moleküler Mekanik	12
2.6 Hartree Atomic Unit (a.u.).....	12
2.7 Baz Seti.....	12
2.8 Hesapsal Bilgisayar programları	13
2.8.1 Spartan 08	13
2.8.3 Gauss View 05.....	13
3.SONUÇLAR.....	15
3.1 Histidin Konformasyonel Analiz Hesaplamaları.....	15
3.1.1 HID_NV konformasyon taramaları ve frekans analizleri.....	17
3.1.2 HIE_NV konformasyon taramaları ve frekans analizleri	21
3.1.3 HIP_CV konformasyon taramaları ve frekans analizleri	26
3.1.4 HID_ZW konformasyon taramaları ve frekans analizleri	29
3.1.5 HIE_ZW konformasyon taramaları ve frekans analizleri.....	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.6 HIP_ZCW konformasyon taramaları ve frekans analizleri.....	34
3.1.7 HID_AW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları	37
3.1.8 HIE_AW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları	40
3.1.9 HID_CW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları	43
3.1.10 HIE_CW konformasyon taramaları ve frekans sonuçları	46
3.1.11 HIP_NW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları.....	48
3.1.12 HIP_DiCW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları.....	52
3.2 Katekol Oksidaz	57
3.2.1 Hesaplama Hazırlıkları.....	57
3.2.2 Yarı-ampirik katekol oksidaz hesaplamaları.....	60
3.2.4 B3LYP/Gen katekol oksidaz hesaplamaları.....	70
4.Tartışma.....	73
4.1 Katekol oksidaz	74
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Tip-3 Bakır enzimleri aktif merkez yapısı	1
1.2 Katekol oksidaz native, kuşak görünümü.....	3
1.3 Katekol oksidaz native, çizgili görünüm.....	3
1.4 Katekol oksidaz aktif merkez yapısı	4
1.5 Katekol oksidaz-PTU kompleksi.....	5
1.6 Histidine amino asidi.....	6
1.7 Histidin iyonizasyonu.....	7
3.1 Histidin yapısal formları.....	16
3.2 Kararlılık sıralamasına göre HID_NV konformerleri.....	20
3.3 Kararlılık sıralamasına göre HIE_NV konformerleri.....	24
3.4 Kararlılık sıralamasına göre HIP_CV konformerleri.....	28
3.5 Kararlılık sıralamasına göre HID_ZW konformerleri.....	30
3.6 Kararlılık sıralamasına göre HIE_ZW konformerleri.....	33
3.7 Kararlılık sıralamasına göre HIP_ZWC konformerleri.....	36
3.8 Kararlılık sıralamasına göre HID_AW konformerleri.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.9 Kararlılık sıralamasına göre HIE_AW konformerleri.....	42
3.10 Kararlılık sıralamasına göre HID_CW konformerleri.....	45
3.11 Kararlılık sıralamasına göre HIE_CW konformerleri.....	47
3.12 Kararlılık sıralamasına göre HIP_NW konformerleri.....	51
3.13 Kararlılık sıralamasına göre HIP DiCW konformerleri	55
3.14 (A) Amino terminal uçlarının kapatılmasında kullanılan asetil, grubu (B) karboksil terminalinin kapatılmasında kullanılan N-asetil grubu.....	58
3.15 Hesaplamalar için hazırlanmış native katekol oksidaz aktif merkezi.....	59
3.16 Hesaplamalar için hazırlanmış enzim-inhibitör (PTU) kompleksi.....	60
3.17 Optimize native 2/1 bakır katekol oksidaz.....	64
3.18 Optimize inhibe 2/1 bakır katekol oksidaz.....	64
3.19 Optimize inhibe 4/1 bakır katekol oksidaz.....	64
3.20 Optimize native 4/1 mangan katekol oksidaz.....	67
2.21 Optimize CuA-MnB 2/1 katekol oksidaz, aktif merkez.....	69
3.22 Optimize MnA-CuB 2/1 katekol oksidaz, aktif merkez.....	69
3.23 Optimize native bakır katekol oksidaz 2/1, aktif merkez (B3LYP).....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

3.24 Optimize native mangan katekol oksidaz 2/1, aktif merkez (B3LYP).....72

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Histidin yapıları için isimlendirme sistemiği.....	15
3.2 HID_NV konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	17
3.3 HID_NV frekans analiz sonuçları.....	18
3.4 HIE_NV konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	21
3.5 HIE_NV frekans analiz sonuçları.....	22
3.6 HIP_CV konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	27
3.7 HIP_CV frekans analiz sonuçları.....	27
3.8 HID_ZW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	29
3.9 HID_ZW frekans analiz sonuçları.....	30
3.10 HIE_ZW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	32
3.11 HIE_ZW frekans analiz sonuçları.....	32
3.12 HIP_ZCW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	34
3.13 HIP_ZWC frekans analiz sonuçları.....	35
3.14 HID_AW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	38
3.15 HID AW frekans analiz sonuçları.....	38
3.16 HIE_AW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.17 HIE_AW frekans analiz sonuçları.....	41
3.18 HID_CW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	44
3.19 HID_CW frekans analiz sonuçları.....	44
3.20 HIE_CW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	46
3.21 HIE_CW frekans analiz sonuçları.....	47
3.22 HIP_NW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları.....	49
3.23 HIP_NW frekans analiz sonuçları.....	50
3.24 HIP_DiCW konformasyonları geometri optimizasyon sonuçları.....	53
3.25 HIP_DiCW frekans analiz sonuçları.....	54
3.26 Yarı-ampirik bakır katekol oksidaz enerji ve dipol moment değerleri	61
3.27 Yarı-ampirik bakır katekol oksidaz aktif merkez koordinasyon mesafeleri.....	62
3.28 Native Bakır-Oksijen Mesafeleri.....	62
3.29 İnhibe Bakır-Kükürt mesafeleri.....	63
3.30 Yarı-ampirik geometri optimizasyonu enerji ve dipol moment değerleri.....	65
3.31 Histidine-Metal koordinasyon mesafeleri.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.32 Mangan katekol oksidaz metal-oksijen mesafeleri.....	67
3.33 Bakır-Mangan geometri optimizasyonları enerji ve dipol moment değerleri.....	67
3.34 CuA-MnB Histidin-Metal koordinasyon mesafeleri.....	68
3.35 MnA-CuB Histidin-Metal koordinasyon mesafeleri.....	68
3.36 Bakır-Mangan katekol oksidaz metal-oksijen mesafeleri.....	68
3.37 Native katekol oksidaz geometri optimizasyonu enerji ve dipol moment değerleri.....	70
3.38 Native bakır ve mangan katekol oksidaz histidin kordinasyon mesafeleri.....	71
3.39 Native bakır ve mangan katekol oksidaz metal-oksijen mesafeleri.....	71

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Semboller

Açıklamalar

ψ

Dalga Fonksiyonu

Å

Angström

Kısaltmalar

a.u.

Atomic unit

PCM

Polarizable Continuum Model

CO

Katekol oksidaz

PTU

Fenil tiyo-üre

SCF

Self-consistent field

PM3

Parameterized method 3

PM6

Parameterized method 6

PM3TM

Parameterized method 3 transition metals

B3LYP

Becke'nin üç Parametre Hibrid Metodları

(Değişim Fonksiyoneli ile)

DFT

Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi

MM

Moleküler Mekanik

UFF

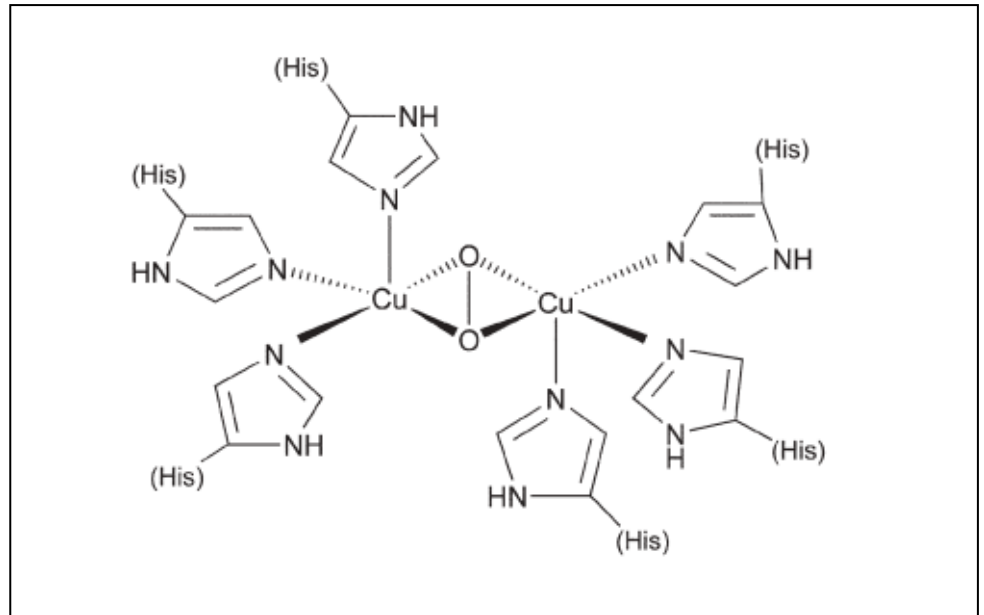
Universal force field

ZPE

Zero-point energy

1. GİRİŞ

Doğadaki proteinlerin büyük bir kısmı metaloproteindir ve bu proteinlerin birçoğu kritik biyolojik süreçlerde görev almaktadır (Martínez et al., 2012). Canlılarda oksijen metabolizması genellikle, bakır veya demir içeren metaloproteinler tarafından katalizlenir. En bilinen örnekleri demir içeren hem proteinleri miyoglobin ve hemoglobindir (Gerdemann et al., 2002). Aktif merkezinde bakır içeren enzimler genellikle çeşitli organik substratların oksidasyonu veya elektron transferinde görev alırlar. Başlangıçta tüm bakır proteinleri spektroskopik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır ve bunlar tip-1, tip-2 ve tip-3 aktif merkez olarak adlandırılırlar. Ancak, spektroskopi ve kristalografi alanlarında yaşanan gelişmeler farklı aktif merkez tiplerine sahip bakır enzimlerinin keşfine olanak sağlamıştır. Günümüzde bakır enzimleri 7 farklı sınıfa ayrılmaktadır (Koval et al., 2006). Tip-3 bakır aktif merkezine sahip enzimler oksidaz/oksigenaz veya dioksijen taşıyıcısı olarak fonksiyon gösterirler (Gerdemann et al., 2002).

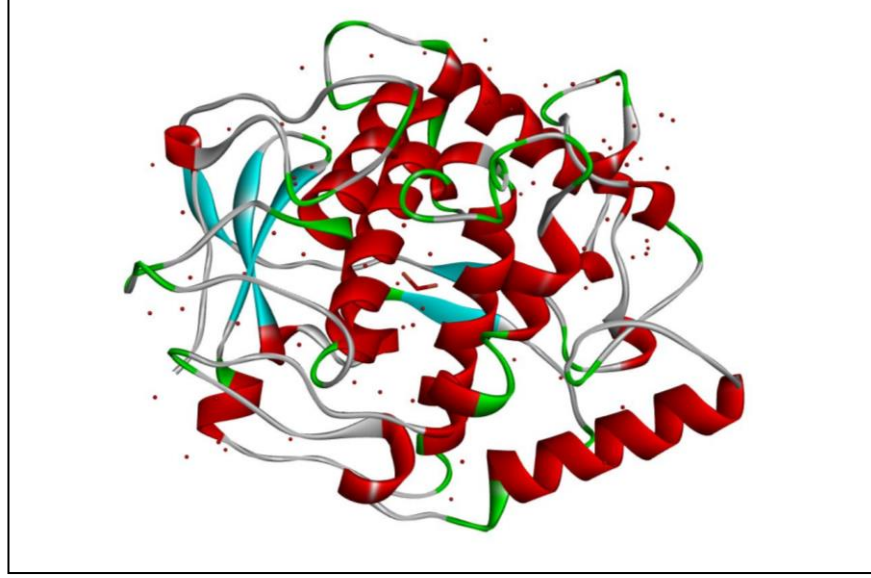


Şekil 1.1 Tip-3 Bakır enzimleri aktif merkez yapısı (Koval et al. 2006)

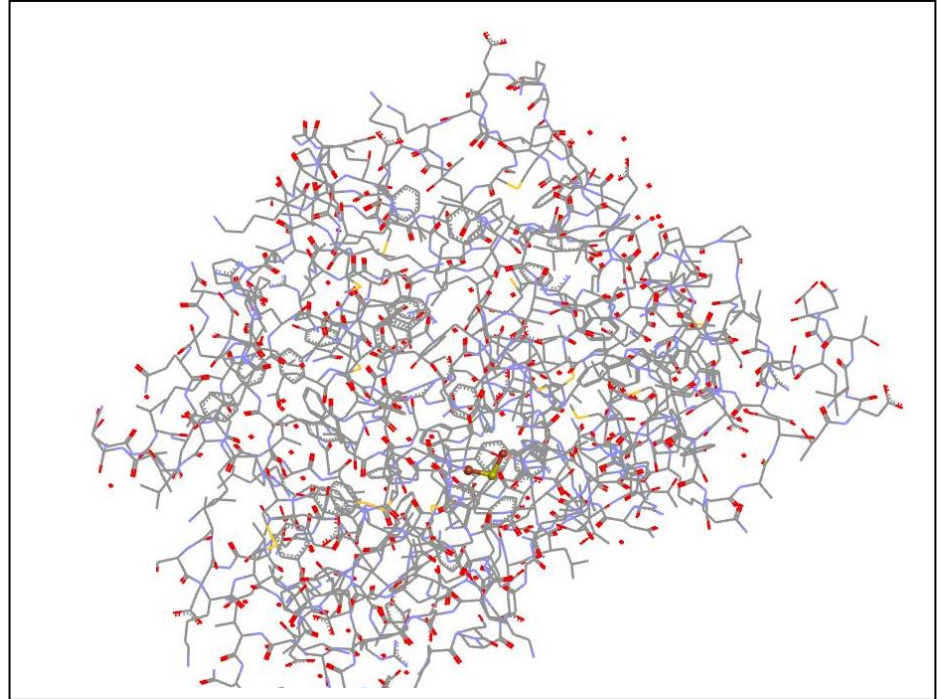
1.1 Katekol Oksidaz

Katekol oksidaz, dioksijen varlığında o-difenollerin o-kinon yapılarına dönüşümünü katalizleyen yaygın bir bitki enzimidir. Reaktif kinonların oluşumunu otopolimerizasyon ile katekol melaninlerinin oluşumu izler. Bu sürecin bitkinin patojen ve böceklerden korunması için gerçekleştiği düşünülmektedir (Güell and Siegbahn, 2007). Ayrıca bu reaksiyon medikal diagnostik açıdan katekolaminlerin ölçümü için ilgi konusudur (Eicken et al., 1999). Tirozinaz ve hemosiyanin ile birlikte bakır tip-3 enzim ailesinin bir üyesidir (Belle et al., 2007). Aktif merkezlerinde bakırlar ile birlikte histidin ligandları bulunur (Siegbahn 2004). Aktif merkezdeki bakırların (Cu(II)-Cu(II)) formunda) güçlü antiferromanyetik eşleşmesinden ötürü, EPR sinyali vermemesiyle karakterize edilir.

Katekol oksidazın kristal yapısı 1998 yılında elde edilmiştir (Klabunde et al) izole edilmiştir. Enzimin Native met formu (Cu(II)-Cu(II)), deoksi formu (Cu(I)-Cu(I)) ve feniltiyoüre inhibitörü ile bağlanmış formu kristal olarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzim monomeric ve elips şeklindedir. Sekonder yapı dörtlü α -sarmal (helix) yapısındadır. Helikal yapılar, her bir bakırın üçlü histidin uzantısı tarafından kordine edildiği katalitik dinükleer aktif merkezi sarmaktadır (Güell and Siegbahn, 2007).



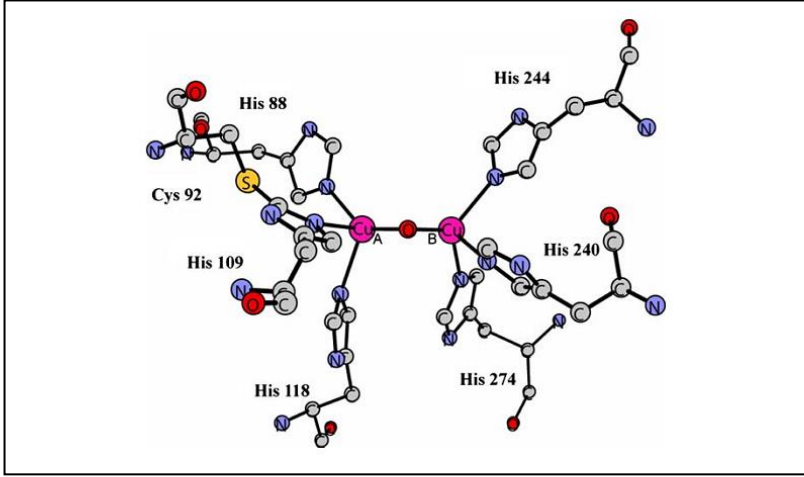
Şekil 1.2 Katekol oksidaz native , kuşak görünümü (Klabunde et al., 1998)
<http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BT3>



Şekil 1.3 Katekol oksidaz native, çizgili görünüm (Klabunde et al., 1998)
<http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BT3>

1.2 Katekol Oksidaz Aktif Merkez Özellikleri

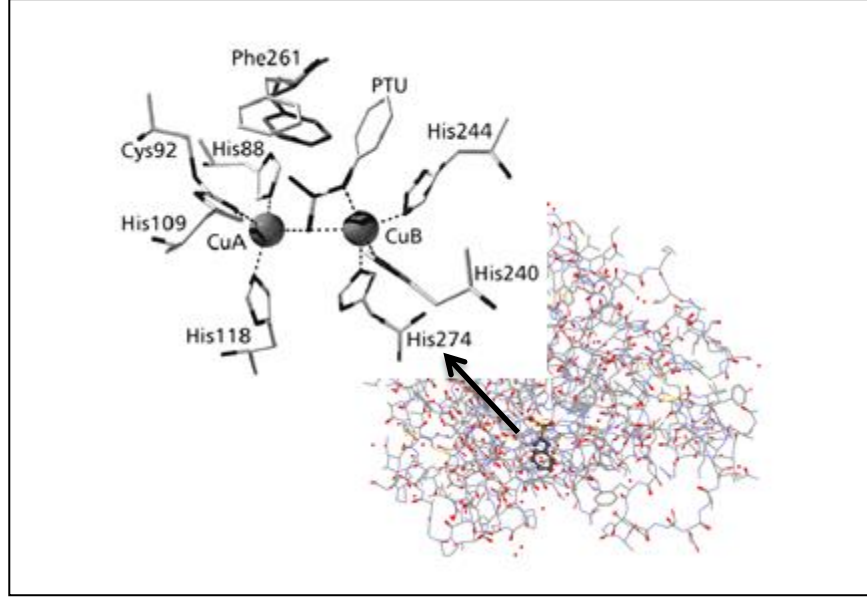
Native formunda (Cu(II)-Cu(II)) iki bakır arasındaki 2,9 Å olduğu bildirilmiştir. Bakırları kordine eden üçer histidin uzantısına ek olarak, bakırlar arasında (CuA-O 1,9 Å , CuB-O 1,8 Å) köprüleyici çözücü molekülü yer almaktadır. Bu şekilde aktif merkezin trigonal piramit yapısı tamamlanmaktadır.



Şekil 1.4 Katekol oksidaz aktif merkez yapısı (Güell and Siegbahn, 2007).

Deoksi formunda aktif merkezdeki bakırların +1 yük durumuna indirgendiği formda ise, bakırlar arasındaki mesafenin 4,4 Å'e çıktığı histidinlerde ise belirgin bir değişme olmadığı rapor edilmiştir.

İnhibe formda ise fenil tiyoüre (PTU) katekol oksidaza met formda yer alan hidroksi köprüsüyle yer değiştirmek suretiyle bağlanır. PTU'de yer alan sülfür atomu iki bakıra birden kordine olur ve bakırlar arasındaki mesafeyi 4,2 Å 'e çıkarır. Bakır B, amid azotu ile zayıfça etkileşir. İnhibitör bağlanmasıyla enzimde, inhibitörün aromatik kalkasıyla hidrofobik etkileşimler oluşur ve konformasyonel değişim meydana gelir (Koval et al., 2006).



Şekil 1.5 Katekol oksidaz-PTU kompleksi (Gardeman 2002, Klabunde 1998)

1.3 Tip-3 Bakır Ailesi

Grunun diğer bir üyesi hemosiyanin dioksijenin geri dönüşümlü bağlanmasını gerçekleştirir. Tirozinase ise hem fenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu (monofenolaz aktivitesi) katalizler, hem de o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu (katekolaz aktivitesi) katalizler (Koval et al., 2006). Katekol oksidaz ile trozinaz arasındaki fark bazı noktalarda belirgin değildir. Bazı katekol oksidazlar zayıf monooksijenaz aktivitesi gösterebilmektedir. Ancak genellikle katekol oksidaz trozinazı substrat olarak kabul etmez (Güell and Siegbahn 2007). Ek olarak belirtmek gerekir ki; katekol oksidaz ve trozinaz enzimlerinin isimlendirilmeleri ve sınıflandırılmaları zaman zaman karışık bir konu olmuştur (Eicken et al., 1999).

Bu güne kadar katekol oksidaz enziminin çalışma şeklini ve reaksiyonunu açıklamak için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sadece enzim aktif merkezini üzerinde değil ayrıca aktif merkezi ve reaksiyonu taklit eden kompleksler üzerinde de gerçekleştirilmiştir.

Hesapsal kimyanın doğası gereği, üzerinde çalışılan yapıya eklenen her bir atom hesapsal yükte artışa neden olmaktadır. Yüksek doğruluk veren methodlar (Method başlığında anlatılacak) kullanılarak tüm enzim yapısının çalışılabilmesi mümkün olmadığından, gerçekleştirilen çalışmalar genellikle enzim aktif

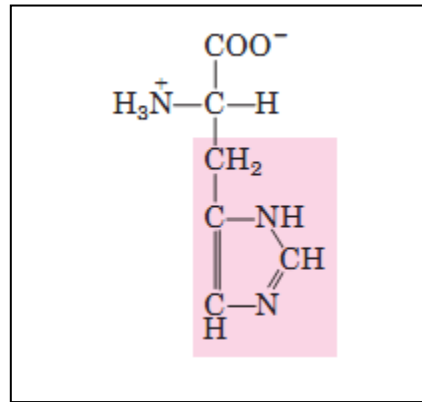
merkezinde yer alan kısıtlı sayıda aminoasit çevresinde gerçekleştirilmektedir. Kimi durumlarda aktif merkezde yer alan aminoasitleri taklit edecek daha az atom içeren yapılarda kullanılır. Elbette bu durum hesaplamada yer almayan kısımların aktif merkez bölgesine yaptıkları sterik etkilerin yoksayılmasına neden olur, ancak elde edilen sonuçlar yapıya bağımlı olarak yine de güvenilir olabilmektedir.

Yapılan çalışmaların sonucunda reaksiyon mekanizması ile ilgili bir çok soru hala tam olarak cevaplanamamıştır. Bu sorular başlıca; reaksiyonun kontrolünü sağlayacak elektronik ve pH özellikleri, substrat koordinasyon modu ve dioksijen aktivasyonu sırasında oluşan ara üründür (Belle et al., 2007).

Bu çalışma, ticari ve diagnostik önemi bulunan bu enzim grubunun aktif merkez özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

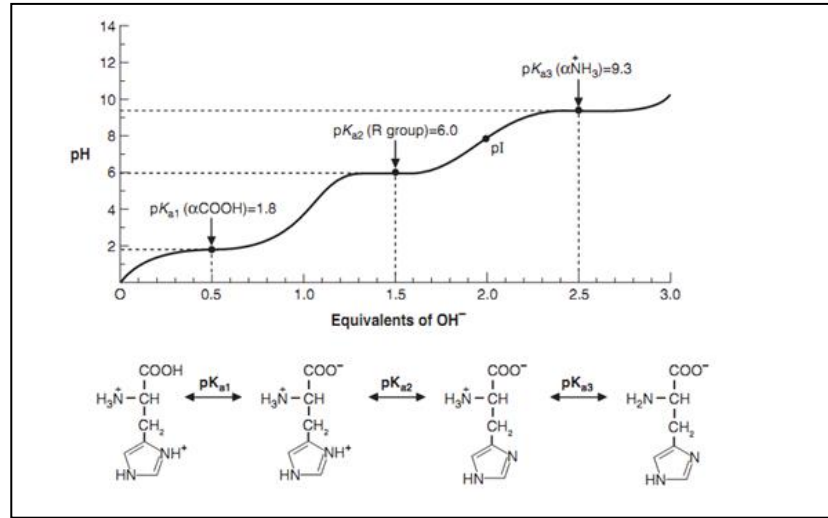
1.4 Histidin

Histidin yan grup olarak imidazol halkası içeren bir amino asittir. Histidin nötral pH'ta iyonize olabilen bir yan zincire sahip tek aminoasittir (Nelson and Cox, 2008). Histidin yan zincirleri bir çok proteinin aktif merkezlerinde yer almaktadır. Histidin amino asidinin temel özelliği farklı protone durumlarında bulunabilen imidazol halkasıdır. Histidin halkasının pK_a değerinin fizyolojik pH değerine yakın olmasından ötürü imidazol grubu farklı protone durumları arasında dinamik bir dengededir. Protone formları arasındaki geçiş, enzim aktivitesinin modüle edilebilmesine veya substrat ile enzim arasında proton transferi gerçekleştirilebilmesine olanak sağlar (Hass et al., 2008).



Şekil 1.6 Histidine amino asidi (Nelson and Cox'dan, 2008)

İmidazole yan zincirin pK_a değeri yaklaşık olarak 6,0'dır, amino asitin genel pK_a değeri ise 6,5'tir. Bu nedenle fizyolojik pH koşullarında ufak kaymalar bile histidinin genel yükünde değişikliklere yok açabilmektedir. $pH=6$ 'dan daha asidik ortamlarda imidazol halkası genel olarak protonedir. Bu formunda imidazol halkası iki N—H bağı bulundurur ve yükü pozitifdir. Pozitif yük azotlar arasında eşit olarak dağılmıştır ("Histidine", <http://en.wikipedia.org/wiki/Histidine>). Karboksil grubu için pK_a değeri 1,82, amino grubu için ise 9,17'dir (Nelson and Cox'dan, 2008).



Şekil 1.7 Histidin iyonizasyonu (Swanson et al., 2010'dan)

İmidazol halkası tüm pH'larda aromatiktir. Dört tanesi çift bağdan iki tanesi işlemediği azot atomundan, toplam 6 adet π elektronu içerir ve π yığılma (π stacking) etkileşimi oluşturabilir ("Histidine", <http://en.wikipedia.org/wiki/Histidine>). Glutamat üzerinden sitrik asit döngüsüne katılabilir. Histamin ve karnozin biyosentezi için prekürsördür.

Histidin imidazol halkası metaloproteinlerde genel koordinasyon ligandıdır. Ayrıca hemoglobinin yapısında bulunan hem halkasında bulunur. Oksihemoglobin stabilizasyonu ve CO-hemoglobin destabilizasyonu için önemlidir (Swanson et al., 2010).

Histidin proton mekiğinde (shuttle), protonların taşınmasında kullanılır ("Histidine", <http://en.wikipedia.org/wiki/Histidine>).

2. METHOD

2.1 Moleküler Modelleme

Moleküler modelleme realistik moleküler yapıların ve ilişkili özelliklerinin oluşturulması, hesaplanması ve belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen bilgisayar uygulamaları olarak tanımlanabilir.

Moleküler modelleme teorik kimya yöntemlerine ve deneysel verilere dayanan, molekülleri ve moleküler sistemleri analiz etmek, moleküler, kimyasal veya biyokimyasal özellikleri belirlemek için kullanılan bilgisayar teknikleri olarak düşünülebilir. Teori ve deneysel arasında köprü işlevi görür.

Moleküler modellemenin fonsiyonları aşağıdaki gibi listelenebilir;

1. Yapı tayini ve tasarımı
2. Yapısal görüntüleme
3. Enerji hesaplaması ve minimizasyonu
4. Dinamik simülasyon ve konformasyonel tarama
5. Moleküler özelliklerin hesaplanması
6. Yapısal üst üste gelme (süperpozisyon) ve dizi belirlenmesi
7. Moleküler etkileşim ve yanaştırma (docking)

Hesapsal biyokimya ve bilgisayar destekli moleküler modelleme biyokimya araştırmalarının vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Ligand-reseptör, enzim-substrat etkileşimleri, protein katlanması, protein-protein ve protein-nükleik asit etkileşimi bu teknoloji ile incelenebilecek ve çözümlenebilecek konulara birkaç örnektir.

2.2 Enerji Hesaplama ve Geometri Optimizasyonu

Potansiyel enerji'ye hesapsal yaklaşım iki katogoriye ayrılabilir; kuantum mekanik ve moleküler mekanik. Bu ayrımın temeli Schrödinger denkleminin uygulanış biçiminden kaynaklanır. Günümüzde iki yönteminde moleküllerin kimyasal ve biyolojik davranışlarının anlaşılmasında önemli oldukları kabul edilmektedir. Pratik açıdan yaklaşırsak, yöntemin seçimi sorunun karmaşıklığı, kısıtlamalar ve işlem gücü gibi faktörlere bağlıdır. Geometri optimizasyonu, kararsız bir (non-equilibrium) geometriden başlanarak, bir minimizasyon algoritması aracılığı ile molekül için optimum yapının bulunması işlemidir. Termodinamik kanunları'na göre sistem düşük enerjili olmaya eğilimlidir. Bu nedenle moleküler yapıda düşük enerjili olduğu konfigürasyonu tercih edecektir.

2.3. Konformasyonel Analiz

Kullanıcı tarafından tanımlanmış dihedral açıların değiştirilerek moleküler sistemin düşük enerjili konformasyonlarının elde edilmesi işlemi konformasyonel analiz olarak tanımlanır. Yöntem yeni yapıların türetilmesi için dihedral açıların değiştirilmesi ve sonra her bir açının minimizasyonunu içerir. Düşük enerjili özgün yapılar kaydedilirken yüksek enerjili yapılar yok sayılır. Konformasyonel analiz için yüksek hızda sonuç veren moleküler mekanik yöntemleri kullanılır.

Bu tezin konusu olan çalışmalar sırasında yapılan konformasyonel analiz hesaplamaları Spartan 08 (Ohlinger and Hehre, 2007) programı ile bir moleküler mekanik yöntemi olan Sybyl ile gerçekleştirildi.

2.4. Kuantum Mekanik

Kuantum mekanik yöntemler ab initio ve yarı-ampirik adında iki ayrı sınıfta incelenebilir. Ab initio yöntemler elektron korelasyonunun çözümü için perturbasyon sonrası (post perturbation) hesaplamaları kullanır. Çeşitli yaklaşımlara göre dalga fonksiyonu bazı fonksiyonel formlar şeklinde tanımlanabilir. Genel anlamda ab initio hesaplamalar self-consistent field (SCF) yöntemlerin iteratif prosedürleridir. Diğer taraftan, yarı-ampirik çözülmesi zor integrallerin deneysel verilere dayanan denklem ve parametreler ile yer

değiştirmesine dayanan yöntemleri ifade eder. En doğru sonuç için hesaplaması yapılan molekülün parametrizasyonda kullanılan yapılara benzer olması gerekir. Hesaplaması yapılan yapı parametrizasyon setinden oldukça farklı ise düzensiz sonuçlar elde edilebilir. Yarı-ampirik yöntemler organik bileşikler için başarılı sonuçlar vermektedir.

2.4.1 PM3TM (Parameterized method 3 transition metals)

PM3TM, James Stewart tarafından geliştirilen ve 1989 yılında yayınlanan PM3 yönteminin geçiş metallerinide içerecek şekilde genişletilmiş bir versiyonudur. PM3 diğer yarı-ampirik yöntemlere göre daha fazla sayıda moleküler özelliğe göre parametrize edilmiştir ve hidrojen bağı hesaplamalarında çok daha başarılıdır (Ramachandran et al., 2008)

2.4.2 Yoğunluk Fonsiyoneli Teorisi (Density Functional Theory)

Yoğunluk fonsiyoneli teorisi fizik ve kimyada atomların, moleküllerin ve kondanse fazların elektronik yapılarının hesaplanmasında kullanılan bir kuantum mekanik yöntemidir. Bu teoride çok elektronlu sistemlerin özellikleri fonksiyonun fonksiyonu anlamına gelen fonksiyonellerin kullanımı ile belirlenebilir. Yöntemin ismi fonsiyonel olarak elektron yoğunluğu fonsiyonellerinin kullanılmasından gelmektedir. DFT hem hesapsal fizikte hem hesapsal kimyada kullanılan çok yönlü ve popüler yöntemler içermektedir (“Density Functional Theory”, http://en.wikipedia.org/wiki/Density_functional_theory) DFT’nin başarısı hesapsal yük ve doğruluk arasında başarılı bir denge kurmasından ileri gelir (Schneebeli et al., 2011).

2.4.3. B3LYP Yöntemi

Biyomoleküler sistemler için yaygın olarak kullanılan ve başarılı sonuçlar veren bir Hibrid-DFT yöntemidir. Hesaplamanın Gaussian kısımları Hartree-Fock seviyesinde gerçekleştirilirken, DFT kısımları B3LYP yaklaşımı ile gerçekleştirilir (Rogers, 2003) DFT yöntemlerinin popülerleşmesinde katkısı oldukça fazladır (Schneebeli et al., 2011). Bu tezde yer alan hesaplamalar geometri optimizasyon ve frekans analiz hesaplamalarında kullanılmıştır.

2.5. Moleküler Mekanik

Büyük yapılı biyomoleküller için yarı-empirik yöntemler etkin olarak uygulanamaz. Moleküler mekanik adı verilen yöntemler ise yapılarının ve davranışlarının açıklanması için kullanılabilir. Moleküler mekanik, bir dalga fonksiyonu veya elektron yoğunluğu hesaplamadan, bileşiğin toplam enerjisini hesaplamak için basit cebirsel ifadeler kullanır. Moleküler mekaniğin temel varsayımı, küçük moleküller için deneysel yoldan elde edilen ve büyük moleküllere uygulanabilen dataları ifade eden empirik kuvvet alanlarıdır (empirical force field). Hızlı bir şekilde enerjetik olarak elverişli geometrilerin elde edilmesi amaçlanır.

2.6. Hartree Atomic Unit (a.u.)

Atomik birim, atomik fizik hesaplamaları için kullanılan bir birimdir. Hartree ve Hydberg olmak üzere iki farklı atomik unit birim vardır.

2.7. Baz Seti

Baz setleri teorik ve hesapsal kimyada moleküler orbitallerin tanımlanması için oluşturulmuş kombine lineer fonksiyon setleridir. Basitçe tanımlamak istersek baz seti atomu merkez alan atomik orbitallerdir.

2.8 Hesapsal Bilgisayar programları

Bu bölümde hesaplamaların gerçekleştirildiği ve sonuçların irdelendiği programlar hakkında kısa bilgi verilmiştir.

2.8.1 Spartan 08

Spartan 08 moleküler modelleme ve hesapsal kimya için kullanılan bir bilgisayar programıdır. İzole moleküllerin yapısal ve moleküler özelliklerinin belirlenmesinde öncelikli olarak kullanılır. Kuantum mekanik hesaplamalarda göreceli olarak daha yavaştır.

2.8.2 Gaussian 09

Gaussian 09 moleküler modelleme ve hesapsal kimya için kullanılan bir bilgisayar programıdır. Kuantum mekanik yöntemlere dayalı moleküler modelleme ve hesapsal kimya uygulamaları açısından başarılı ve popülerdir.

2.8.3. Gauss View 05

Gaussian 09 programı ile hesaplaması gerçekleştirilecek yapıların hazırlanması, sonuçların görsel olarak incelenebilmesi amacıyla kullanılan arayüz programıdır.

3. SONUÇLAR

Bu kısımda öncelikli olarak katekol oksidaz enziminin aktif merkezinde yer alan histidin amino asidi için gerçekleştirilen konformasyon taraması ve frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Devamında ise katekol oksidaz aktif merkezine dair gerçekleştirilen hesaplamaların sonuçları bulunmaktadır.

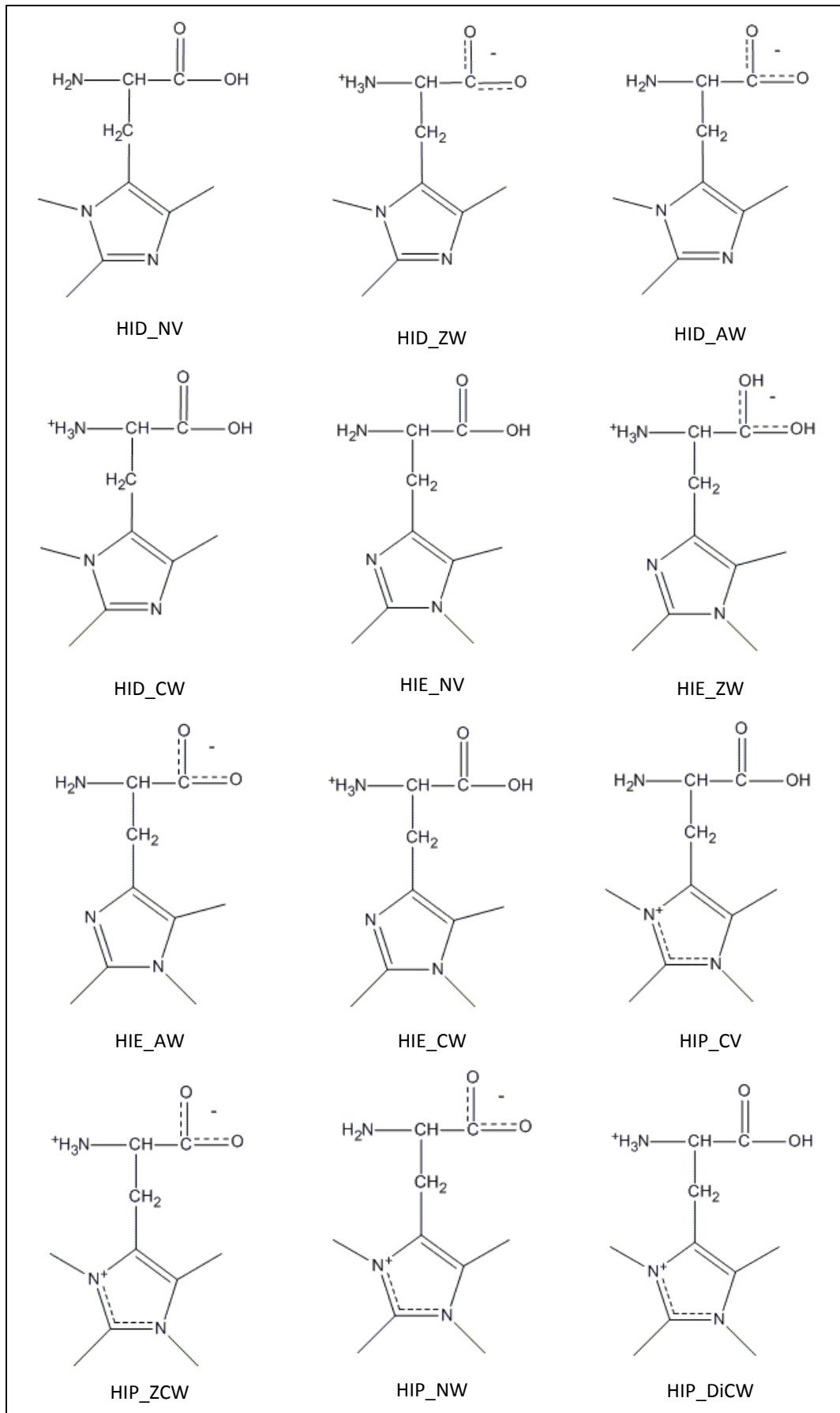
3.1 Histidin Konformasyonel Analiz Hesaplamaları

Bu hesaplamalarda imidazol halkasının üç farklı protone formu için olası tüm terminal yapıları incelendi. Toplamda on iki farklı yapısal durum için konformasyon taraması gerçekleştirildi. İmidazol halkasının protone formu, amino asidin yük durumu ve hesaplamaların gerçekleştiği matrikse göre detayları Çizelge 3.1’de verildiği gibi isimlendirme gerçekleştirildi. Ayrıca yapılar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Histidin yapıları için isimlendirme sistematığı

İmidazol formu	Yük Durumu	Matriks
HID (N3 protone)	Nötral (N)	Vakum (V)
HIE (N5 protone)	Zwitterionic (Z)	Su (W)
HIP (N3 ve N5)	Katyon (C)	
	Anyon (A)	
	Di Katyon (DiC)	

Konformasyon taramaları Spartan 08 programı ile gerçekleştirildi. Bir moleküler mekanik yöntemi olan SYBYL kullanıldı. Her bir yapı için farklı değişen sayılarda konformer elde edildi. Konformelerin yapısal optimizasyonu Gaussian 09 programında B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde gerçekleştirildi. Optimize geometriler incelenerek birbiri ile tamamen aynı yapılar elendi ve geriye kalan sonuçların frekans analizleri gerçekleştirildi. Frekans analizleri Gaussian 09 programında B3LYP/cc-pVDZ seviyesinde yapıldı.



Şekil 3.1 Histidin yapısal formları

3.1.1 HID_NV konformasyon taramaları ve frekans analizleri

HID_NV formu için yapılan konformasyon analizinde 111 farklı yapı elde edildi. Bu yapıların geometri optimizasyonları sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bir kısım konformerlerin aynı yapıya optimize olduğu görüldü. Gerekli eleme işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen 41 farklı konformer ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.2’de geometri optimizasyon sonuçları görülebilir. Aynı yapıya optimize olmuş konformerler çizelgede gösterilmedi. Çizelge 3.3’de ise frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen en kararlı geometriler Şekil 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2 HID_NV konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HID_NV_026	-548,8098104	4,23	0,00
HID_NV_001	-548,8076555	4,94	5,66
HID_NV_035	-548,8072994	6,05	6,59
HID_NV_060	-548,8067637	4,66	8,00
HID_NV_085	-548,8061843	5,33	9,52
HID_NV_095	-548,8048919	4,77	12,91
HID_NV_057	-548,8048091	3,84	13,13
HID_NV_017	-548,8045626	4,26	13,78
HID_NV_003	-548,8043152	6,09	14,43
HID_NV_097	-548,8035447	4,50	16,45
HID_NV_029	-548,8027972	4,14	18,41
HID_NV_054	-548,8025441	5,21	19,08
HID_NV_041	-548,8014440	3,93	21,97
HID_NV_037	-548,8014161	4,75	22,04
HID_NV_009	-548,8014096	3,72	22,06
HID_NV_071	-548,8010340	4,68	23,04
HID_NV_032	-548,8009861	3,10	23,17
HID_NV_107	-548,8005841	4,09	24,22
HID_NV_064	-548,8001882	4,56	25,26
HID_NV_034	-548,8001283	2,48	25,42
HID_NV_090	-548,8000939	2,49	25,51
HID_NV_068	-548,8000449	3,87	25,64
HID_NV_053	-548,7999635	2,46	25,85
HID_NV_048	-548,7999055	3,83	26,01
HID_NV_007	-548,7998682	3,27	26,10
HID_NV_015	-548,7998163	3,88	26,24
HID_NV_051	-548,7998084	1,82	26,26
HID_NV_020	-548,7994619	5,05	27,17
HID_NV_013	-548,7992905	3,56	27,62
HID_NV_111	-548,7991373	2,40	28,02
HID_NV_081	-548,7987991	2,96	28,91
HID_NV_094	-548,7986965	4,82	29,18
HID_NV_044	-548,7982769	4,33	30,28
HID_NV_104	-548,7979354	3,60	31,18
HID_NV_065	-548,7978413	4,53	31,42
HID_NV_012	-548,7973942	3,63	32,60
HID_NV_105	-548,7973222	4,13	32,79

HID_NV_023	-548,7968953	5,42	33,91
HID_NV_099	-548,7962298	5,85	35,66
HID_NV_110	-548,7960639	3,75	36,09
HID_NV_010	-548,7957029	3,80	37,04

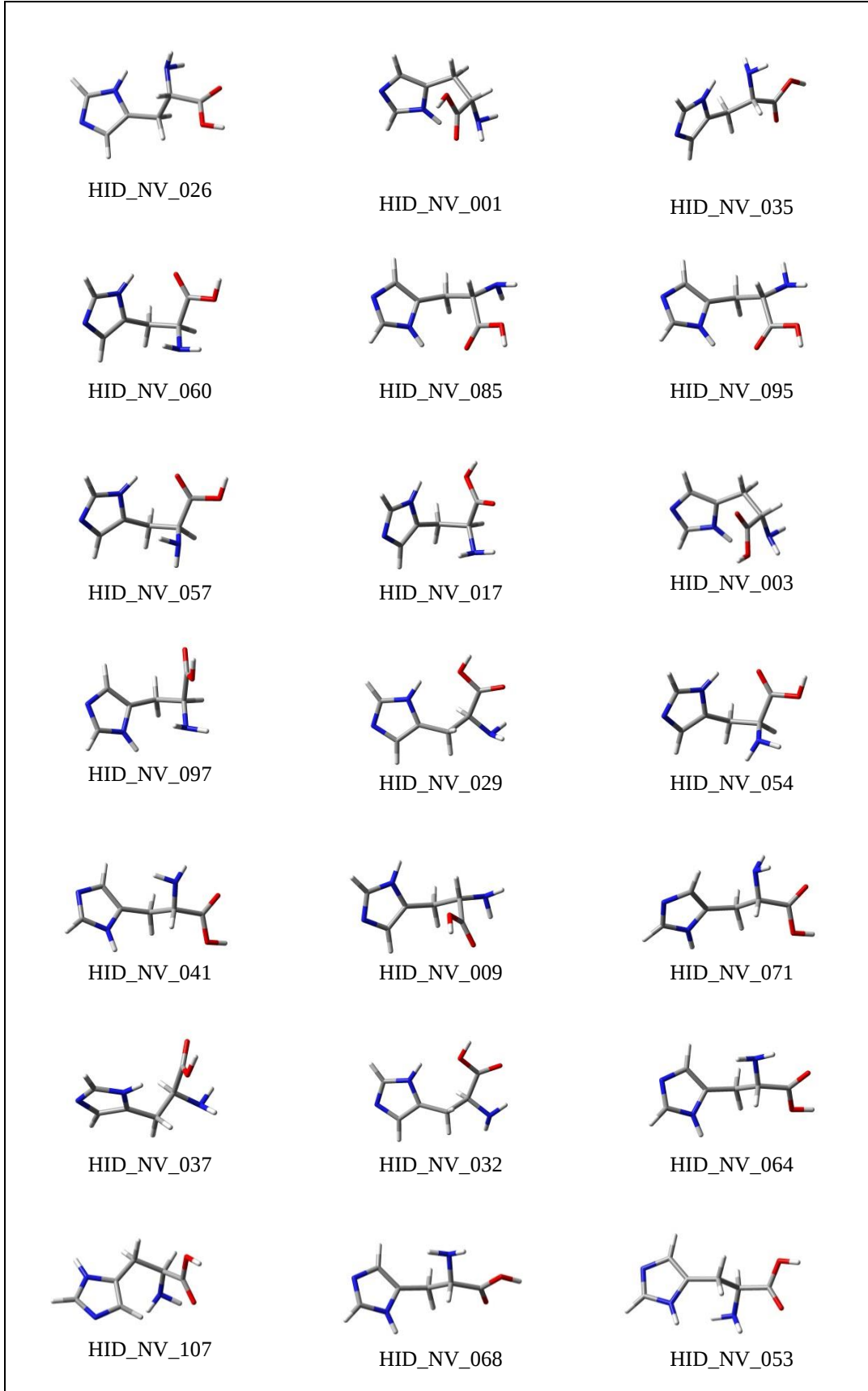
Çizelge 3.3 HID_NV frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji+zpe (Kj/Mol)
HID_NV_026	-548,8098104	-548,649484	4,23	0
HID_NV_001	-548,8076555	-548,647297	4,94	5,74
HID_NV_035	-548,8072994	-548,646940	6,05	6,68
HID_NV_060	-548,8067637	-548,646525	4,66	7,77
HID_NV_085	-548,8061843	-548,645906	5,33	9,39
HID_NV_095	-548,8048919	-548,644764	4,77	12,39
HID_NV_057	-548,8048910	-548,644560	3,84	12,93
HID_NV_017	-548,8045626	-548,644437	4,26	13,25
HID_NV_003	-548,8043100	-548,643994	6,09	14,41
HID_NV_097	-548,8035447	-548,643272	4,50	16,31
HID_NV_029	-548,8027972	-548,642886	4,14	17,32
HID_NV_054	-548,8025441	-548,642647	5,21	17,95
HID_NV_041	-548,8014440	-548,641757	3,93	20,29
HID_NV_009	-548,8014096	-548,641604	3,72	20,69
HID_NV_071	-548,8010340	-548,641366	4,68	21,31
HID_NV_037	-548,8014160	-548,641281	4,75	21,54
HID_NV_032	-548,8009861	-548,641173	3,10	21,82
HID_NV_064	-548,8001882	-548,640713	4,56	23,03
HID_NV_107	-548,8005841	-548,640678	4,09	23,12
HID_NV_068	-548,8000448	-548,640485	3,87	23,63
HID_NV_053	-548,7999635	-548,640308	2,46	24,09
HID_NV_015	-548,7998163	-548,640270	3,88	24,19
HID_NV_034	-548,800128	-548,640267	2,48	24,20
HID_NV_048	-548,7999055	-548,640163	3,83	24,47
HID_NV_090	-548,8000939	-548,640158	2,49	24,49
HID_NV_051	-548,7998084	-548,640132	1,82	24,55
HID_NV_007	-548,7998682	-548,640100	3,27	24,64
HID_NV_020	-548,7994619	-548,639991	5,05	24,92
HID_NV_013	-548,7992905	-548,639514	3,56	26,18
HID_NV_081	-548,7987990	-548,639330	2,96	26,66
HID_NV_111	-548,7991373	-548,638988	2,40	27,56
HID_NV_094	-548,7986965	-548,638802	4,82	28,05
HID_NV_044	-548,7982769	-548,638501	4,33	28,84
HID_NV_065	-548,7978413	-548,638280	4,53	29,42
HID_NV_104	-548,7979354	-548,638077	3,60	29,95
HID_NV_012	-548,7973942	-548,637871	3,63	30,49
HID_NV_105	-548,7973222	-548,637803	4,13	30,67
HID_NV_023	-548,7968953	-548,637297	5,41	32,00
HID_NV_099	-548,7962298	-548,636474	5,85	34,16
HID_NV_110	-548,7960639	-548,636184	3,75	34,92
HID_NV_010	-548,7957029	-548,636095	3,80	35,15

Konformerler incelendiğinde görüldü ki, daha önceki sonuçlarda olduğu gibi molekül içi hidrojen bağ oluşumu yüksektir. Bir çok konformerde birden fazla hidrojen bağı oluşmaktadır. En kararlı yapı olan 026 numaralı konformerde amino grubu azotu imidazol halkası N⁵ hidrojeni ile etkileşim içindedir. Ayrıca amin grubu hidrojenleri karboksil oksijeni etkileşim içindedirler. Karboksil grubu hidroksil oksijeni ile C¹ hidrojenlerinden biri arasında 2,6 Å olması da gözlenmiştir. İmidazol halkası ve karboksil grubunun oluşturduğu iki ayrı düzlem kısmen paralel bir yapıdadır. Molekül içi etkileşimin bu kadar yüksek olması yapının yüksek kararlılık sahibi olmasını açıklamaktadır.

Kararlılık sıralamasında üçüncü sırada yer alan 035 numaralı konformer 026 numaralı konformer ile karboksik grubunun 180° dönmüş olması dışında benzedir. Böylece karboksil grubunda yer alan oksijenlerin etkileşime girmiş oldukları gruplar birbirleriyle yer değiştirmiş olmaktadır. Yapı bunun dışında aynıdır.

01 numaralı konformerde ise yukarıda bahsedilen yapının aksine imidazol halkası ve karboksil grubu düzlemleri birbirine dik konumdadır. Karboksil grubu ve amino grubu yine etkileşim içindedir. Yapının alfa karbonu üzerinden bu iki yapı arasında dinamik bir dengede olması oldukça olasıdır. Yapıların bir kısmında ise karboksil grubunun imidazol N⁵ konumuna yaklaşarak amino aside dairesel bir yapı katmaktadır.



Şekil 3.2 Kararlılık sıralamasına göre HID_NV konformerleri

3.1.2 HIE_NV konformasyon taramaları ve frekans analizleri

HIE_NV formu için yapılan konformasyon analizinde 123 farklı yapı elde edildi. Bu yapıların geometri optimizasyonları sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bir kısım konformerlerin aynı yapıya optimize olduğu görüldü. Gerekli eleme işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen 67 farklı konformer ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.4’de geometri optimizasyon sonuçları görülebilir. Aynı yapıya optimize olmuş konformerler çizelgede gösterilmedi. Çizelge 3.5’de ise frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Ayrıca Şekil 3.3’de en kararlı 21 yapının geometrisi görülmektedir.

Çizelge 3.4 HIE_NV konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

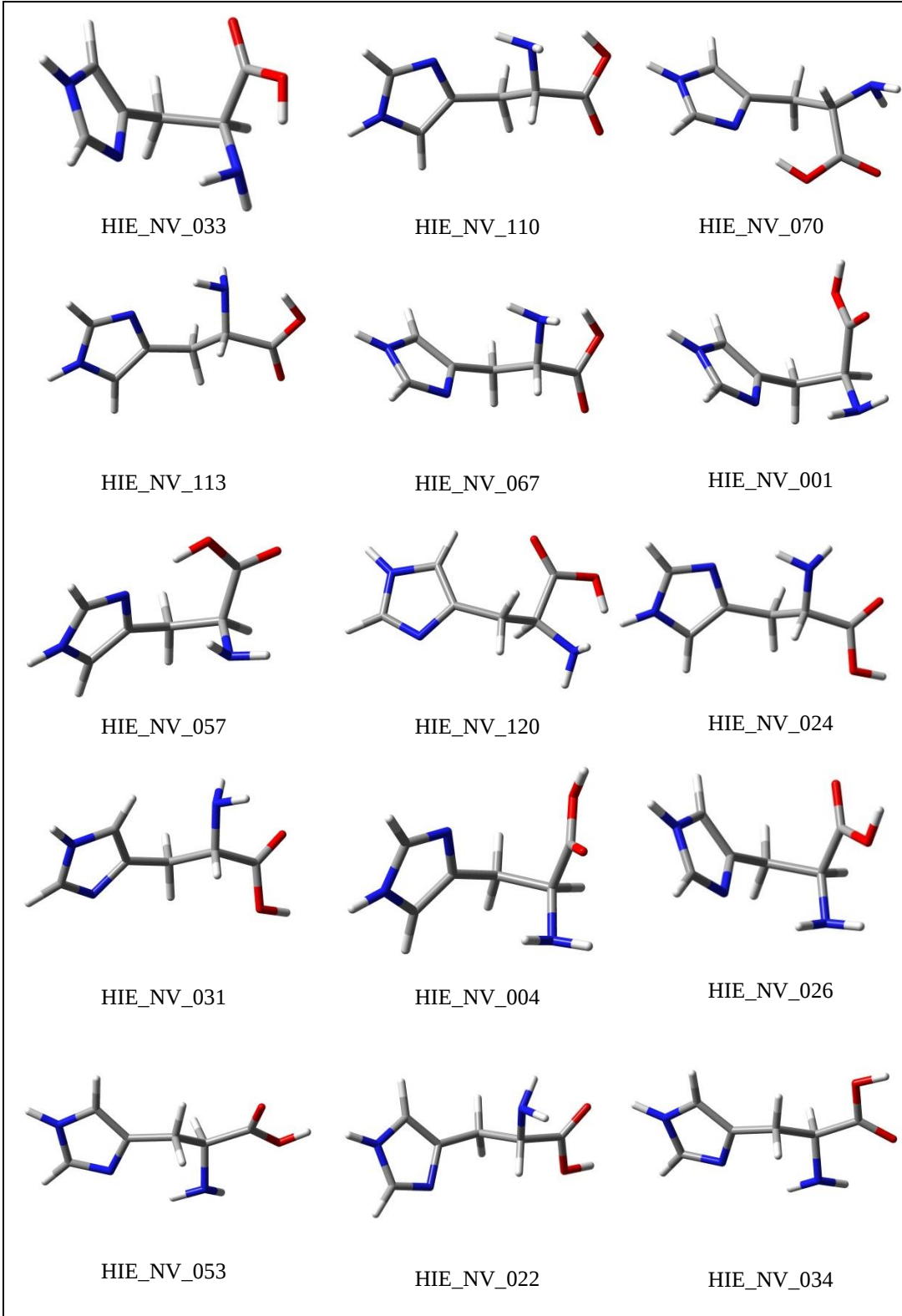
Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HIE_NV_033	-548,8127467	4,48	0
HIE_NV_110	-548,8113588	7,82	3,64
HIE_NV_070	-548,8108697	8,29	4,93
HIE_NV_113	-548,8108007	7,28	5,11
HIE_NV_067	-548,8067066	8,46	15,86
HIE_NV_057	-548,8061756	8,71	17,25
HIE_NV_001	-548,8061200	5,06	17,40
HIE_NV_120	-548,8060104	2,31	17,69
HIE_NV_024	-548,8053413	5,70	19,44
HIE_NV_031	-548,8048291	2,55	20,79
HIE_NV_004	-548,8047433	3,21	21,01
HIE_NV_026	-548,8047019	3,95	21,12
HIE_NV_053	-548,8042508	4,41	22,31
HIE_NV_022	-548,8035980	2,67	24,02
HIE_NV_042	-548,8035600	2,97	24,12
HIE_NV_092	-548,8035147	4,64	24,24
HIE_NV_034	-548,8034390	5,65	24,44
HIE_NV_028	-548,8031186	4,56	25,28
HIE_NV_075	-548,8028517	8,86	25,98
HIE_NV_039	-548,8027146	3,71	26,34
HIE_NV_103	-548,8026654	3,69	26,47
HIE_NV_002	-548,8026238	4,70	26,58
HIE_NV_021	-548,8026215	4,44	26,58
HIE_NV_010	-548,8024711	3,93	26,98
HIE_NV_091	-548,8024218	3,28	27,11
HIE_NV_045	-548,8023571	4,17	27,28
HIE_NV_019	-548,8022404	1,65	27,58
HIE_NV_119	-548,8021825	10,38	27,74
HIE_NV_046	-548,8020934	4,08	27,97
HIE_NV_007	-548,8016734	4,15	29,07
HIE_NV_017	-548,8016526	4,10	29,13
HIE_NV_040	-548,8014397	2,57	29,69
HIE_NV_032	-548,8013803	3,40	29,84
HIE_NV_009	-548,8013616	2,78	29,89
HIE_NV_020	-548,8012179	2,63	30,27
HIE_NV_005	-548,8011744	4,18	30,38

HIE_NV_056	-548,8011459	4,48	30,46
HIE_NV_043	-548,8010920	4,82	30,60
HIE_NV_035	-548,8009085	5,89	31,08
HIE_NV_027	-548,8007051	5,21	31,62
HIE_NV_008	-548,8000034	4,45	33,46
HIE_NV_050	-548,7999644	5,59	33,56
HIE_NV_012	-548,7999242	4,35	33,67
HIE_NV_049	-548,7997748	3,80	34,06
HIE_NV_014	-548,7997088	1,70	34,23
HIE_NV_115	-548,7996214	4,77	34,46
HIE_NV_030	-548,7993236	5,73	35,24
HIE_NV_023	-548,7992800	4,08	35,36
HIE_NV_015	-548,7992014	4,04	35,56
HIE_NV_003	-548,7987627	2,66	36,71
HIE_NV_084	-548,7975590	5,04	39,88
HIE_NV_058	-548,7972306	5,01	40,73
HIE_NV_073	-548,7971763	5,67	40,88
HIE_NV_016	-548,7968783	4,59	41,66
HIE_NV_077	-548,7967635	7,91	41,96
HIE_NV_038	-548,7966789	3,90	42,19
HIE_NV_082	-548,7960231	6,78	43,91
HIE_NV_059	-548,7955943	4,85	45,03
HIE_NV_122	-548,7947957	1,86	47,13
HIE_NV_108	-548,7941097	6,61	48,93
HIE_NV_083	-548,7939059	8,14	49,47
HIE_NV_094	-548,7915868	3,74	55,56
HIE_NV_076	-548,7909917	3,04	57,12
HIE_NV_104	-548,7909415	6,61	57,25
HIE_NV_055	-548,7909303	2,52	57,28
HIE_NV_118	-548,7900988	6,95	59,46
HIE_NV_087	-548,7899494	6,00	59,85

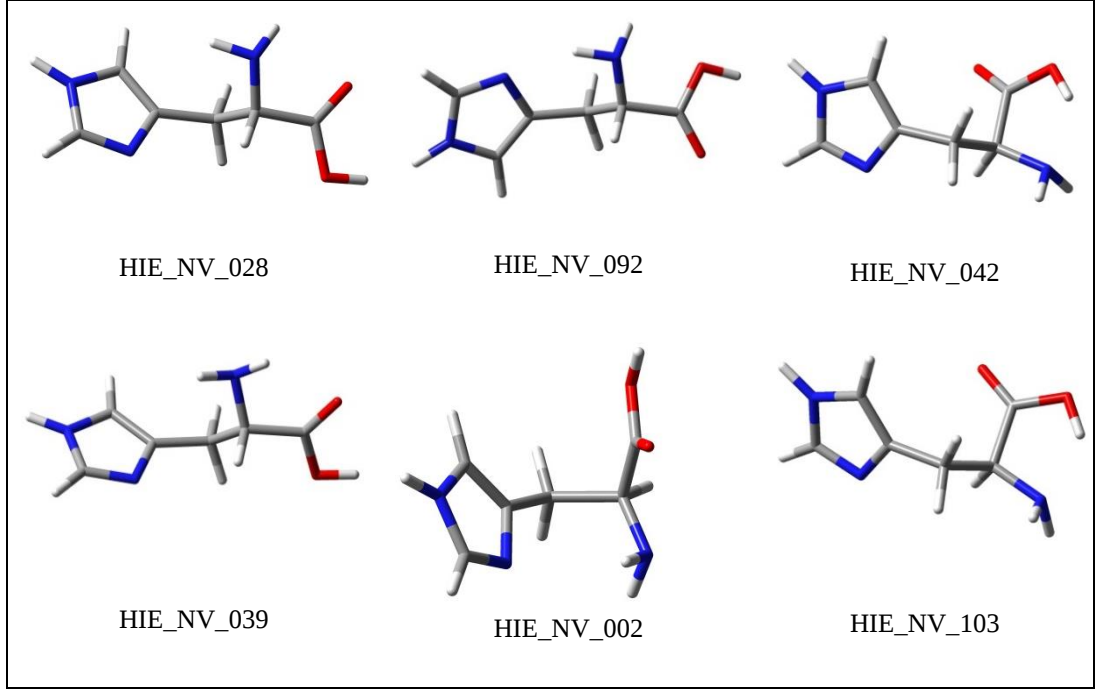
Çizelge 3.5 HIE_NV frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+zpe (Kj/Mol)
HIE_NV_033	-548,8127467	-548,6517950	4,48	0,00
HIE_NV_110	-548,8113588	-548,6504720	7,82	3,47
HIE_NV_070	-548,8108697	-548,6504450	8,29	3,54
HIE_NV_113	-548,8108007	-548,6500510	7,28	4,58
HIE_NV_067	-548,8067066	-548,6463320	8,46	14,34
HIE_NV_001	-548,8061199	-548,6460210	5,06	15,16
HIE_NV_057	-548,8061756	-548,6455730	8,71	16,34
HIE_NV_120	-548,8060104	-548,6454600	2,31	16,63
HIE_NV_024	-548,8053413	-548,6452120	5,70	17,28
HIE_NV_031	-548,8048291	-548,6450280	2,55	17,77
HIE_NV_004	-548,8047433	-548,6449960	3,21	17,85
HIE_NV_026	-548,8047019	-548,6445650	3,95	18,98
HIE_NV_053	-548,8042508	-548,6443170	4,41	19,63
HIE_NV_022	-548,8035980	-548,6440780	2,67	20,26
HIE_NV_034	-548,8034390	-548,6435660	5,65	21,61
HIE_NV_028	-548,8031186	-548,6434320	4,56	21,95
HIE_NV_092	-548,8035147	-548,6434090	4,64	22,02
HIE_NV_042	-548,8035600	-548,6433550	2,97	22,16

HIE_NV_039	-548,8027146	-548,6432150	3,71	22,53
HIE_NV_002	-548,8026238	-548,6430120	4,70	23,06
HIE_NV_103	-548,8026654	-548,6429080	3,62	23,33
HIE_NV_021	-548,8026215	-548,6428330	4,44	23,53
HIE_NV_075	-548,8028517	-548,6427740	8,56	23,68
HIE_NV_091	-548,8024217	-548,6426200	3,28	24,09
HIE_NV_045	-548,8023571	-548,6426030	4,17	24,13
HIE_NV_019	-548,8022404	-548,6425500	1,65	24,27
HIE_NV_046	-548,8029340	-548,6425480	4,08	24,28
HIE_NV_010	-548,8024711	-548,6424170	3,93	24,62
HIE_NV_119	-548,8218250	-548,6419440	10,38	25,86
HIE_NV_017	-548,8016526	-548,6419270	4,10	25,91
HIE_NV_007	-548,8016734	-548,6418980	4,15	25,98
HIE_NV_032	-548,8013803	-548,6418480	3,40	26,12
HIE_NV_005	-548,8011744	-548,6417240	4,18	26,44
HIE_NV_009	-548,8013616	-548,6416110	2,78	26,74
HIE_NV_040	-548,8014397	-548,6415450	2,57	26,91
HIE_NV_020	-548,8012178	-548,6415350	2,63	26,94
HIE_NV_056	-548,8011459	-548,6413250	4,48	27,49
HIE_NV_035	-548,8009085	-548,6413110	5,89	27,53
HIE_NV_043	-548,8010920	-548,6411220	4,82	28,02
HIE_NV_027	-548,8007051	-548,6409680	5,21	28,43
HIE_NV_008	-548,8000033	-548,6405510	4,45	29,52
HIE_NV_012	-548,7999242	-548,6403300	4,35	30,10
HIE_NV_014	-548,7997088	-548,6402430	1,70	30,33
HIE_NV_049	-548,7997748	-548,6399600	3,80	31,07
HIE_NV_050	-548,7999644	-548,6398500	5,59	31,36
HIE_NV_030	-548,7993236	-548,6397490	5,73	31,63
HIE_NV_115	-548,7996210	-548,6396640	4,77	31,85
HIE_NV_015	-548,7992014	-548,6396160	4,04	31,98
HIE_NV_023	-548,7992800	-548,6395340	4,08	32,19
HIE_NV_003	-548,7987627	-548,6393190	2,66	32,76
HIE_NV_084	-548,7975590	-548,6378890	5,04	36,51
HIE_NV_073	-548,7971763	-548,6377020	5,67	37,00
HIE_NV_058	-548,7972306	-548,6375020	5,01	37,53
HIE_NV_016	-548,7968783	-548,6372460	4,59	38,20
HIE_NV_038	-548,7966789	-548,6372230	3,90	38,26
HIE_NV_077	-548,7967635	-548,6369790	7,91	38,90
HIE_NV_082	-548,7960231	-548,6365620	6,78	39,99
HIE_NV_059	-548,7955943	-548,6360580	4,85	41,32
HIE_NV_122	-548,7947957	-548,6352480	1,86	43,44
HIE_NV_108	-548,7941097	-548,6350050	6,61	44,08
HIE_NV_083	-548,7939059	-548,6345590	8,14	45,25
HIE_NV_094	-548,7915868	-548,6321710	3,74	51,52
HIE_NV_104	-548,7909415	-548,6319740	6,61	52,04
HIE_NV_076	-548,7909917	-548,6318260	3,04	52,43
HIE_NV_055	-548,7909303	-548,6316520	2,52	52,89
HIE_NV_118	-548,7900988	-548,6311110	6,95	54,31
HIE_NV_087	-548,7899494	-548,6309180	6,00	54,81



Şekil 3.3 Kararlılık sıralamasına göre HIE_NV konformerleri



Şekil 3.3'ün devamı

Yapılar incelendiğinde ilk dikkat çekici nokta en kararlı iki konformer olan 33 ve 110 nolu konformerlerdeki karboksil ve amino gruplarının birbirlerine göre neredeyse tamamen aynı şekilde konumlanmış olmalarıdır. Karboksil grubu, alfa-karbonu ve amino azotu halkasal bir düzlem oluşturmaktadır ve karboksil grubunda yer alan hidroksil hidrojeni ile amino azotu arasında oluşan 1,82 Å uzunluğa sahip hidrojen bağının yapıya ciddi anlamda stabilite kattığı düşünülmektedir. En kararlı üçüncü konformer olan 70 numaralı konformerde ise hidroksil hidrojeni ise N⁵ azotu ile öncekilere yakın bir mesafede (1,72 Å) hidrojen bağı oluşturur. Diğer bir çok konformerde hidroksil grubu ya amino azotuyla hidrojen bağı oluşturmakta ya da diğer gruplardan olabildiğince uzaklaşmaktadır.

Ayrıca, bir çok konformerde özellikle de en kararlı iki yapı olan 33 ve 110 numaralı konformerlerde amino grubundan bir hidrojen imidazol halkası azotu ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Yetmiş numaralı konformerde ise bu durum hidroksil hidrojeni ile gerçekleşmektedir. Tümünden bakıldığında N³ azotunun hidrojen bağı oluşturmaya yatkın olduğu ve bunun yapıya stabilite kattığı söylenebilir.

Yapılara bütünüyle bakıldığında, bir çok konfor konformerde imidazol halkası terminal gruplar ile bir yakınlaşma içerisindedir ve genel anlamda bir planarlık oluşması söz konusu değildir. Bununla birlikte diğer yapılarda da histidin yan grubu ve terminal grupların ayrı ayrı oluşturduğu düzlemlerler birbirlerine paralele yakın konumlanmaktadır.

Yapılar içinde en kararlı konformerler incelendiğinde hidrojen bağı oluşumunun kararlılık sağlama konusunda diğer faktörlere oranla daha önemli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. İmidazol halkasının terminal gruplar ile konumlanması değişmesine rağmen, genellikle halka ile bir terminal ucu arasında hidrojen bağı oluşmaktadır ve terminaller arası hidrojen bağ oluşumunda yaygındır.

3.1.3 HIP_CV konformasyon taramaları ve frekans analizleri

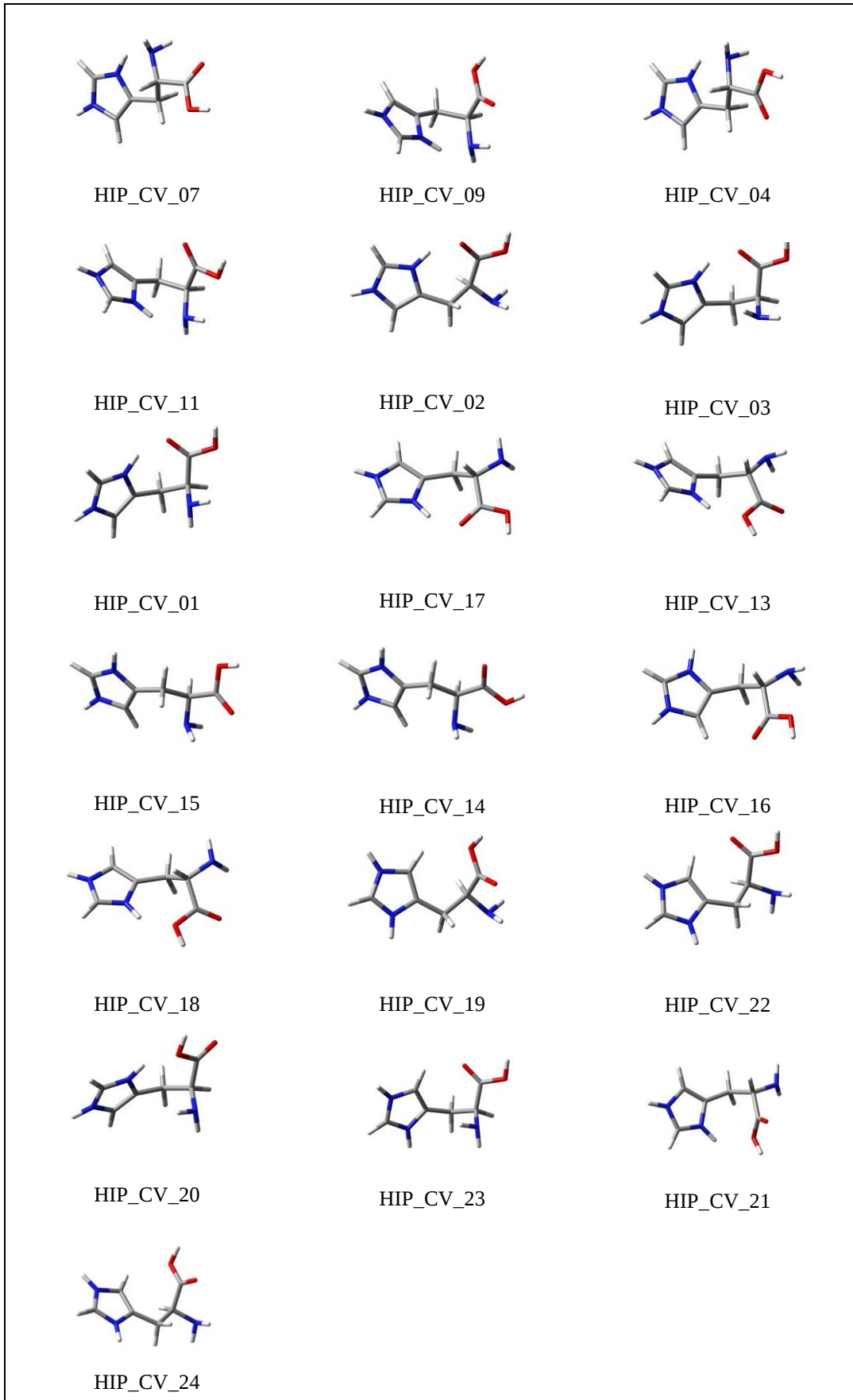
HIP_CW formu için yapılan konformasyon analizinde 24 farklı yapı elde edildi. Bu yapıların geometri optimizasyonları sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bir kısım konformerlerin aynı yapıya optimize olduğu görüldü. Gerekli eleme işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen 19 farklı konformer ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.6'da geometri optimizasyon sonuçları görülebilir. Aynı yapıya optimize olmuş konformerler çizelgede gösterilmedi. Çizelge 3.7'de ise frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen en kararlı geometriler Şekil 3.4'de verildi.

Çizelge 3.6 HIP_CV konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HIP_CV_07	-549,20511375	7,86	0
HIP_CV_09	-549,20491752	5,61	0,52
HIP_CV_11	-549,20353569	5,23	4,14
HIP_CV_04	-549,20341468	7,70	4,46
HIP_CV_02	-549,20254788	5,59	6,74
HIP_CV_01	-549,20137011	5,00	9,83
HIP_CV_03	-549,20135994	5,39	9,86
HIP_CV_17	-549,19872012	6,66	16,79
HIP_CV_15	-549,19242714	9,96	33,31
HIP_CV_14	-549,19230737	8,94	33,62
HIP_CV_13	-549,19220490	8,81	33,89
HIP_CV_16	-549,19077500	7,69	37,65
HIP_CV_18	-549,18759043	9,66	46,00
HIP_CV_19	-549,18570120	9,47	50,97
HIP_CV_22	-549,18497279	9,46	52,88
HIP_CV_23	-549,18415201	8,96	55,04
HIP_CV_20	-549,18377501	9,73	56,02
HIP_CV_21	-549,18370752	8,85	56,20
HIP_CV_24	-549,18202709	10,45	60,61

Çizelge 3.7 HIP_CV frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji+zpe (Kj/mol)
HIP_CV_07	-549,2051137	-549,0314150	7,86	0
HIP_CV_09	-549,2049175	-549,0312240	5,61	0,50
HIP_CV_04	-549,2034147	-549,0296190	7,70	4,72
HIP_CV_11	-549,2035357	-549,0295820	5,23	4,81
HIP_CV_02	-549,2025479	-549,0288590	5,59	6,71
HIP_CV_03	-549,2013599	-549,0275610	5,39	10,11
HIP_CV_01	-549,2013701	-549,0275550	5,00	10,13
HIP_CV_17	-549,1987201	-549,0253200	6,66	16,00
HIP_CV_13	-549,1922049	-549,0187820	8,81	33,17
HIP_CV_15	-549,1924271	-549,0186410	9,96	33,54
HIP_CV_14	-549,1923074	-549,0184890	8,94	33,94
HIP_CV_16	-549,1907750	-549,0169740	7,69	37,91
HIP_CV_18	-549,1875904	-549,0144020	9,66	44,67
HIP_CV_19	-549,1857012	-549,0120490	9,47	50,85
HIP_CV_22	-549,1849728	-549,0114840	9,46	52,33
HIP_CV_20	-549,1837750	-549,0107350	9,73	54,30
HIP_CV_23	-549,1841520	-549,0107250	8,96	54,32
HIP_CV_21	-549,1837075	-549,0104070	8,85	55,16
HIP_CV_24	-549,1820271	-549,0085610	10,45	60,00



Şekil 3.4 Kararlılık sıralamasına göre HIP_CV konformerleri

Elde edilen diğer konformasyon taraması sonuçlarına göre belirgin bir planarlık söz konusudur. Yapıların büyük kısmında karboksil grubu veya amino grubu C6 karbonu ile etkileşim içine girerek kapanmakta olan bir halka görüntüsü oluşturmuştur. C⁶ karbonu ile etkileşime girmeyen diğer terminal oluşan düzleme dik konumlanmakta veya kendisinde düzlemsel yapıya katılmaktadır. En karalı dört yapı yakından incelendiğinde amino grubu ile C⁶ hidrojeni arasında etkileşim olduğu, karboksik grubunun ise düzleme dik veya düzlemde olduğu görülmektedir. Bu nedenle kararlılık sağlayıcı ana faktörün, amino grubu ile imidazol halkası arasındaki etkileşim olduğu sonucuna varılabilir.

3.1.4. HID_ZW konformasyon taramaları ve frekans analizleri

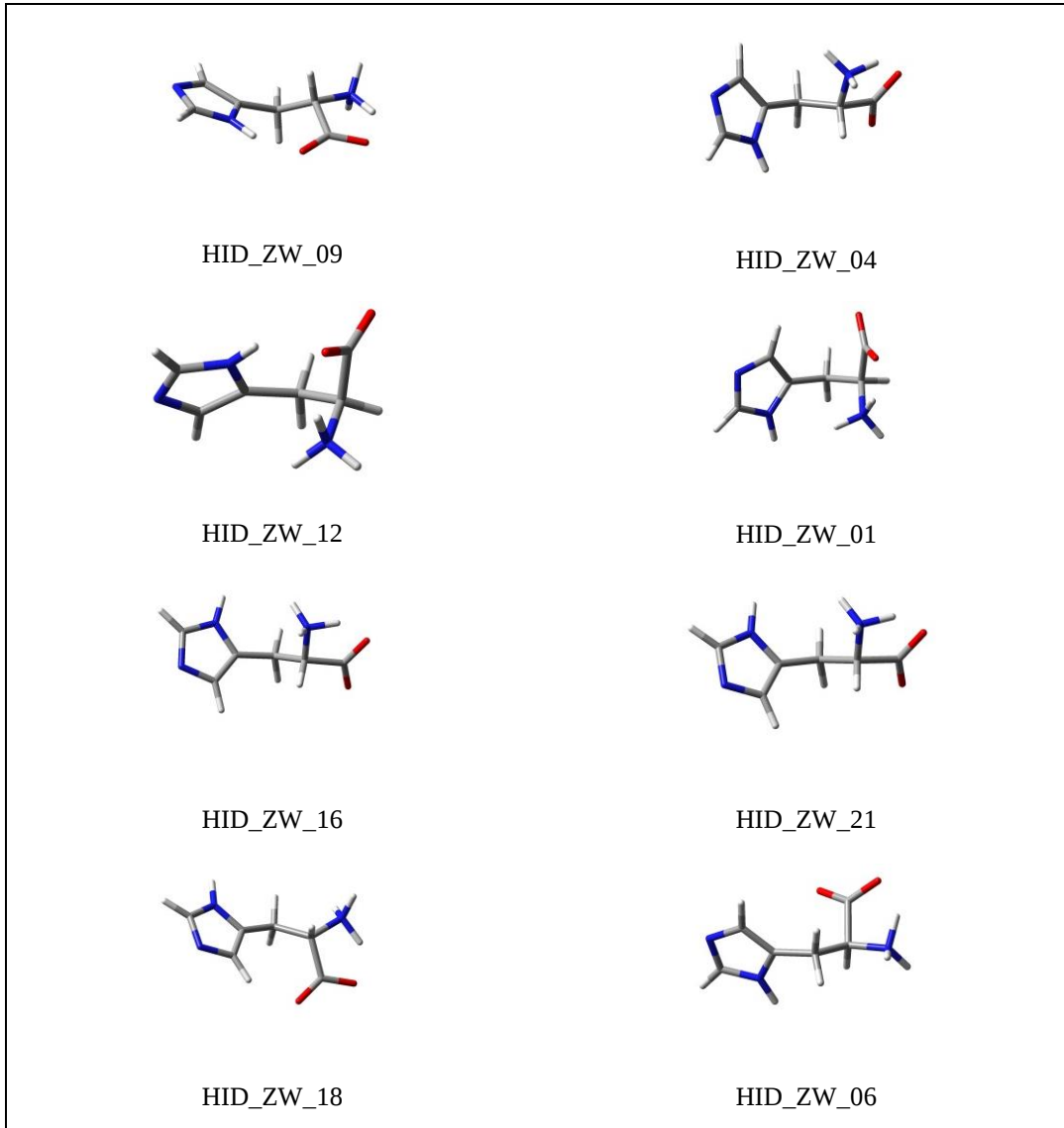
HID_ZW formu zwitteriyonik bir form olduğu için hesaplamalarda çözücü etkisini modelleyecek bir metod kullanılması zorunludur. Bu amaçla IEF-PCM [The Polarizable Continuum Model (PCM) using the integral equation formalism] yöntemi hesaplamalarda kullanılmıştır. HIP_CW formu için yapılan konformasyon analizinde 23 farklı yapı elde edildi. Bu yapıların geometri optimizasyonları sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bir kısım konformerlerin aynı yapıya optimize olduğu görüldü. Gerekli eleme işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen 8 farklı konformer ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.8’de geometri optimizasyon sonuçları görülebilir. Aynı yapıya optimize olmuş konformerler çizelgede gösterilmedi. Çizelge 3.9’da ise frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen geometriler kararlılık sıralamasına göre Şekil 3.5’de verildi.

Çizelge 3.8 HID_ZW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HID_ZW_09	-548,82247725	11,10	0
HID_ZW_12	-548,81643873	9,68	15,85
HID_ZW_04	-548,81581591	8,11	17,49
HID_ZW_01	-548,81482113	14,88	20,10
HID_ZW_21	-548,81379126	10,39	22,81
HID_ZW_16	-548,81378630	10,35	22,82
HID_ZW_18	-548,81188408	15,22	27,81
HID_ZW_06	-548,81143861	14,50	28,98

Çizelge 3.9 HID_ZW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+Zpe (Kj/mol)
HID_ZW_09	-548,8224773	-548,661801	11,10	0
HID_ZW_04	-548,8158159	-548,655780	8,11	15,80
HID_ZW_12	-548,8164387	-548,655356	9,68	16,92
HID_ZW_01	-548,8148211	-548,654400	14,88	19,43
HID_ZW_16	-548,8137863	-548,653865	10,35	20,84
HID_ZW_21	-548,8137913	-548,653797	10,39	21,01
HID_ZW_18	-548,8118841	-548,651994	15,22	25,75
HID_ZW_06	-548,8114386	-548,651792	14,50	26,28



Şekil 3.5 Kararlılık sıralamasına göre HID_ZW konformerleri

Yapılara bütün olarak bakıldığında ilk dikkat çeken unsur amino hidrojenlerinden biri ile karboksil oksijeni arasında oluşan hidrojen bağıdır. Yapı geometrik olarak mantıklı olmakta birlikte, tüm konformerlerde rastlanmış olması hesaplamada kullanılan baz setinden kaynaklanan bir hatayı muhtemel kılmaktadır. Yapılan incelemede baz setinin bu tip bir hataya olanak sağladığı anlaşılmıştır. En kararlı yapı olan 09 numaralı konformer incelendiğinde karboksil oksijeni ile N⁵ hidrojeni arasında oluşan hidrojen bağı etkileşimi ve oluşan halkasal yapı göze çarpmaktadır. Bir yandan terminaller arasında hidrojen bağı oluşmuştur. Ancak yukarıda bahsetmiş olduğumuz gibi, terminaller arası hidrojen bağının daha üst seviyeli bir yöntem olan cc-PVTZ ile incelenmesi doğru bir hamle olacaktır. Daha ileride gerçekleştireceğimiz çalışmalarda bu konu üzerinde durmayı planlamaktayız.

3.1.5. HIE_ZW konformasyon taramaları ve frekans analizleri

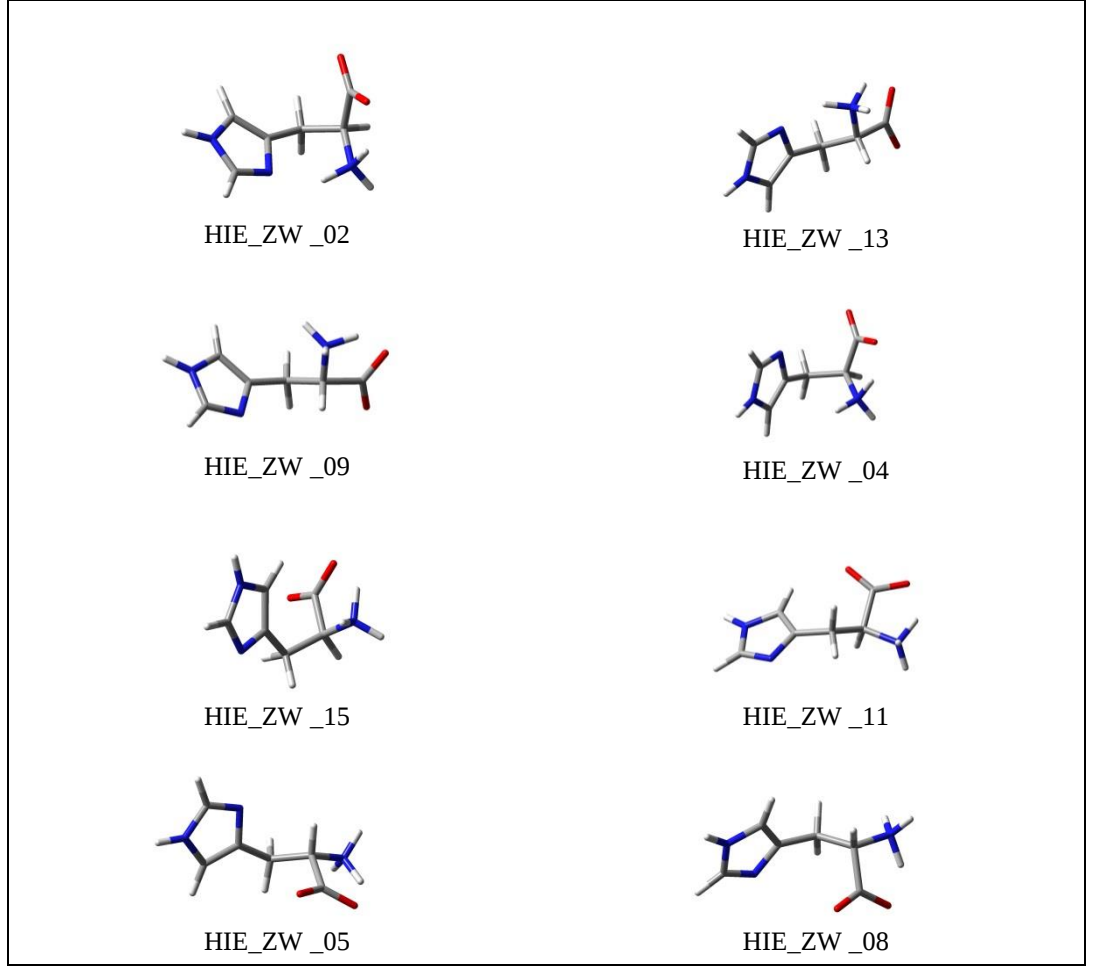
HIE_ZW formu zwitteronic bir form olduğu için hesaplamalarda çözücü etkisini modelleyecek bir method kullanılması zorunludur. Bu amaçla IEF-PCM (The Polarizable Continuum Model (PCM) using the integral equation formalism) yöntemi hesaplamalarda kullanılmıştır. HIP_CW formu için yapılan konformasyon analizinde 16 farklı yapı elde edildi. Bu yapıların geometri optimizasyonları sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bir kısım konformerlerin aynı yapıya optimize olduğu görüldü. Gerekli eleme işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen sekiz farklı konformer ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.10'da geometri optimizasyon sonuçları görülebilir. Aynı yapıya optimize olmuş konformerler çizelgede gösterilmedi. Çizelge 3.11'de ise frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen geometriler kararlılık sıralamasına göre Şekil 3.6'de verildi.

Çizelge 3.10 HIE_ZW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HIE_ZW_02	-548,8250610	10,96	0
HIE_ZW_13	-548,8237037	15,30	3,56
HIE_ZW_09	-548,8178469	15,11	18,94
HIE_ZW_04	-548,8173053	15,16	20,36
HIE_ZW_15	-548,8162652	10,34	23,09
HIE_ZW_11	-548,8146320	7,55	27,38
HIE_ZW_05	-548,8140247	9,28	28,98
HIE_ZW_08	-548,8120328	11,95	34,20

Çizelge 3.11 HIE_ZW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+zpe (Kj/mol)
HIE_ZW_02	-548.8250610	-548.6640030	10.96	0
HIE_ZW_13	-548.8237037	-548.6627480	15.30	3,30
HIE_ZW_09	-548,8178469	-548,6580090	15,10	15,74
HIE_ZW_04	-548,8173053	-548,6573060	15,16	17,59
HIE_ZW_15	-548,8162652	-548,6558070	10,34	21,52
HIE_ZW_11	-548,8146320	-548,6548360	7,55	24,07
HIE_ZW_05	-548,8140247	-548,6544840	9,28	24,99
HIE_ZW_08	-548,8120328	-548,6525190	11,95	30,15



Şekil 3.6 Kararlılık sıralamasına göre HIE_ZW konformerleri

Bu grupta karşılaşılan en önemli karakteristik terminal grupların hidrojen bağı üzerinden birbirlerine oldukça yaklaşmış olmasıdır. İki grubunda yüklü olması hidrojen bağı etkileşimini oldukça arttırmıştır. Karboksil oksijeni ile protone amino grubu hidrojeni arasında mesafe 1,7 Å'e kadar düşmüştür. Elde edilen bütün geometrilerde bu durum gerçekleşmektedir. Buna ek olarak en kararlı iki yapı incelendiğinde amino grubu hidrojeni ile N⁵ azotu arasında hidrojen bağı etkileşimi dikkat çekmektedir. Aralarındaki fark ise karboksil grubunun imidazol düzlemine dik oluşudur. Bu yapı değişikliği 3,27 Kj/mol'lük bir fark yaratmaktadır.

3.1.6. HIP_ZCW konformasyon taramaları ve frekans analizleri

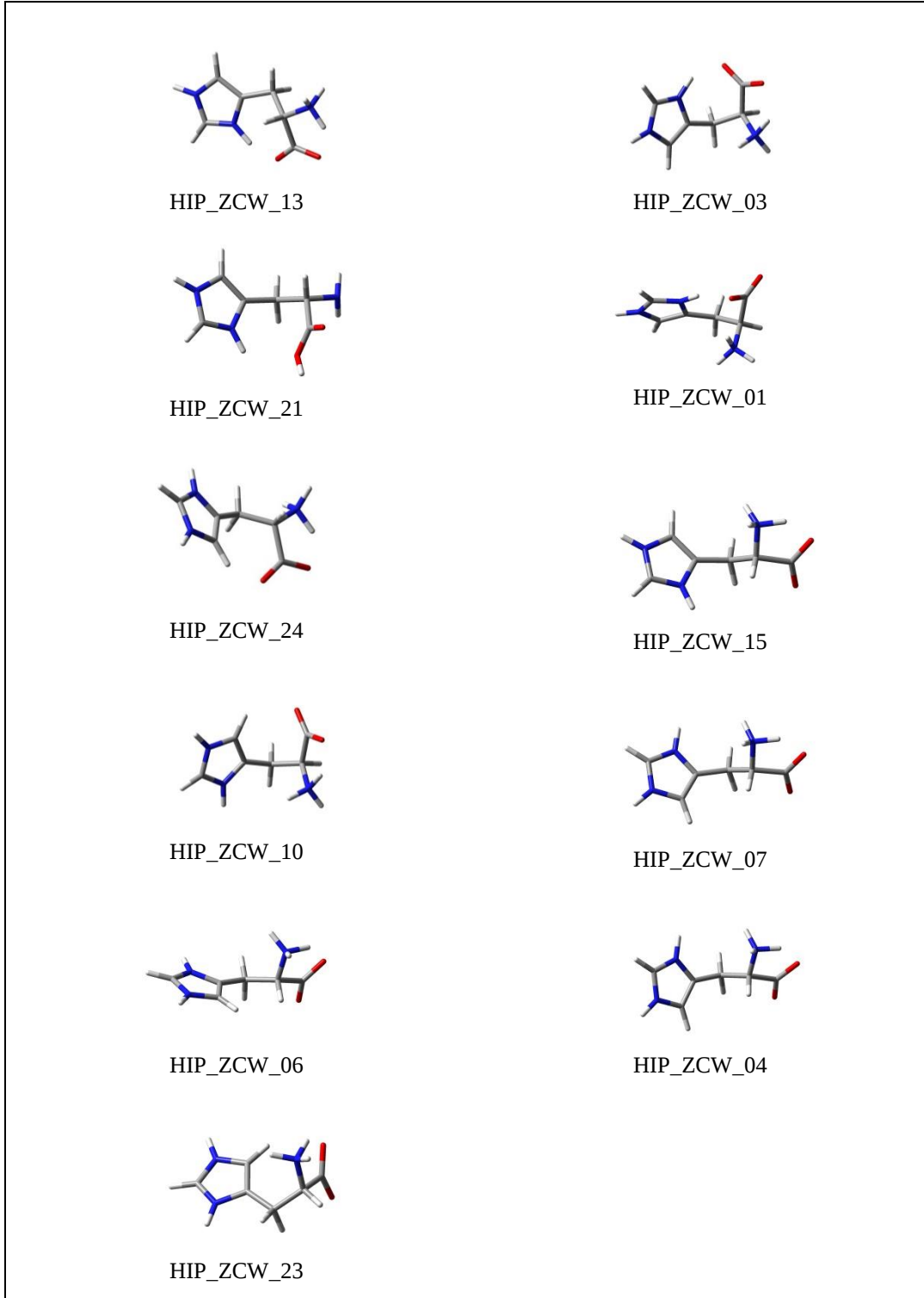
Bu yapı için gerçekleştirilen konformasyon analizinde imidazol halkasında N⁵ pozisyonunda yer alan hidrojen, halkanın planar düzlemine 90° dik olacak bir şekilde konum almaktadır. Elbette bu durum mantıklı değildir ve yöntemin bir eksikliği olduğu açıktır. Aynı halka yapısına sahip olan ancak terminalleri nötral yapıda olan moleküllerde böyle bir problem ile karşılaşılmaı. Yapılan araştırmalarda bu hata için mantıklı bir açıklama ve çözüm elde edilemedi. Hesapsal programın molekül içi yük dağılımını düzgün düzgün bir biçimde gerçekleştirmedeği öngörülebilir. Çözüm olarak nötral terminale sahip olan ve HIP formuna ait konformer tarama sonuçları alındı ve terminal gruplar zwitteriyonik forma getirildi. Bu yapılar ile geometri optimizasyonu gerçekleştirildi. Geometri optimizasyonları sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bir kısım konformerlerin aynı yapıya optimize olduğu görüldü. Gerekli eleme işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen 11 farklı konformer ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.12’de geometri optimizasyon sonuçları görülebılır. Aynı yapıya optimize olmuş konformerler çizelgede gösterilmedi. Çizelge 3.13’de ise frekans analiz sonuçları yer almaktadır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen geometriler kararlılık sıralamasına göre Şekil 3.7’de verildi.

Çizelge 3.12 HIP_ZCW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/Mol)
HIP_ZCW_13	-549,2859542	12,19	0,00
HIP_ZCW_03	-549,2803961	13,58	14,59
HIP_ZCW_01	-549,2746128	14,88	29,78
HIP_ZCW_21	-549,2737906	11,55	31,94
HIP_ZCW_24	-549,2719215	16,46	36,84
HIP_ZCW_15	-549,2714314	21,27	38,13
HIP_ZCW_10	-549,2713774	16,86	38,27
HIP_ZCW_23	-549,2703597	17,01	40,94
HIP_ZCW_06	-549,2701457	21,52	41,51
HIP_ZCW_07	-549,2700818	21,69	41,67
HIP_ZCW_04	-549,2700637	21,54	41,72

Çizelge 3.13 HIP_ZWC frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji+zpe (Kjoule/mol)
HIP_ZCW_13	-549,285954	-549,112301	12,19	0
HIP_ZCW_03	-549,280396	-549,105720	13,58	17,28
HIP_ZCW_21	-549,273791	-549,100042	11,55	32,19
HIP_ZCW_01	-549,274613	-549,099801	14,88	32,82
HIP_ZCW_24	-549,271922	-549,097656	16,46	38,45
HIP_ZCW_15	-549,271431	-549,097324	21,27	39,32
HIP_ZCW_10	-549,271377	-549,096954	16,86	40,29
HIP_ZCW_07	-549,270082	-549,096363	21,69	41,85
HIP_ZCW_06	-549,270146	-549,096265	21,52	42,10
HIP_ZCW_04	-549,270064	-549,096033	21,54	42,71
HIP_ZCW_23	-549,270360	-549,095998	17,01	42,80



Şekil 3.7 Kararlılık sıralamasına göre HIP_ZWC konformerleri

Bir önceki grupta tüm yapılarda terminaller arası etkileşim aynı yapıda gerçekleşmiş ve bunun baz setinden kaynaklanan bir hata olabileceği sonucuna varılmıştı. HIP_ZWC grubunun bazı konformerlerinde benzer yapılanma oluşmuşsa da, tüm yapılarda gerçekleşmemiş olması sonuçları daha güvenilir

kılmaktadır. En kararlı olan 13 numaralı konformer de karboksil oksijeni ile N⁵ arasında oluşan 1,5 Å'lük hidrojen bağının getirdiği halkasal yapının, kararlılığa büyük katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu sırada ise amino grubu karboksil grubuna air diğer oksijen ile etkileşim içinde ve genel olarak yapının planar düzlemindedir. İkinci konformerde terminaller arası etkileşim sabit kalarak imidazol halkası üzerine yaklaşımları söz konusudur. Enerjetik olarak aralarındaki fark 17,29 Kj/mol Bu noktada terminaller arasında konumlanmanın baz setinden dolayı sabit kalmış olması ve bunun yapıya gerginlik katmış olması tarafımızca olası görülmektedir. İleriki çalışmalarda bu yapının cc-PVTZ ile incelenerek karşılaştırma yapılması planlanmaktadır.

Kararlılık sıralamasında üçüncü sırada bulunan 21 numaralı konformerde ise amino grubundan hidrojen karboksil grubuna transfer olmuştur. Böylece terminal gruplar nötral hale gelmiştir. Çözelti ortamında bu formun oluşması gerçekçi değildir. Ayrıca amino karbonu ile karboksil oksijenleri arasında 3 Å'lük mesafe bulunmaktadır. Muhtemel açıklaması optimizasyon sırasında terminallerin birbirine yakın olduğu bir sırada hidrojen transferinin gerçekleşmiş olması ve sonrasında mesafenin tekrar açılmış olmasıdır. Enerjetik olarak üst sıralarda bulunuyor olmasına karşın terminallerin zwitteriyonik değil nötral formda oluşu bu sıralamada bulunuyor olmasını anlamsız hale getirmektedir.

3.1.7 HID_AW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları

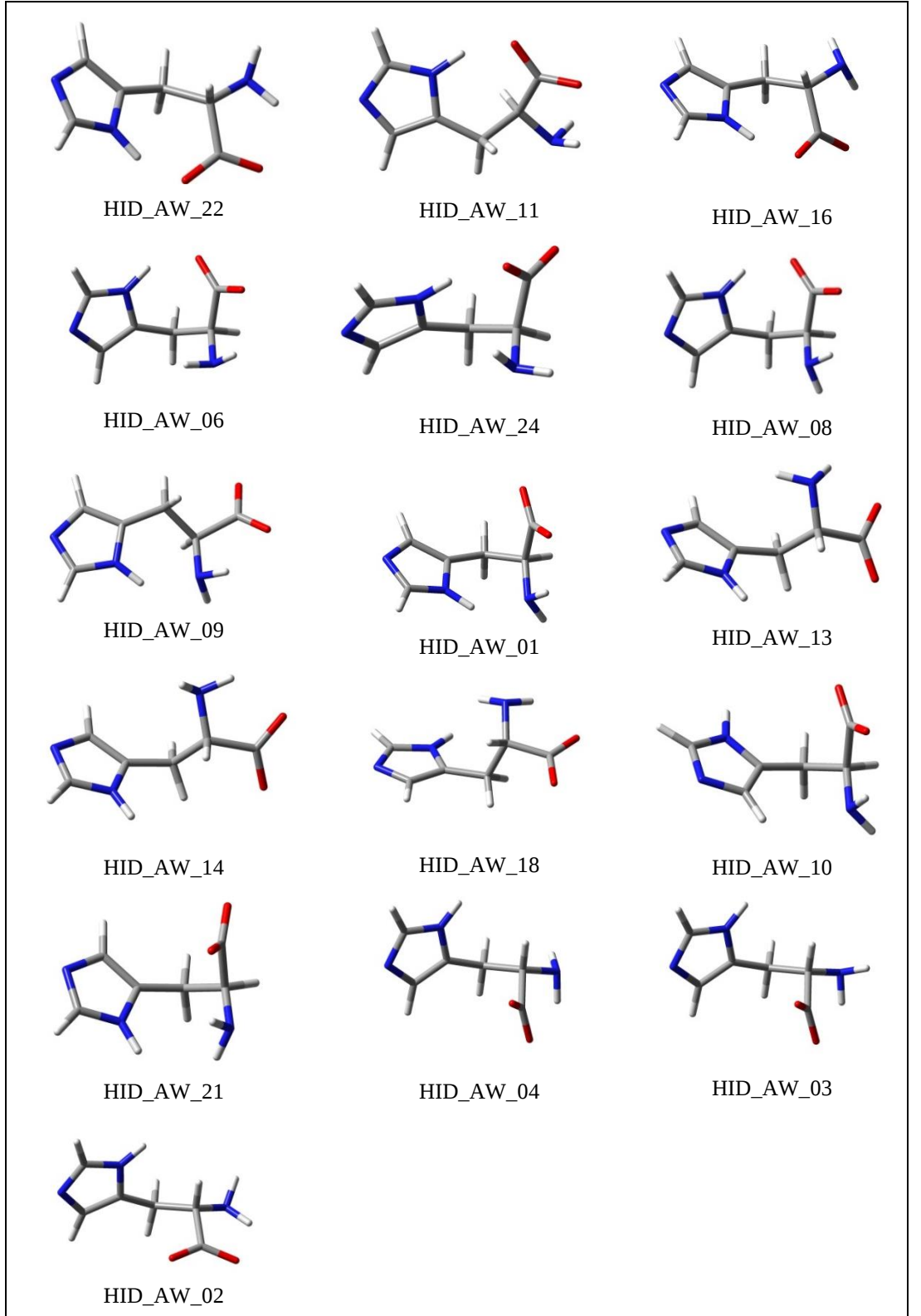
İmidazol halkası N⁵ pozisyonundan protone olan bu form yüklü karboksil grubu içermektedir. Amino grubu ise nötral durumdadır. Yüklü gruplar içermesinden ötürü hesaplamaların çözücü etkisi altında yapılması gerekmektedir. Bu etkinin sağlanması için IEF-PCM yöntemi hesaplamalara dahil edildi. Yapılan konformasyon analizinde 24 farklı konformer bulundu. Yapı optimizasyonu sonrası, aynı geometriye optimize olan konformerler elendiğinde 16 farklı konformer elde edildi ve bu yapılar ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.14 konformerlerin geometri optimizasyonlarına dair sonuçları, Çizelge 3.15 frekans analizine dair sonuçları içermektedir. Hesaplamalar sonunda elde edilen yapılar Şekil 3.8'da kararlılık sıralamalarına göre yer almaktadır.

Çizelge 3.14 HID_AW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji Kj/mol
HID_AW_22	-548,3477641	4,84	0,00
HID_AW_11	-548,3475966	3,73	0,44
HID_AW_16	-548,3468009	5,51	2,53
HID_AW_06	-548,3451486	4,86	6,87
HID_AW_24	-548,3442871	4,20	9,13
HID_AW_08	-548,3440579	5,24	9,73
HID_AW_09	-548,3434827	9,18	11,24
HID_AW_01	-548,3430559	9,32	12,36
HID_AW_13	-548,3363709	11,70	29,91
HID_AW_14	-548,3363292	11,15	30,02
HID_AW_10	-548,3349863	9,23	33,55
HID_AW_18	-548,3349745	12,94	33,58
HID_AW_21	-548,3345777	11,68	34,62
HID_AW_04	-548,3341322	11,72	35,79
HID_AW_03	-548,3340802	9,99	35,93
HID_AW_02	-548,3320934	10,84	41,14

Çizelge 3.15 HID_AW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HID_AW_22	-548,3477641	-548,201376	4,84	0,00
HID_AW_11	-548,3475966	-548,201144	3,73	0,61
HID_AW_16	-548,3468009	-548,200206	5,51	3,07
HID_AW_06	-548,3451486	-548,198076	4,86	8,66
HID_AW_24	-548,3442871	-548,197438	4,20	10,34
HID_AW_08	-548,3440579	-548,197249	5,24	10,84
HID_AW_09	-548,3434827	-548,196332	9,18	13,24
HID_AW_01	-548,3430559	-548,195984	9,32	14,16
HID_AW_13	-548,3363709	-548,189718	11,70	30,61
HID_AW_14	-548,3363292	-548,189718	11,15	30,61
HID_AW_18	-548,3349745	-548,188225	12,94	34,53
HID_AW_10	-548,3349863	-548,188108	9,23	34,84
HID_AW_21	-548,3345777	-548,187550	11,68	36,30
HID_AW_04	-548,3341322	-548,187235	11,72	37,13
HID_AW_03	-548,3340802	-548,187180	9,99	37,27
HID_AW_02	-548,3320934	-548,185489	10,84	41,71



Şekil 3.8 Kararlılık sıralamasına göre HID_AW konformerleri

Kararlılık sıralamasında ilk üç basamakta yer alan yapılar arasında oldukça düşük enerji farklanması bulunmaktadır. Geometrik olarak yapılarıda oldukça benzerdir. Amino grubunun kendi bağı etrafında dönmüş olmasından kaynaklanan farklılık dışında neredeyse fark bulunmamaktadır. Yüklü karboksil grubu ile N⁵ hidrojeni arasında oluşan ve halkasal yapıya yol açan hidrojen bağı mesafesi 3 konformerde de 1,63 Å mesafesindedir. Ayrıca amino grubu diğer oksijen ile de hidrojen bağı yapmaktadır. Kararlılık sıralamasında dördüncü, beşinci ve altıncı sırayı oluşturan 06, 24 ve 08 arasında da ilk üçlü gibi benzerlikler bulunmaktadır. Halkasal yapı oluşumu yine gözlenmektedir. Ancak bu sefer halkasal yapı biraz daha bükülmüş durumdadır ve amino grubu planar olmaktan ziyade imidazol halkasına doğru eğilmektedir. İkinci üçlüde ilginç olan nokta 24 numaralı konformerde karboksil grubunun bir oksijenin hem N⁵ ile hemde amino hidrojeni ile hidrojen bağı oluşturuyor olmasıdır. Yaygın olarak bu hidrojen bağları ayrı oksijenler tarafından oluşturulmaktadır. Bu farklılığın enerjetik olarak majör bir farklanma yaratmamış olması dikkat çekicidir.

3.1.8 HIE_AW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları

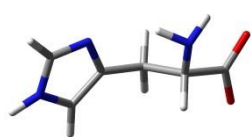
İmidazol halkası N³ pozisyonundan protone olan bu form yüklü karboksil grubu içermektedir. Amino grubu ise nötral durumdadır. Yüklü gruplar içermesinden ötürü hesaplamaların çözücü etkisi altında yapılması gerekmektedir. Bu etkinin sağlanması için IEF-PCM yöntemi hesaplamalara dahil edildi. Yapılan konformasyon analizinde 34 farklı konformer bulundu. Yapı optimizasyonu sonrası, aynı geometriye optimize olan konformerler elendiğinde 20 farklı konformer elde edildi ve bu yapılar ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.16 konformerlerin geometri optimizasyonlarına dair sonuçları, Çizelge 3.17 frekans analizine dair sonuçları içermektedir. Hesaplamalar sonunda elde edilen yapılar Şekil 3.9'de kararlılık sıralamalarına göre yer almaktadırlar.

Çizelge 3.16 HIE_AW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

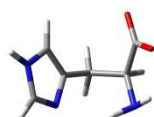
Konformer	Dipol Moment (Debye)	Enerji (a.u.)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HIE_AW_25	18,53	-548.3367573	0,00
HIE_AW_07	12,67	-548.3365375	0,58
HIE_AW_33	16,07	-548.3359339	2,16
HIE_AW_26	18,71	-548.3357445	2,66
HIE_AW_11	17,57	-548.3354858	3,34
HIE_AW_32	11,83	-548.3354191	3,51
HIE_AW_24	16,17	-548.3353211	3,77
HIE_AW_28	11,33	-548.3351116	4,32
HIE_AW_19	18,06	-548.3348427	5,03
HIE_AW_01	9,11	-548.3344871	5,96
HIE_AW_16	11,40	-548.3343614	6,29
HIE_AW_13	16,08	-548.3339305	7,42
HIE_AW_09	12,71	-548.3338500	7,63
HIE_AW_31	17,10	-548.3337207	7,97
HIE_AW_12	13,05	-548.3334916	8,57
HIE_AW_18	16,23	-548.3334857	8,59
HIE_AW_03	11,11	-548.3333709	8,89
HIE_AW_14	14,76	-548.3325291	11,10
HIE_AW_10	12,98	-548.3322989	11,71
HIE_AW_29	10,95	-548.3302168	17,17

Çizelge 3.17 HIE_AW frekans analiz sonuçları

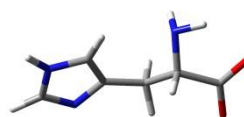
Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+Zpe (Kj/mol)
HIE_AW_25	-548,3367573	-548,189721	18,53	0
HIE_AW_07	-548,3365375	-548,189380	12,67	0,90
HIE_AW_33	-548,3359339	-548,189237	16,07	1,27
HIE_AW_26	-548,3357445	-548,189102	18,71	1,63
HIE_AW_11	-548,3354858	-548,188944	17,57	2,04
HIE_AW_24	-548,3353211	-548,188702	16,17	2,68
HIE_AW_32	-548,3354191	-548,188578	11,83	3,00
HIE_AW_19	-548,3348427	-548,188290	18,06	3,76
HIE_AW_28	-548,3351116	-548,188260	11,33	3,84
HIE_AW_01	-548,3344871	-548,187850	9,11	4,91
HIE_AW_16	-548,3343614	-548,187742	11,40	5,20
HIE_AW_31	-548,3337207	-548,187245	17,10	6,50
HIE_AW_09	-548,3338500	-548,187058	12,71	6,99
HIE_AW_13	-548,3339305	-548,187055	16,08	7,00
HIE_AW_18	-548,3334857	-548,187042	16,23	7,03
HIE_AW_12	-548,3334916	-548,186739	13,05	7,83
HIE_AW_03	-548,3333709	-548,186646	11,11	8,07
HIE_AW_14	-548,3325291	-548,185737	14,76	10,46
HIE_AW_10	-548,3322989	-548,185524	12,98	11,02
HIE_AW_29	-548,3302168	-548,183477	10,95	16,39



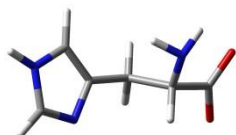
HIE_AW_25



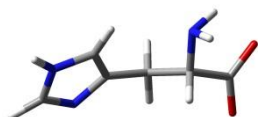
HIE_AW_07



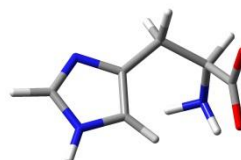
HIE_AW_33



HIE_AW_26



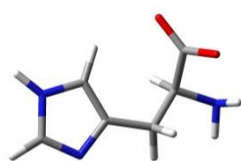
HIE_AW_24



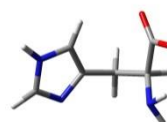
HIE_AW_32



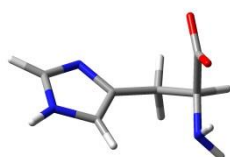
HIE_AW_19



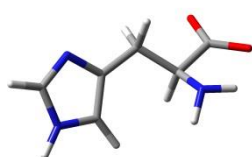
HIE_AW_28



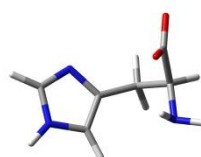
HIE_AW_01



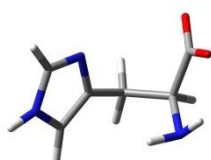
HIE_AW_16



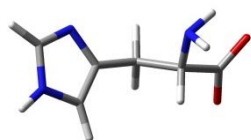
HIE_AW_31



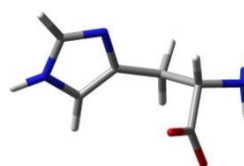
HIE_AW_09



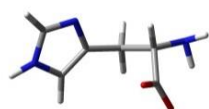
HIE_AW_13



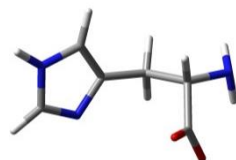
HIE_AW_18



HIE_AW_12



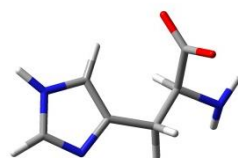
HIE_AW_03



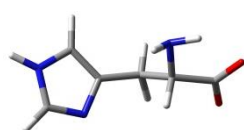
HIE_AW_14



HIE_AW_10



HIE_AW_29



HIE_AW_11

Şekil 3.9 Kararlılık sıralamasına göre HIE_AW konformerleri

Zwitteriyonik yapılar ile karşılaştırıldığında, terminal gruplardan biri ile imidazol halkası arasında etkileşimden ötürü halkasal yapı oluşumu bu grupta kısmen azalmıştır. Amino grubunun nötral oluşu ve etkileşim içine girecek grubun diğer terminal tarafından dengeleniyor oluşu buna neden oluyor gibi gözükmemektedir. Bununla birlikte yinede bu halkasal yapının oluşum eğilimi gözlenmiştir. En kararlı üç yapıya bakıldığında nötral amino terminali ile imidazol halkası arasında zayıf bir etkileşim gözlenmektedir. 25 ve 07 numaralı konformerlerde bu etkileşim amino hidrojeni ile N⁵ arasında gerçekleşmektedir. Bu grupta N⁵ azotunun protone olmamış durumda bulunduğuna dikkat çekmek gerekir. 33 numaralı konformerde ise amino azotunun kendini halka karbonlarından biriyle etkileşim içindedir. Amino grubu 25 ve 07 numaralı yapılardakinin aksine halkaya ters konumlanmış durumdadır. Çizelge 3.15’de görülmektedir ki bazı konformerler arası enerji farkı oldukça düşüktür. 25 ve 07 numaralı konformerlerde grupların konumlanmaları ve enerjiler arasındaki fark göz önüne alındığında, kiral karbol üzerinden terminallerin birbirlerine göre konumlarını koruyarak, beklenenden çok daha kolayca dönme hareketi gerçekleştirebildikleri idda edilebilir.

3.1.9 HID_CW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları

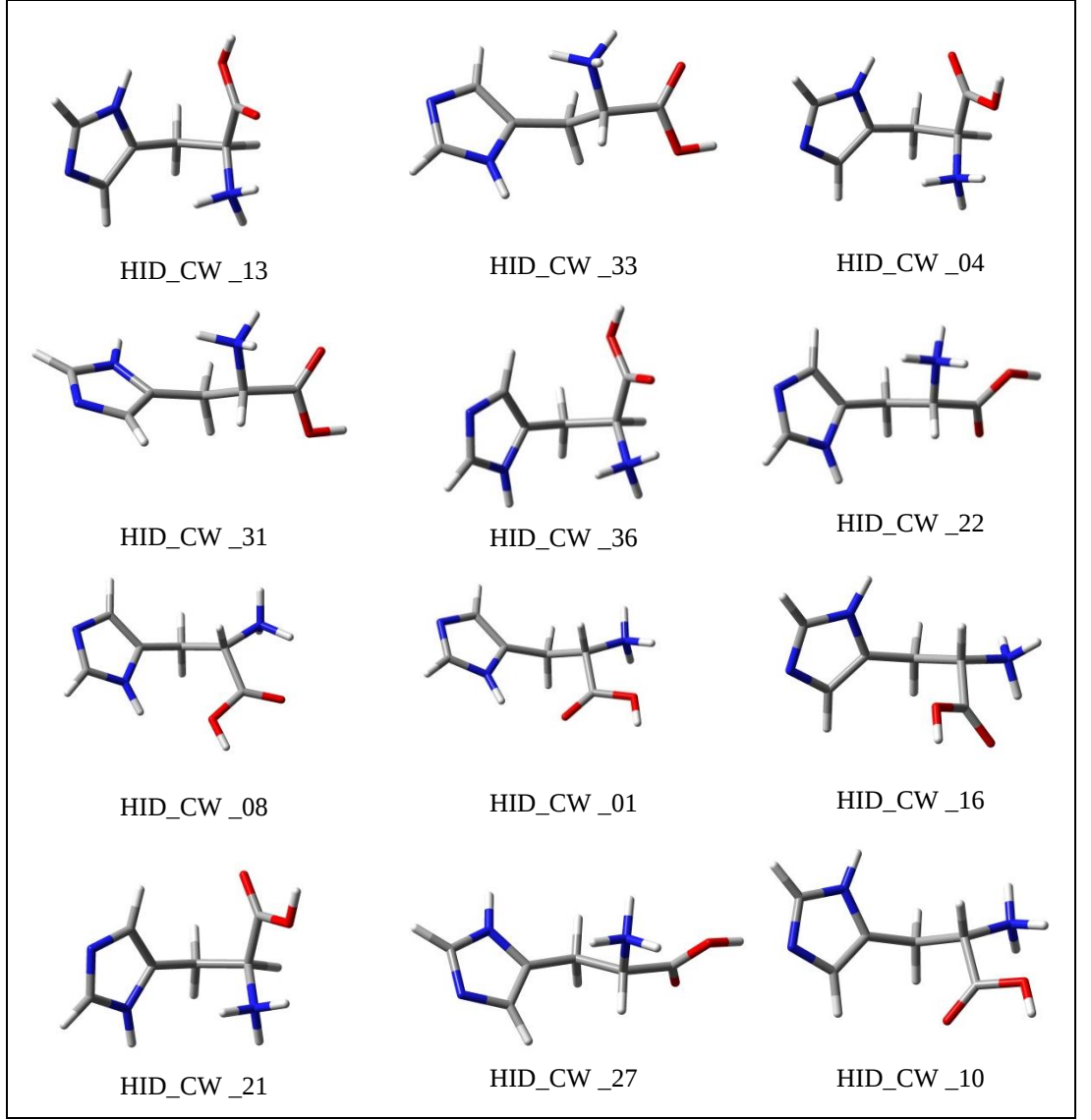
İmidazol halkası N⁵ pozisyonundan protone olan bu form yüklü amino grubu içermektedir. Karboksil grubu ise nötral durumdadır. Yüklü gruplar içermesinden ötürü hesaplamaların çözücü etkisi altında yapılması gerekmektedir. Bu etkinin sağlanması için IEF-PCM yöntemi hesaplamalara dahil edildi. Yapılan konformasyon analizinde 37 farklı konformer bulundu. Yapı optimizasyonu sonrası, aynı geometriye optimize olan konformerler elendiğinde 12 farklı konformer elde edildi ve bu yapılar ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.18 konformerlerin geometri optimizasyonlarına dair sonuçları, Çizelge 3.19 frekans analizine dair sonuçları içermektedir. Hesaplamalar sonunda elde edilen yapılar Şekil 3.10’de kararlılık sıralamalarına göre yer almaktadırlar.

Çizelge 3.18 HID_CW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HID_CW _13	-549,2704517	9,15	0,00
HID_CW _33	-549,2701225	7,55	0,86
HID_CW _04	-549,2683386	11,45	5,55
HID_CW _36	-549,2679693	12,11	6,52
HID_CW _31	-549,2672722	7,26	8,35
HID_CW _22	-549,2668208	9,07	9,53
HID_CW _08	-549,2666094	12,61	10,09
HID_CW _01	-549,2664698	16,86	10,45
HID_CW _16	-549,2662263	14,89	11,09
HID_CW _21	-549,2650888	14,13	14,08
HID_CW _27	-549,2647664	10,65	14,93
HID_CW _10	-549,2628492	17,89	19,96

Çizelge 3.19 HID_CW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+Zpe (Kj/mol)
HID_CW _13	-549,2704517	-549,095269	9,15	0,00
HID_CW _33	-549,2701225	-549,095242	7,55	0,07
HID_CW _04	-549,2683386	-549,093239	11,45	5,33
HID_CW _31	-549,2672722	-549,092848	7,26	6,36
HID_CW _36	-549,2679693	-549,092826	12,11	6,41
HID_CW _22	-549,2668208	-549,092425	9,07	7,47
HID_CW _08	-549,2666094	-549,091714	12,61	9,33
HID_CW _01	-549,2664698	-549,091586	16,86	9,67
HID_CW _16	-549,2662263	-549,091431	14,89	10,08
HID_CW _21	-549,2650888	-549,090108	14,13	13,55
HID_CW _27	-549,2647664	-549,089983	10,65	13,88
HID_CW _10	-549,2628492	-549,088183	17,89	18,60



Şekil 3.10 Kararlılık sıralamasına göre HID_CW konformerleri

Karboksil grubunun nötral olması ve amino grubunun yüklü olması bu grupta halkalı bir yapı oluşumu oldukça kısıtlamıştır. 31 ve 22 numaralı konformerde buna eğilim gözlenmiş olsada, 31 numaralı konformerde oksijenin kendi hidrojeni tarafından yük olakan dengelenmiş olması, 22 numaralı konferme ise çift bağın imidazola yaklaşmasına rağmen ters taraftan amino grubu tarafından etkileşiyor olması etkin bir halkalı yapıyı engellemektedir. İkinci sırada bulunan 33 numaralı konformerde ise terminal grupları ile imidazol halkası birbirine paralele yakın iki ayrı düzlem oluşturmaktadır. Bu açıdan bakıldığında bu yük ve imidazol formasyonu için halkalı yapının kararlılık açısından çokta etkin olmadığı söylenebilir. Kararlılık sıralamasında en altta bulunan 10 numaralı konformerde de halkasal bir yapı gözlenmesi bu savı desteklemektedir.

3.1.10 HIE_CW konformasyon taramaları ve frekans sonuçları

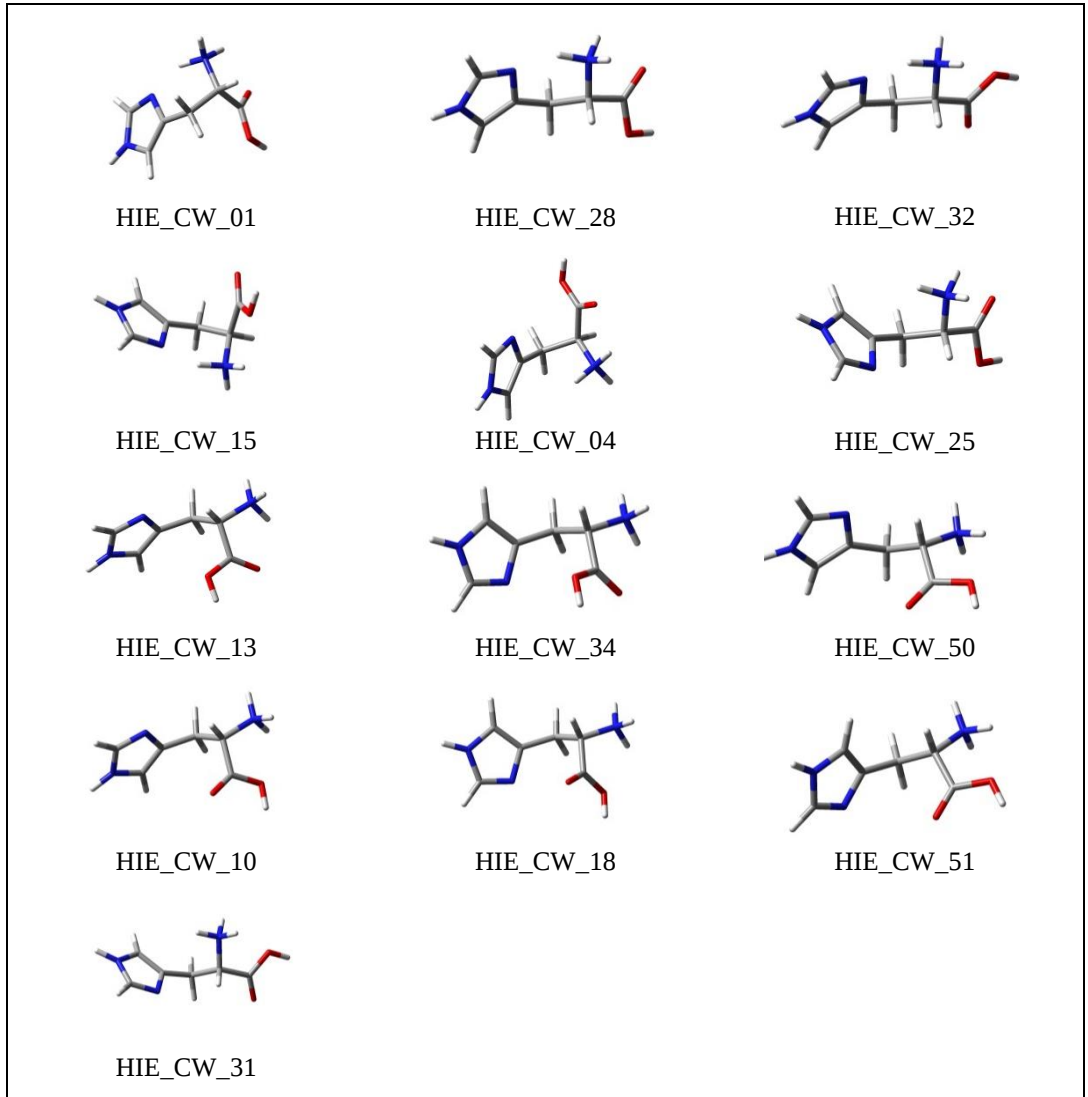
İmidazol halkası N³ pozisyonundan protone olan bu form yüklü amino grubu içermektedir. Karboksil grubu ise nötral durumdadır. Yüklü gruplar içermesinden ötürü hesaplamaların çözücü etkisi altında yapılması gerekmektedir. Bu etkinin sağlanması için IEF-PCM yöntemi hesaplamalara dahil edildi. Yapılan konformasyon analizinde 73 farklı konformer bulundu. Yapı optimizasyonu sonrası, aynı geometriye optimize olan konformerler elendiğinde 13 farklı konformer elde edildi ve bu yapılar ile frekans analizi gerçekleştirildi. Çizelge 3.20 konformerlerin geometri optimizasyonlarına dair sonuçları, Çizelge 3.21 frekans analizine dair sonuçları içermektedir. Hesaplamalar sonunda elde edilen yapılar Şekil 3.11’de kararlılık sıralamalarına göre yer almaktadırlar.

Çizelge 3.20 HIE_CW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HIE_CW_28	-549,2843641	3,21	0,00
HIE_CW_01	-549,2842768	2,60	0,23
HIE_CW_32	-549,2817018	5,11	6,99
HIE_CW_15	-549,2815938	5,15	7,27
HIE_CW_04	-549,2745213	8,16	25,84
HIE_CW_25	-549,2739613	6,18	27,31
HIE_CW_31	-549,2708286	10,09	35,54
HIE_CW_13	-549,2706673	6,50	35,96
HIE_CW_34	-549,2696226	9,86	38,70
HIE_CW_10	-549,2675463	10,26	44,16
HIE_CW_50	-549,2674487	9,55	44,41
HIE_CW_18	-549,2665652	11,32	46,73
HIE_CW_51	-549,2645289	12,95	52,08

Çizelge 3.21 HIE_CW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+Zpe (Kj/mol)
HIE_CW_01	-549,2842768	-549,110146	2,60	0,00
HIE_CW_28	-549,2843641	-549,110005	3,21	0,37
HIE_CW_32	-549,2817018	-549,107524	5,11	6,88
HIE_CW_15	-549,2815938	-549,107007	5,15	8,24
HIE_CW_04	-549,2745213	-549,100043	8,16	26,53
HIE_CW_25	-549,2739613	-549,099334	6,18	28,39
HIE_CW_31	-549,2708286	-549,096581	10,08	35,61
HIE_CW_13	-549,2706673	-549,096086	6,50	36,91
HIE_CW_34	-549,2696226	-549,094576	9,86	40,88
HIE_CW_50	-549,2674487	-549,093182	9,55	44,54
HIE_CW_10	-549,2675463	-549,093064	10,26	44,85
HIE_CW_18	-549,2665652	-549,091714	11,32	48,39
HIE_CW_51	-549,2645289	-549,090027	12,95	52,82



Şekil 3.11 Kararlılık sıralamasına göre HIE_CW konformerleri

Bu grup için elde edilen geometrilerde kararlılık sıralamasında üst basamaklara çıkıldıkça amino grubu hidrojeni ile N⁵ azotu arasında gerçekleşen etkileşim nedeniyle oluşan halkasal yapı gözlenmektedir. Enerji sıralamasında alt basamaklara inildikçe bu halkasal yapı bozulmaktadır. Ayrıca çift bağlı karboksil oksijenide amino grubuyla hidrojen bağı oluşturmaktadır. Enerjetik olarak aralarında az fark olan (0,38 KJ/mol) ilk iki konformer arasında temel fark birbirlerine göre koordinasyonunu koruyan terminallerin 01 numaralı konformerde imidazol düzlemine paralel 28 numaralı konformerde ise dik bir şekilde oluşturuyor olmalarıdır. Bununla birlikte iki konformerde de halkasal yapının oluşmasını sağlayan hidrojen bağı mesafesi neredeyse aynıdır (01: 1,71 Å, 28: 1,70 Å) Bu farklılığın düşük bir enerji farklanması yaratıyor oluşu kiral karbon üzerinden beklenenden çok daha serbest bir dönme hareketi olduğu sonucunu çıkarmamıza neden olmaktadır. Kararlılık sıralamasında üçüncü basamakta bulunan 32 numaralı konformerin 28 numaralı konformerden farkı ise karboksil grubunun 180⁰ derece dönmüş olmasıdır. Bu durumda amino grubu ile çift bağlı oksijen yerine hidroksil grubu etkileşim içine girmiş, ve oluşan hidrojen bağı etkileşim mesafesi 2,29 Å'den 2.51 Å'e çıkmıştır. Bu değişiklik 6.53 KJ/mol'lük bir fark oluşturmuştur.

3.1.11 HIP_NW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları

Daha önce bahsettiğimiz, HIP_ZW konformasyon taramalarında sırasında oluşan N⁵ hidrojeninin planarlığının bozulması problemi HIP_NW grubu içinde gerçekleşti. Çözüm olarak aynı terminal yapısına sahip N³ protone formun konformasyon tarama sonuçları alınarak, imidazol halkasına N⁵ konumundan bir hidrojen eklendi. Elde edilen bu form yüklü imizadol halkasına ve yüklü karboksil grubuna sahiptir. Bu nedenle molekülün toplam yükü sıfırdır. Amino grubu nötral durumdadır. Geometri optimizasyonu sonrasında 34 farklı konformerden bazıları aynı yapıya optimize olduklarından, elimizdeki farklı yapı sayısı 22'ye düştü.

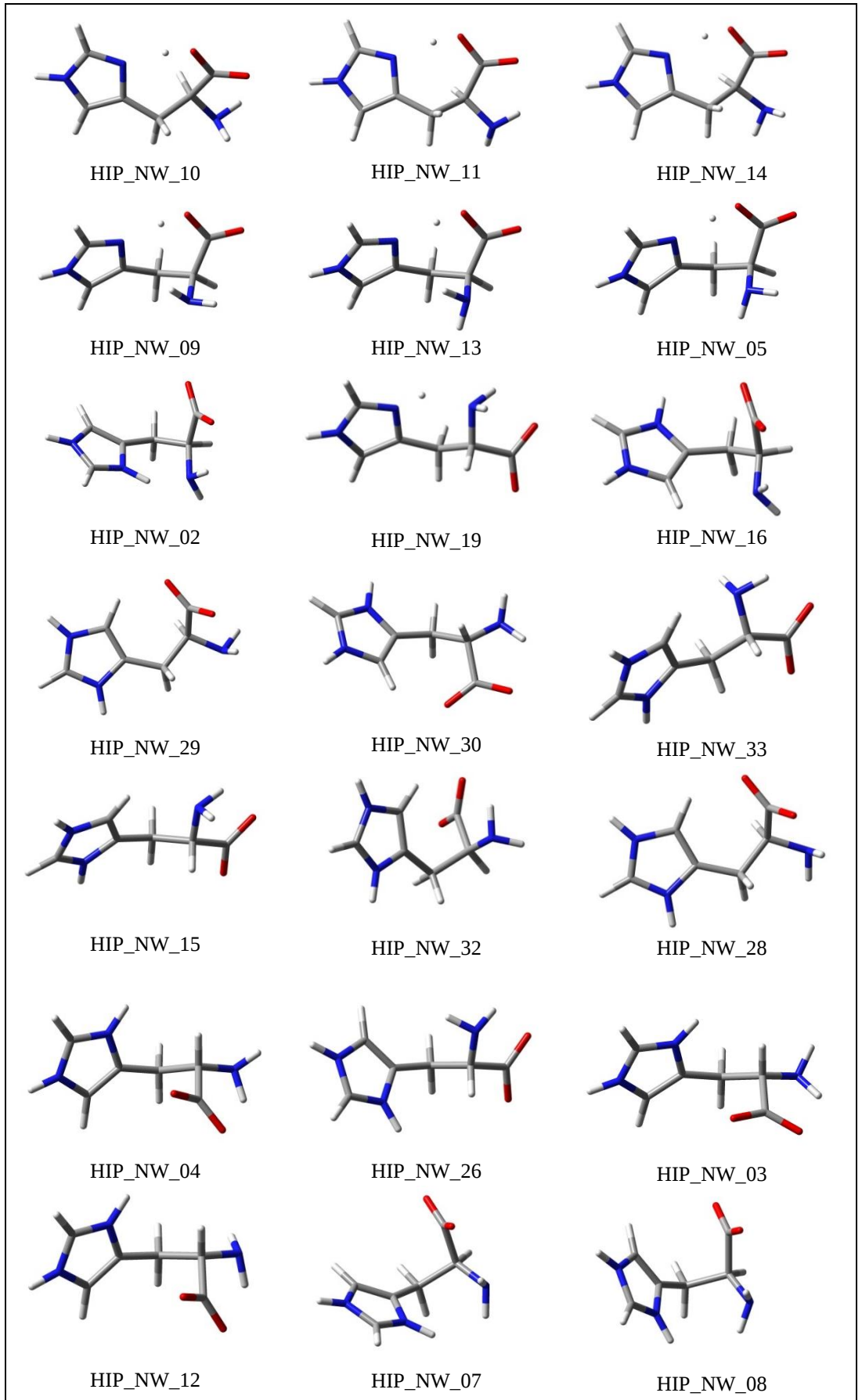
Yüklü gruplar içermesinden ötürü hesaplamaların çözücü etkisi altında yapılması gerekmektedir. Bu etkinin sağlanması için IEF-PCM yöntemi hesaplamalara dahil edildi. Çizelge 3.22 konformerlerin geometri optimizasyonlarına dair sonuçları, Çizelge 3.23 frekans analizine dair sonuçları içermektedir. Hesaplamalar sonunda elde edilen yapılar Şekil 3.12’de kararlılık sıralamalarına göre yer almaktadırlar.

Çizelge 3.22 HIP_NW konformerleri geometri optimizasyon sonuçları

HIP_NV	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (a.u.)
HIP_NW_10	-548,8299118	10,62	0,00
HIP_NW_11	-548,8285730	11,84	3,52
HIP_NW_14	-548,8272707	12,43	6,93
HIP_NW_09	-548,8265331	11,06	8,87
HIP_NW_13	-548,8251031	13,29	12,63
HIP_NW_05	-548,8242093	11,43	14,97
HIP_NW_02	-548,8118941	16,70	47,31
HIP_NW_19	-548,8109684	22,59	49,74
HIP_NW_16	-548,8008865	17,53	76,21
HIP_NW_29	-548,8004051	20,05	77,47
HIP_NW_30	-548,8003653	21,96	77,57
HIP_NW_33	-548,8003308	25,28	77,66
HIP_NW_15	-548,8001557	24,86	78,12
HIP_NW_32	-548,8000038	18,84	78,52
HIP_NW_28	-548,7999219	21,94	78,74
HIP_NW_04	-548,7974400	18,11	85,25
HIP_NW_26	-548,7973425	26,30	85,51
HIP_NW_03	-548,7971423	18,99	86,04
HIP_NW_12	-548,7969484	19,88	86,55
HIP_NW_07	-548,7968864	19,53	86,71
HIP_NW_08	-548,7966503	19,98	87,33
HIP_NW_25	-548,7957527	26,91	89,68

Çizelge 3.23 HIP_NW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Enerji+Zpe (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+Zpe (Kj/mol)
HIP_NW_10	-548,8299118	-548,669904	10,62	0,00
HIP_NW_11	-548,8285730	-548,668851	11,84	2,76
HIP_NW_14	-548,8272707	-548,667551	12,43	6,18
HIP_NW_09	-548,8265331	-548,666281	11,06	9,51
HIP_NW_13	-548,8251031	-548,665136	13,29	12,52
HIP_NW_05	-548,8242093	-548,664350	11,43	14,58
HIP_NW_02	-548,8118941	-548,651957	16,70	47,12
HIP_NW_19	-548,8109684	-548,650803	22,59	50,15
HIP_NW_16	-548,8008865	-548,640219	17,53	77,94
HIP_NW_29	-548,8004051	-548,639677	20,05	79,36
HIP_NW_30	-548,8003653	-548,639713	21,96	79,27
HIP_NW_33	-548,8003308	-548,639492	25,28	79,85
HIP_NW_15	-548,8001557	-548,639670	24,86	79,38
HIP_NW_32	-548,8000038	-548,639319	18,84	80,30
HIP_NW_28	-548,7999219	-548,639290	21,94	80,38
HIP_NW_04	-548,7974400	-548,636801	18,11	86,91
HIP_NW_26	-548,7973425	-548,636911	26,30	86,62
HIP_NW_03	-548,7971423	-548,636826	18,99	86,85
HIP_NW_12	-548,7969484	-548,636352	19,88	88,09
HIP_NW_07	-548,7968864	-548,636136	19,53	88,66
HIP_NW_08	-548,7966503	-548,636063	19,98	88,85
HIP_NW_25	-548,7957527	-548,635417	26,91	90,55



Şekil 3.12 Kararlılık sıralamasına göre HIP_NW konformerleri

Şekil 3.12’de görülebileceği gibi, bu grupta gerçekleştirilen hesapların bir kısmında imidazol halkasında yer alması gereken N⁵ hidrojeni karboksil grubuna transfer olmuştur. Bu transfer ile birlikte yapı hesaplamanın gerçekleşmesini istediğimiz formundan çıkmış olmaktadır. Transfer hatasının kullandığımız baz setinden kaynaklandığı kanısındayız. Bu sorunun aşılması için daha gelişmiş olan ve daha fazla hesapsal yük oluşturan baz setleri (aug-cc-pVDZ/aug-cc-pVTZ) ile bir takım hesaplar yapıldı ve iyileşme görüldü. İleriki çalışmalarımızda bu baz setleri ile tekrardan analiz yapılacaktır.

Transfer hatasının oluşmadığı konformerler arasında bir değerlendirme yapacak olursak, elde ettiğimiz en kararlı konformer 02 numaralı yapıdır. Bu yapıda nötral amino grubu imidazol halkasına N⁵ pozisyonundan yaklaşmış ve hidrojen bağı etkileşimi ile halkalı bir yapı oluşmuştur. Yüklü karboksil grubu ise halka düzlemine dik konumlanmıştır. İkinci sırada yer almakta olan 16 numaralı konformerde ise yine amino grubunun imidazol halkasına karbon hidrojeni üzerine yaklaşmıştır. Bu sonuçlara göre halkasal yapı oluşumunun kararlılık için majör faktör olduğunu belirtebiliriz, ancak karboksil grubunun halkaya yaklaşmış formları için anlamlandırılabilir sonuçlar elde edilemediğinden kıyaslama yapmak olanaklı değildir.

3.1.12 HIP_DiCW konformasyon taramaları ve frekans analiz sonuçları

Daha önce bahsettiğimiz, HIP_ZW ve HIP_NW konformasyon taramalarında sırasında oluşan N⁵ hidrojeninin planarlığının bozulması problemi HIP_DiCW grubu içinde gerçekleşti. Çözüm olarak aynı terminal yapısına sahip N³ protone formun konformasyon tarama sonuçları alınarak, imidazol halkasına N⁵ konumundan bir hidrojen eklendi. Elde edilen bu form yüklü imizadol halkasına ve yüklü amino grubuna sahiptir. Bu nedenle molekülün toplam yükü 2’dir. Karboksil grubu nötral durumdadır. Geometri optimizasyonu sonrasında 73 farklı konformerden bazıları aynı yapılara optimize olduklarından, elimizdeki farklı yapı sayısı 19’a düştü.

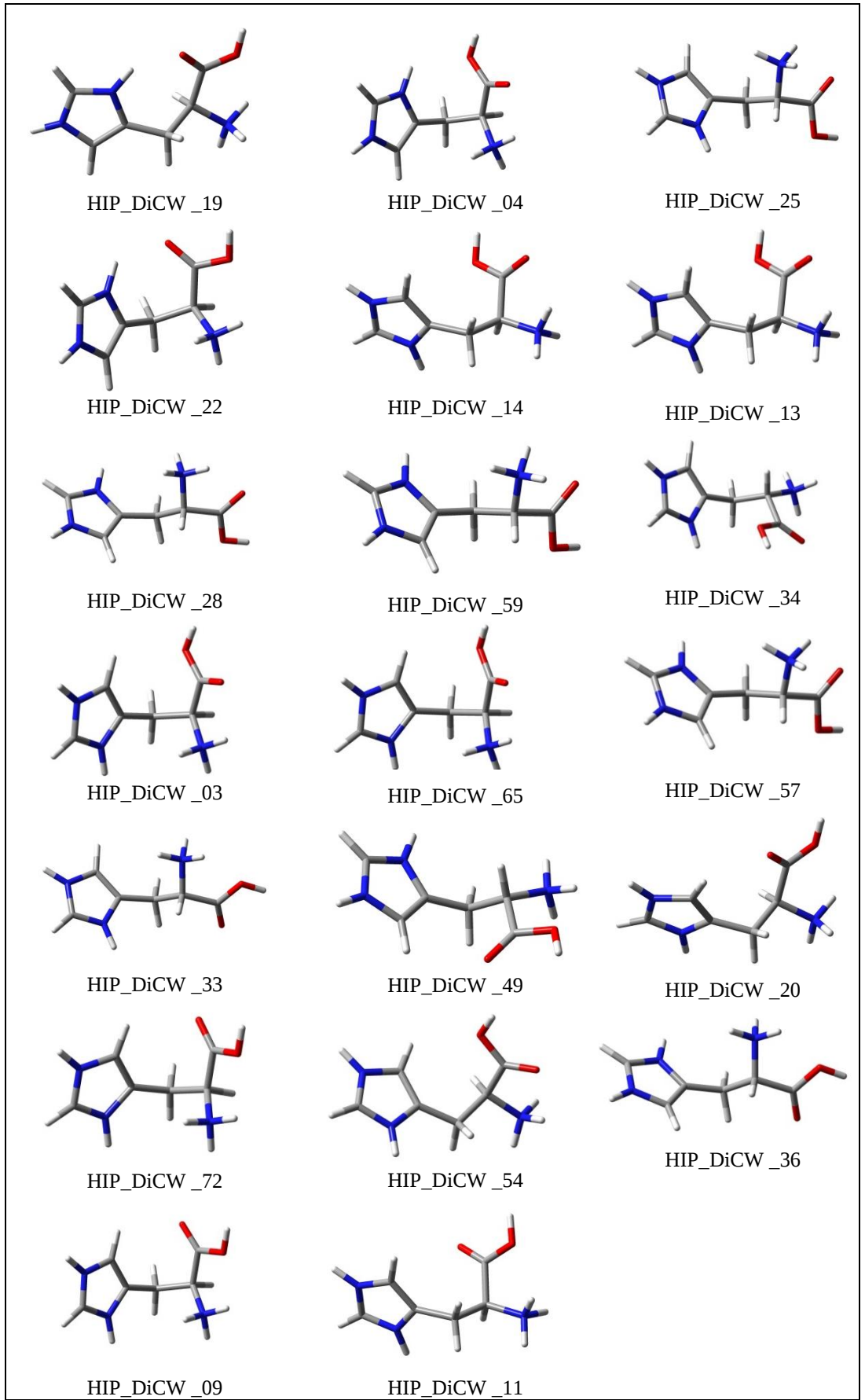
Yüklü gruplar içermesinden ötürü hesaplamaların çözücü etkisi altında yapılması gerekmektedir. Bu etkinin sağlanması için IEF-PCM yöntemi hesaplamalara dahil edildi. Çizelge 3.24 konformerlerin geometri optimizasyonlarına dair sonuçları, Çizelge 3.25 frekans analizine dair sonuçları içermektedir. Hesaplamalar sonunda elde edilen yapılar Şekil 3.13’de kararlılık sıralamalarına göre yer almaktadırlar.

Çizelge 3.24 HIP_DiCW konformasyonları geometri optimizasyon sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif Enerji (Kj/mol)
HIP_DiCW _19	-549,7209993	6,60	0,00
HIP_DiCW _04	-549,7200243	6,03	2,56
HIP_DiCW _22	-549,7195928	7,79	3,69
HIP_DiCW _25	-549,7190340	9,30	5,16
HIP_DiCW _65	-549,7181700	8,26	7,43
HIP_DiCW _03	-549,7181699	8,26	7,43
HIP_DiCW _14	-549,7181430	6,55	7,50
HIP_DiCW _28	-549,7179346	9,56	8,05
HIP_DiCW _34	-549,7178381	5,24	8,30
HIP_DiCW _57	-549,7174053	9,38	9,44
HIP_DiCW _59	-549,7172738	9,66	9,78
HIP_DiCW _33	-549,7170820	10,38	10,28
HIP_DiCW _49	-549,7165549	8,44	11,67
HIP_DiCW _20	-549,7164939	8,09	11,83
HIP_DiCW _72	-549,7162111	9,96	12,57
HIP_DiCW _09	-549,7161639	9,89	12,70
HIP_DiCW _54	-549,7157413	6,39	13,80
HIP_DiCW _36	-549,7156959	11,15	13,92
HIP_DiCW _11	-549,7154107	7,11	14,67

Çizelge 3.25 HIP_DiCW frekans analiz sonuçları

Konformer	Enerji (a.u.)	Zpe+Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)	Rölatif E+Zpe (a.u.)
HIP_DiCW _19	-549.7209993	-549.532407	6.60	0.00
HIP_DiCW _04	-549.7200243	-549.531070	6.03	3.51
HIP_DiCW _25	-549.7190340	-549.530578	9.30	4.80
HIP_DiCW _22	-549.7195928	-549.530391	7.79	5.29
HIP_DiCW _14	-549.7181430	-549.529552	6.55	7.50
HIP_DiCW _28	-549.7179346	-549.529431	9.56	7.81
HIP_DiCW _59	-549.7172738	-549.529250	9.66	8.29
HIP_DiCW _34	-549.7178381	-549.529220	5.24	8.37
HIP_DiCW _03	-549.7181699	-549.528917	8.26	9.16
HIP_DiCW _65	-549.7181700	-549.528912	8.26	9.18
HIP_DiCW _57	-549.7174053	-549.528872	9.38	9.28
HIP_DiCW _33	-549.7170820	-549.528206	10.38	11.03
HIP_DiCW _49	-549.7165549	-549.527521	8.44	12.83
HIP_DiCW _20	-549.7164939	-549.527465	8.09	12.98
HIP_DiCW _72	-549.7162111	-549.527337	9.96	13.31
HIP_DiCW _54	-549.7157413	-549.527125	6.39	13.87
HIP_DiCW _36	-549.7156959	-549.527014	11.15	14.16
HIP_DiCW _09	-549.7161639	-549.526711	9.89	14.95
HIP_DiCW _11	-549.7154107	-549.526605	7.11	15.23



Şekil 3.13 Kararlılık sıralamasına göre HIP DiCW konformerleri

Bu grup için elde edilen sonuçlara bakıldığında genel bir konformasyonel eğilim gözlenmemektedir. İmidazol halkasının ve amino grubunun pozitif yüklü olması ayrıca karboksil grubunun toplamda nötral oluşu nedeniyle imidazol halkası ile terminal etkileşimine diğer gruplara göre az sayıda rastlanmıştır. En kararlı yapı olarak elde ettiğimiz 19 numaralı konformerde karboksil grubunun çift bağlı oksijeni N⁵ azot hidrojeni ile hidrojen bağı oluşturarak halkasal bir yapıya yol açmış, hidroksil grubu oksijeni ile amino grubu arasında oluşan hidrojen bağıda ekstra kararlılık katmıştır. Yapı bütünsel olarak planardır.

İkinci sırada yer alan 04 numaralı konformerde ise karboksil grubu halka ile hidroksil oksijeni ile etkileşime girmiştir. Hidroksil oksijeninin kısmi negatif yükü daha az olduğundan oluşan hidrojen bağı daha zayıftır ve aradaki mesafe 1,92 Å'den 2,32 Å'e çıkmıştır.

25 numaralı üçüncü Sırada bulunan konformerde ise halka ile herhalgi bir etkileşim olmamıştır. Ancak karboksil grubu hem amin grubuyla hemde kiral karbon hidrojeni ile hidrojen bağı oluşturmuş ve imidazol halkasına kısmen paralel konumlanmıştır.

İlginç bir farklılık 19 ve 20 numaralı konformerler birlikte incelendiğinde gözlenmektedir. İmidazol halkasının 180⁰ dönmüş olmasının dışında yapılar oldukça benzerdir. Sonucunda karboksil grubunun çift bağlı oksijeninin halkada etkileşime girdiği hidrojen ve değişmiştir. N⁵ hidrojeni yerinde C² hidrojeni ile etkileşim oluşmuştur ve halkasal yapı bükülmüştür. İki yapı arasındaki enerji farklanması 11,72 Kj/mol'dür.

3.2 Katekol Oksidaz

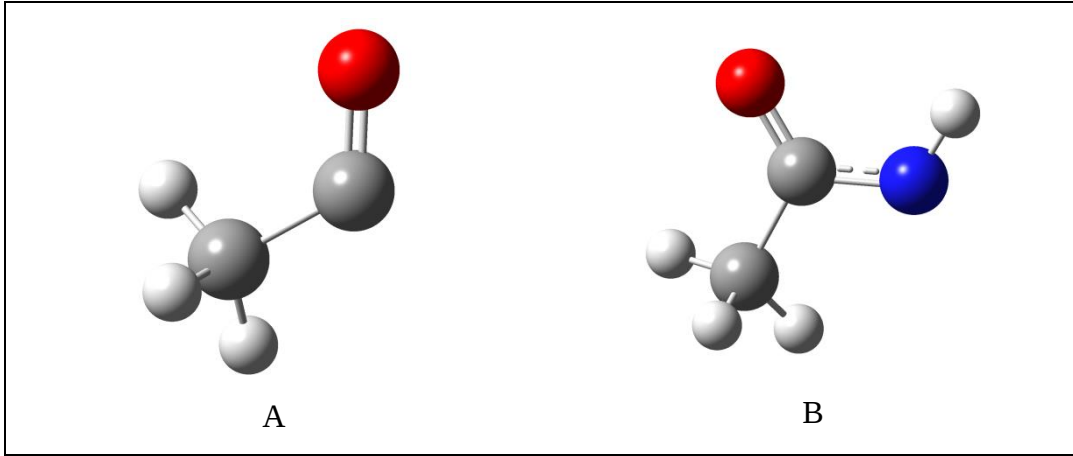
Bu bölümle katekol oksidaz aktif merkezine dair yapılan hazırlık, hesaplama ve değerlendirmeler yer almaktadır. Hesaplamalarda kullanılacak başlangıç yapılarının elde edilmesi amacıyla “www.pdb.org” veri bankasında araştırma yapıldı ve elde edilen geometrilere başlangıç yapıları hazırlandı. Öncelikli olarak daha yüksek hızla sonuç veren yarı-ampirik yöntemler kullanıldı. Çalışmalara bir DFT yöntemi olan B3LYP ile devam edildi. Native ve inhibe formlarda yapılan optimizasyonlar sonrasında, aktif merkezde yer alan bakır atomları mangan atomları ile değiştirilerek hesaplamalar gerçekleştirildi.

3.2.1. Hesaplama Hazırlıkları

PDB veri bankası üzerinde yapılan araştırma sonucu biri native formda diğeri ise feniltiyoüre ile inhibe olmuş formda olan iki yapı elde edildi. 1BT3 pdb koduna sahip native yapı ve 1BUG kodlu inhibe yapı Klabunde ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen ve 1998 yılında yayınlanan çalışma ile literatüre katılmıştır.

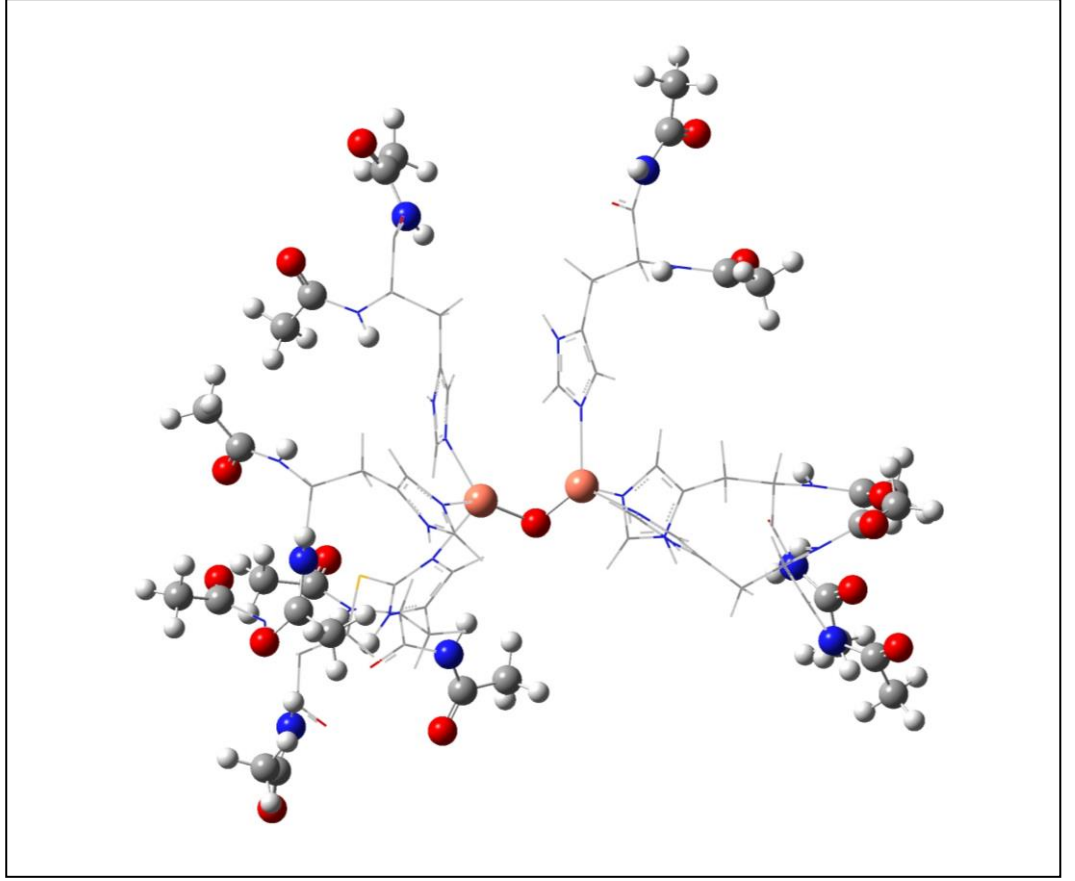
Kullanılacak olan yöntemin enzimin bütünü için uygulanması hesaplama yükü açısından olanaklı olmadığından aktif merkez dışında kalan kısımlar temizlendi. Bu işlemin yapılmasındaki amaç hesapsal yükün azaltılmasıdır.

Aktif merkez dışında yer alan amino asitlerin çıkarılması sonucunda, aktif merkezde yer alan amino asitlerin peptid bağları da koparılmış oldu. Açıkta kalan uçların hesaplamanın sağlıklı gerçekleştirilebilmesi için uniform bir şekilde kapatılması gereklidir. Açıkta kalan karboksil uçları N-asetil ile, amino uçları ise asetil ile bağlanarak uniform yapı elde edildi.



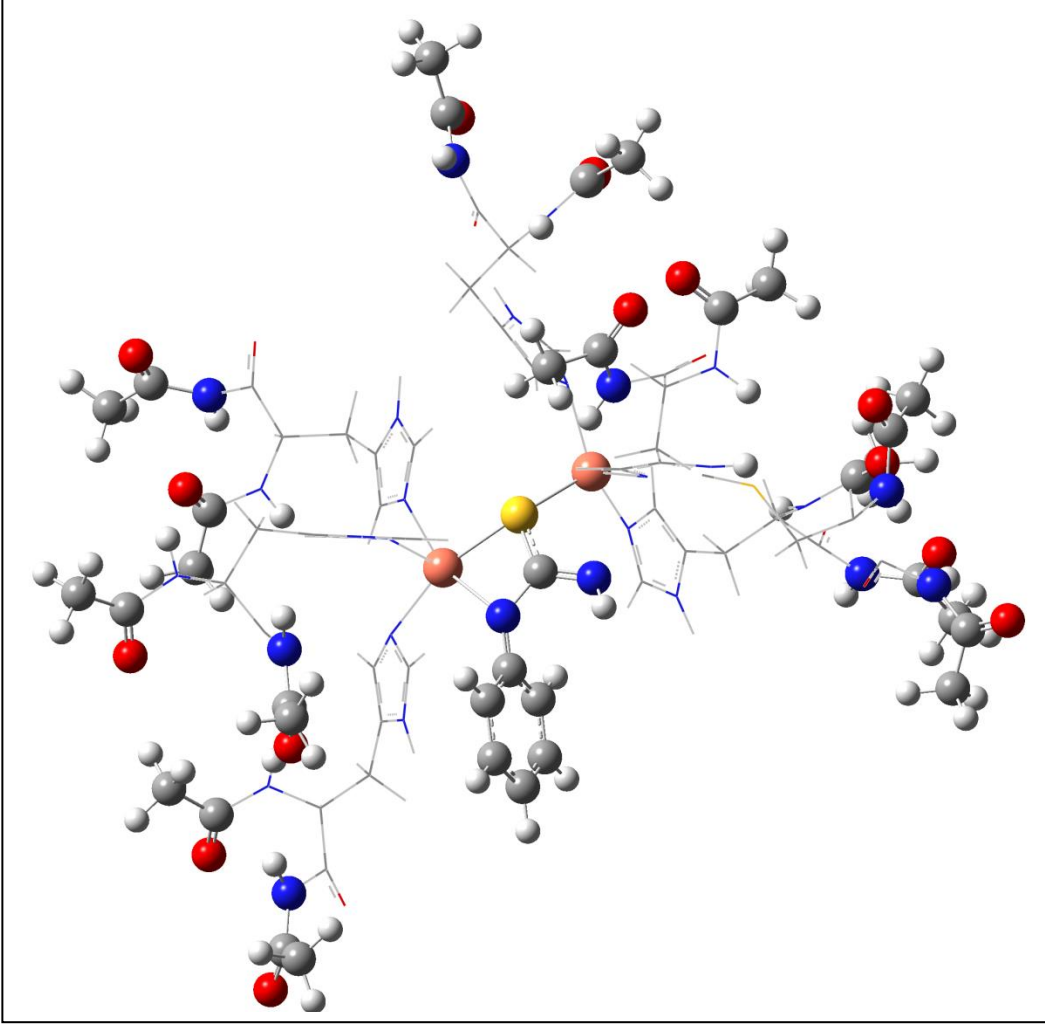
Şekil 3.14 (A) Amino terminal uçlarının kapatılmasında kullanılan asetil, (B) karboksil terminalinin kapatılmasında kullanılan N-asetil.

Terminal uçların kapatılması işlemi için, GaussView programında amino asetil yapısı çizilerek Gaussian programı ile hızlı bir geometri optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen yapıdan amino terminal uçları için asetil, karboksil terminal uçları için ise N-asetil yapısı hazırlandı ve terminal uçlarının kapatılması işlemleri gerçekleştirildi. Şekil 3.15 ve 3.16’da rahatça gözlemnelebilmesi için amino asitlerin kendisi ve kapatıcı uçlar farklı formatta gösterildi.



Şekil 3.15. Hesaplamalar için hazırlanmış native katekol oksidaz aktif merkezi

Aktif merkez özelliklerinin sağlıklı bir şekilde incelenebilmesi ve kıyaslamaların yapılabilmesi için ayrıca inhibitör bağlanmış enzim yapısı ile de hesaplamalar gerçekleştirildi.



Şekil 3.16 Hesaplamalar için hazırlanmış enzim-inhibitör (PTU) kompleksi

3.2.2 Yarı-ampirik katekol oksidaz hesaplamaları

Katekol oksidaz ile gerçekleştirilen ilk hesaplamalar yarı-ampirik yöntemler ile yapıldı. Bu yöntemlerin hesapsal yükleri oldukça düşüktür ve organik yapılar için kısmen başarılıdır. Ancak yeterince doğru sonuç verebilmeleri için hesaplaması yapılan moleküllerin parametrizasyon verileri ile benzer olmaları gerekir.

Hesaplamalara native katekol oksidaz ile yarı-ampirik bir yöntem olan pm6 ile başlandı. Bu yöntem organik yapılar için sıkça kullanılan PM3 yönteminin bazı açılardan geliştirilmiş ve genişletilmiş bir devamıdır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen geometri yapısal olarak oldukça bozuktur ve değerlendirilebilir değildir. Başlangıç geometrisinin yeterince iyi olmamasından kaynaklı başarısız

sonuç elde edilmiş olma ihtimalinden ötürü, yapıyı öncelikle MM-UFF (Universal force field) ile optimize ederek tekrar PM6 yöntemi ile optimizasyon gerçekleştirdik. Ancak tekrardan değerlendirilebilir olmayan sonuçlar elde ettik. Bu sebepten ötürü, PM6 yöntemi ile elde edilen veriler tezde yer almamaktadır.

PM6 bu tip yapılar için başarılı sonuçlar vermediğinin anlaşılmasının ardından yeni yöntem arayışına girildi ve geçiş metalleri için başarılı sonuçlar veren PM3TM yöntemi tespit edilerek çalışmalara bu yöntemle devam edildi. PM3TM yöntemi kullanılarak hem native hemde inhibe yapı için farklı yük ve çok katlılık (multiplicity) değerlerinde hesaplamalar gerçekleştirildi. Ayrıca aktif merkezdeki bakır atomları mangan ile değiştirilerek yapının nasıl değiştiği incelendi.

3.2.2.1 Yarı-ampirik bakır katekol oksidaz hesaplamaları

Hem native hemde inhibe yapı için toplam yükün +2, +3 ve +4 olduğu hesaplamalar gerçekleştirildi. Çizelge 3.25'e bakıldığında enerji ve dipol moment değerleri görülebilir. Çizelge 3.26'da ise aktif merkezdeki bakır atomlarını kordine eden imidazol halkaları ile aralarındaki mesafeler verilmiştir.

Çizelge 3.26 Yarı-ampirik bakır katekol oksidaz enerji ve dipol moment değerleri

Yapısal Durum	Yük- Çok katlılık	Enerji (kJ/mol)	Dipol Moment (Debye)
Native CO	2-1	-2813,57	8,12
Native CO	3-2	-2021,45	9,51
Native CO	4-1	-841,99	18,49
İnhibe CO	2-1	-2703,74	11,69
İnhibe CO	4-1	-695,8	5,46

Native CO 2/1 olarak isimlendirdiğimiz yapı enzimin toplam yükünün 2, çok katlılığın ise 1 (singlet) olduğu formunu temsil etmektedir. Genel anlamıyla yapının tüm elementleri kristal yapıdakine benzer konumlanmıştır. His240 imidazolu kristal yapıda bakırlara planar konumlanmışken optimizasyon sonrasında dik konumlanmıştır ve substrat giriş bölgesinin darlaşmasına neden olmuştur. Yinede bölge substrat girişi için yeterince açık gözükmemektedir. Aktif merkez dışındaki kısımların hesaplamaya dahil edilmediğini ve yapı

stabilizasyonuna katkısının hesaplamada eksik olduğunu düşünürsek, yöntemin native CO 2/1 için genel anlamda başarılı bir sonuç verdiğini belirtmek gerekir. Native 3/2 ve Native 4/1 yapılarında ise geometri kristal yapıya göre oldukça bozulmuştur ve değerlendirilebilir olmaktan oldukça uzaktır. Bununla birlikte Çizelge 3.26 ve 3.27’de görülebileceği gibi koordinasyon mesafeleri arasında ciddi bir değişim gerçekleşmemiştir.

Çizelge 3.27 Yarı-ampirik bakır katekol oksidaz aktif merkez koordinasyon mesafeleri

	His88(N10)	His109(N26)	His118(N36)	His240(N46)	His244(N56)	His274(N66)
	-CuA	-CuA	-CuA	-CuB	-CuB	-CuB
	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)
Native CO 2/1	1,933	1,921	1,914	1,908	1,897	1,893
Native CO 3/2	1,896	1,926	1,945	1,875	1,900	1,887
Native CO 4/1	1,872	1,893	1,876	1,871	1,897	1,869
İnhibe CO 2/1	1,932	1,931	1,938	1,984	1,932	1,896
İnhibe CO 4/1	1,870	1,888	1,898	1,954	1,930	1,893

Kristal yapı ile en kritik farklanma bakırlar arasındaki mesafedir. Kristal yapıda bakırlar arasında 2,82 Å mesafe bulunurken, optimize yapıda bu mesafe Çizelge 3.27’de belirtildiği gibi 3,49 Å’e çıkmıştır. Bu mesafe substratın aktif merkezle etkileşime girme şeklinin belirlenmesinde önemlidir ve tartışmalar kısmında konu üzerinde durulacaktır.

Çizelge 3.28 Native Bakır-Oksijen Mesafeleri

	CuA-O (Å)	CuB-O (Å)	CuA-CuB (Å)
Native CO 2/1	1,890	1,793	3,487
Native CO 3/2	1,876	1,843	3,354
Native CO 4/1	1,850	1,861	3,391

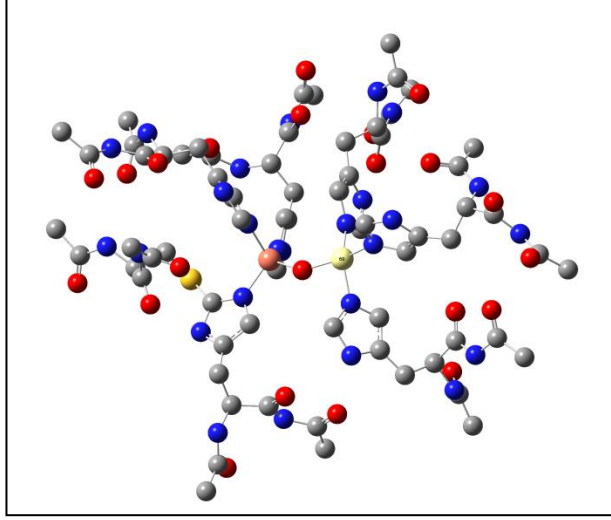
Çizelge 3.29 İnhibe Bakır-Kükürt mesafeleri

	CuA-O (Å)	CuB-O (Å)	CuA-CuB (Å)
İnhibe CO 2/1	2,163	2,163	3,790
İnhibe CO 4/1	2,157	2,188	3,882

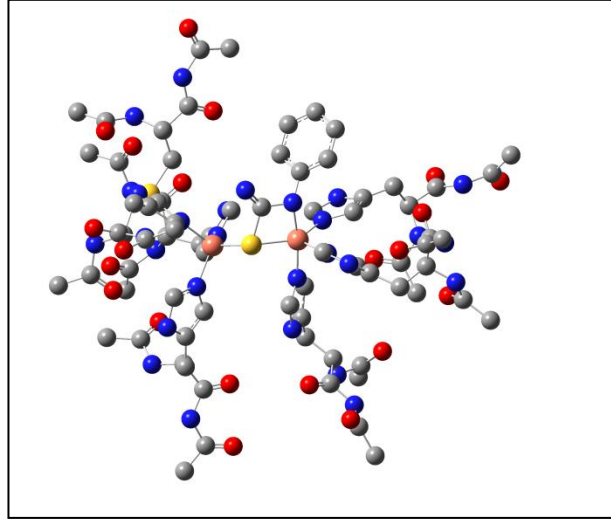
İnhibe yapıların (Katekol Oksidaz-PTU Kompleksi) enerji değerleri native eşdeğerleri ile karşılaştırıldığında, inhibitör bağlanmış enzimin çok daha kararlı olduğu gözlenmektedir. Bu beklenen bir durumdur. İnhibitörler substrattan daha kuvvetli bağlandıkları için enzim inhibisyonunu gerçekleştirebilmektedirler.

Optimize yapılar kristal yapıyla karşılaştırılıp incelendiğinde çok kritik bir genel yapısal farklanma gözlenmemiştir. Native 3/2'nin aksine, inhibisyon bağlanmış form ile toplam yükün “3” olduğu bir optimizasyon gerçekleştirilememiştir. Elde edilen verilerden programın bu form için hiç hesaplama gerçekleştiremediği sonucuna varıldı. Bu noktada yük durumunun olası olup olmadığı veya programın yetersiz kalıp kalmadığı tartışılabilir.

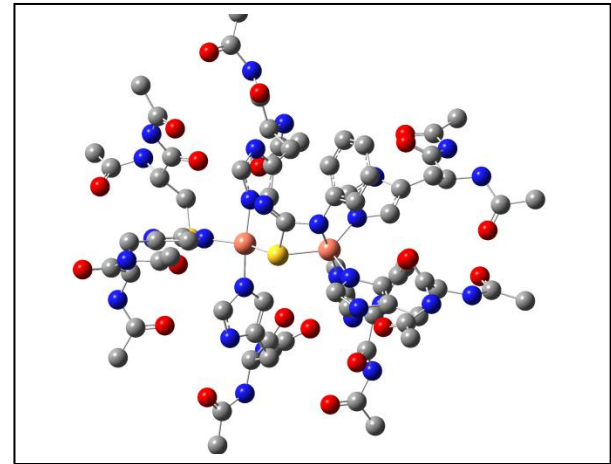
İnhibisyon sırasında PTU bakırları köprüleyen oksijeni yerinden ederek kükürt ile bir köprüleme gerçekleştirmektedir. İnhibisyon ile bakırlar arasındaki ve bakır ile köprüleyici element arasındaki mesafe bir miktar artmaktadır. Kordinasyon histidinleri ile bakırlar arasındaki mesafeler arasında ciddi bir farklanma yoktur.



Şekil 3.17 Optimize native 2/1 bakır katekol oksidaz



Şekil 3.18 Optimize inhibe 2/1 bakır katekol oksidaz



Şekil 3.19 Optimize inhibe 4/1 bakır katekol oksidaz

3.2.2.2 Yarı-ampirik mangan katekol oksidaz

Çeşitli mangan komplekslerinin katekol oksidaz aktivitesi göstermesine dair literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bizde katekol oksidaz aktif merkezinde yer alan bakırları mangan ile değiştirerek yapı üzerinde nasıl bir değişim gerçekleştiğini gözlemlemek istedik. Bu amaçla farklı yük ve çok katlılık değerlerinde hesaplamalar gerçekleştirdik. Ayrıca aktif merkezde yer alan bakırları birer birer mangan ile değiştirerek te hesaplamalar gerçekleştirdik. Çizelge 3.28’de enerji ve dipol değerleri, Çizelge 3.29’da koordinasyon amino asitleri ile metaller arasındaki mesafeleri, Çizelge 3.30’da ise mangan-oksijen mesafelerini görmekteyiz.

Çizelge 3.30 Yarı-ampirik geometri optimizasyonu enerji ve dipol moment değerleri

	Yük ve Çok katlılık	Enerji (Kj/mol)	Dipol Moment (Debye)
Native Mangan	2/1	-3121,45	12,28
Native Mangan	2/3	-3149,29	10,72
Native Mangan	2/5	-3228,59	15,86
Native Mangan	4/1	-1096,9	6,66

Dört farklı formda optimizasyon gerçekleştirmiş olmamıza rağmen, Native Mangan 4/1 yapısı dışında diğer tüm yapılar kristal yapıya göre çok fazla bozulmuştur; değerlendirilebilir değildir. Method kısmında belirttiğimiz gibi yarı-ampirik yöntemlerin başarısı hesaplaması gerçekleştirilen yapının parametrizasyon verileri ile uyumuna bağlıdır.

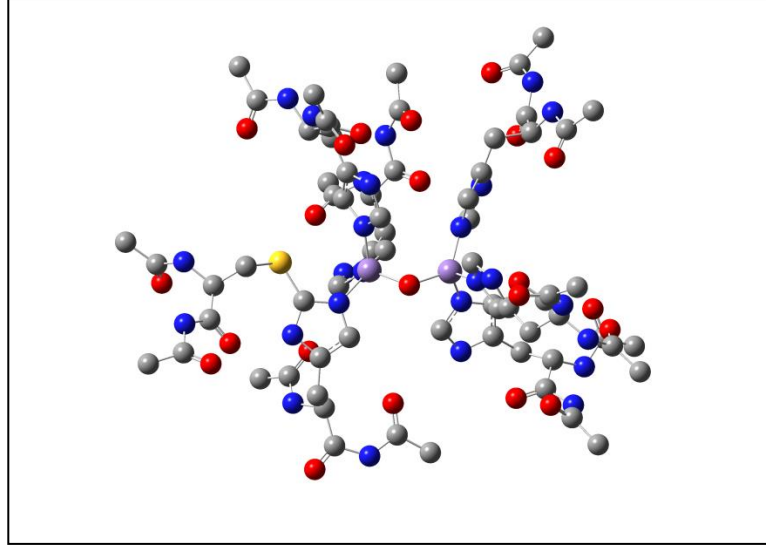
Çizelge 3.31 Histidine-Metal koordinasyon mesafeleri

	His88 (N10)	His109(N26)	His118(N36)	His240(N46)	His244(N56)	His274(N66)
	-MnA	-MnA	-MnA	-MnB	-MnB	-MnB
	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)
MnCO 2/1	1.856	1.908	1.828	1.864	1.833	1.876
MnCO 2/3	1.926	1.948	1.805	1.871	1.846	1.861
MnCO 2/5	1.936	1.947	1.896	2.029	1.853	1.867
MnCO 4/1	1.838	1.841	1.841	1.840	1.848	1.848

Native Mangan 4/1 hesaplamasında başarılı bir geometri elde edilmiştir. Kristal yapı ile kıyaslandığında imidazol halkalarının metallere göre konumlanmasında açısıl ve mesafesel farklanmalar söz konusudur. Koordinasyon mesafeleri azalmıştır. Bu noktada manganın daha kuvvetli bir koordinasyon oluşturduğu sonucuna varılabilir. Yapının yük dağılımı incelendiğinde mangan atomlarının mulliken yüklerinin yaklaşık olarak -0,9 civarında olduğu gözlenmiştir. Yapının geneli incelendiğinde ise pozitif yükün ağırlıklı olarak imidazol halkalarının koordinasyon azotlarında yerleştiği belirlenmiştir. Karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla kristal yapı içinde aynı yük değerlerinde bir hesaplama gerçekleştirilmiştir. Optimize yapılarda koordinasyon azotlarında mulliken yükleri 0,65 civarlarında iken, kristal yapıda 0,45 civarındadır. Bununla birlikte mangan atomlarında optimize yapıda yaklaşık olarak -0,9 olan mulliken yükleri kristal yapıda -0,6 civarındadır.

Çizelge 3.32 Mangan katekol oksidaz metal-oksijen mesafeleri

	MnA-O (Å)	MnB-O (Å)	MnA-MnB (Å)
Native Mn 2/1	2.868	1.684	3.316
Native Mn 2/3	2.364	1.673	3.169
Native Mn 2/5	2.655	1.641	3.286
Native Mn 4/1	1.844	1.838	3.129



Şekil 3.20 Optimize native 4/1 mangan katekol oksidaz

3.2.2.3 Yarı ampirik Mn-Cu Katekol Oksidaz Hesaplamaları

Aktif merkezde yer alan bakır atomlarının ikisinin birden mangan ile değiştirilmesine ek olarak, sadece bir bakırın mangan ile değiştirildiği hesaplamalar gerçekleştirildi ve aralarındaki farklar incelendi. Enerjetik olarak yapılar arasında kayda değer bir fark bulunmamaktadır. Koordinasyon mesafeleri de birbirlerine oldukça yakındır.

Çizelge 3.33 Bakır-Mangan geometri optimizasyonları enerji ve dipol moment değerleri

	Yük/Çok katlılık	Enerji (Kj/mol)	Dipol Moment (Debye)
MnA-CuB	2/1	-3097,49	19,23
CuA-MnB	2/1	-3056,16	19,50

Çizelge 3.34 CuA-MnB Histidin-Metal koordinasyon mesafeleri

	His88(N10)	His109(N26)	His118(N36)	His240(N46)	His244(N56)	His274(N66)
	-MnA (Å)	-MnA (Å)	-MnA (Å)	-MnB (Å)	-MnB (Å)	-MnB (Å)
CuA-MnB 2/1	1,936	1,932	1,903	1,845	1,894	1,857

Çizelge 3.35 MnA-CuB Histidin-Metal koordinasyon mesafeleri

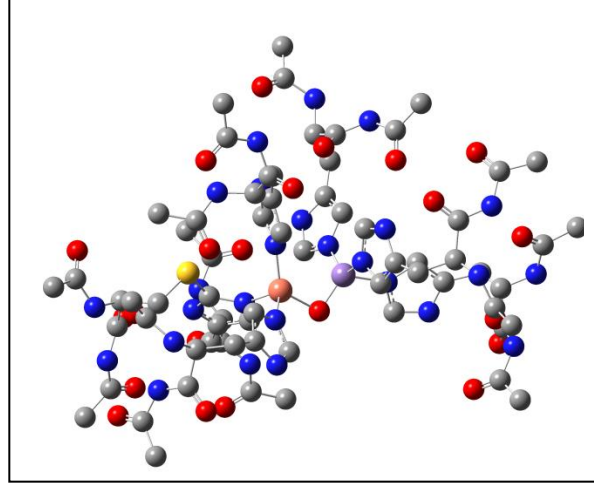
	His88(N10)	His109(N26)	His118(N36)	His240(N46)	His244(N56)	His274(N66)
	-MnA (Å)	-MnA (Å)	-MnA (Å)	-MnB (Å)	-MnB (Å)	-MnB (Å)
MnA-CuB 2/1	1,936	1,932	1,903	1,845	1,893	1,858

Enerji ve koordinasyon uzunluklarında bir değişim gözlenmemiş olmasına rağmen, amino asitlerin yöneliminde ciddi farklanmalar bulunmaktadır. CuA-MnB yapısında His274 metal planar düzlemine yaklaşarak His244 imidazolunun aktif merkezin substrat girişine doğru yönelmesine neden olmuştur. MnA-CuB yapısında ise His109 imidazolu yine aktif merkez girişine yaklaşmıştır. Bu yapısal değişiklikler substratın aktif merkeze girişinin zorlaşmasına veya kolaylaşmasına neden olabilir.

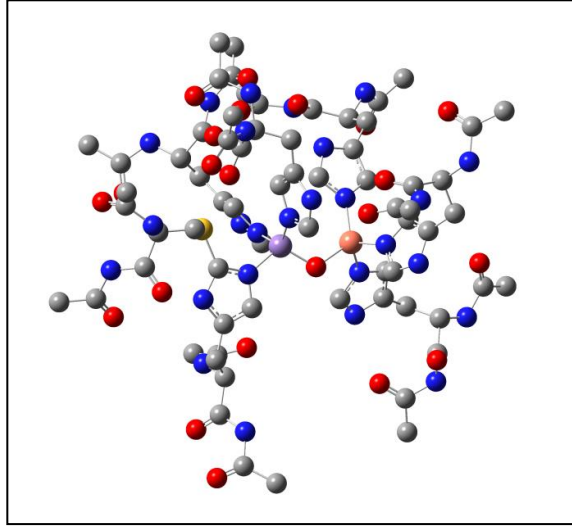
Çizelge 3.36 Bakır-Mangan katekol oksidaz metal-oksijen mesafeleri

	CuA-O (Å)	MnB-O (Å)	CuA-MnB (Å)	CuA-O-MnB (°)
CuA-MnB 2/1	1,914	1,694	2,725	97,95 °
	MnA-O (Å)	CuB-O (Å)	MnA-CuB (Å)	CuB-O-MnA (°)
MnA-CuB 2/1	1,705	1,934	3,102	116,82

İki yapı arasında sayısal olarak gözlemlenebilen en büyük farklılık metaller arasındaki mesafedir. Mesafedeki kısalmanın sebebi Metal-O-Metal açısının CuA-MnB yapısında azalmış olmasıdır.



Şekil 2.21 Optimize CuA-MnB 2/1 katekol oksidaz, aktif merkez



Şekil 3.22 Optimize MnA-CuB 2-1 katekol oksidaz , aktif merkez

3.2.4 B3LYP/Gen katekol oksidaz hesaplamaları

B3LYP biyolojik sistemler için başarılı sonuçlar veren popüler bir yöntemdir. Ancak oksijen bağlanmış geçiş metalleri içeren sistemlerde sorunlar yaşanabilmektedir. Bu nedenle hesaplama doğruluğunun artırılması için yapının farklı bölgeleri için farklı baz setleri kullanıldı. Metal atomları için LANL2DZ (Dunning, 1976) baz seti, kalan tüm diğer atomlar içinse 6-311G** baz seti kullanıldı. Kısaca belirtmek gerekirse 6-311G** baz seti atomik orbitallerin üç bölgeye ayrıldığı ağır atomlar ve hidrojenler için polarizasyon fonksiyonlarını içeren gelişmiş bir baz setidir. Metaller için LANL2DZ kullanılmasının sebebi ise bu baz setinin yalancı potansiyeller (Pseudopotential) kullanıyor olmasıdır. Bu şekilde çekirdeğe çok yakın olan elektronların etkileşime girmediği varsayılır ve hesaplamalara dahil edilmez. Ayrıca başka fonksiyonlar eklenerek oluşan hataların telafisi sağlanır.

B3LYP yöntemi ile birçok farklı yük ve çok katlılık durumları için hesaplamalar başlatılmasına rağmen sadece iki hesaplama tamamlanabildi. Hesaplamaya başlanan geometrilerin yapısal sorunları dışında yapının göreceli olarak büyük olması, yöntemin yüksek hesapsal maliyeti ve bilgisayar sisteminden kaynaklanan hatalar hesaplamaların tamamlanamamasında etken olabilir.

Çizelge 3.37 Native katekol oksidaz geometri optimizasyonu enerji ve dipol moment değerleri

	Yük ve Çok katlılık	Enerji (a.u.)	Dipol Moment (Debye)
Native Bakır	2/1	-6480,3377881	17,42
Native Mangan	2/1	-6295,8666892	12,25

B3LYP yöntemi toplam elektronik enerjiyi hesaplamaktadır. Bu açıdan Çizelge 3.33'de yer alan enerji değerleri daha önceki bölümlerde yer alan PM3TM enerjileri ile kıyaslanmamalıdır. Yapılar genel olarak incelendiğinde mangan içeren yapının kristal yapıya daha benzer olduğu görülmektedir. Native yapıda His240 ve 244 numaralı amino asitlere ait imidazol halkasının konumlanması substrat girişini zorlaştırabilir.

Çizelge 3.38 Native bakır ve mangan katekol oksidaz histidin kordinasyon mesafeleri

	His88	His109	His118	His240	His244	His274
	(N10)	(N26)	(N36)	(N46)	(N56)	(N66)
	-CuA	-CuA	-CuA	-CuB	-CuB	-CuB
	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)
Native CO 2/1	2,034	2,255	2,064	2,223	2,062	2,018
	His88	His109	His118	His240	His244	His274
	(N10)	(N26)-	(N36)	(N46)	(N56)	(N66)
	-MnA	MnA	-MnA	-MnB	-MnB	-MnB
	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)	(Å)
Native MnCO 2/1	2,040	2,065	2,022	2,034	2,090	2,027

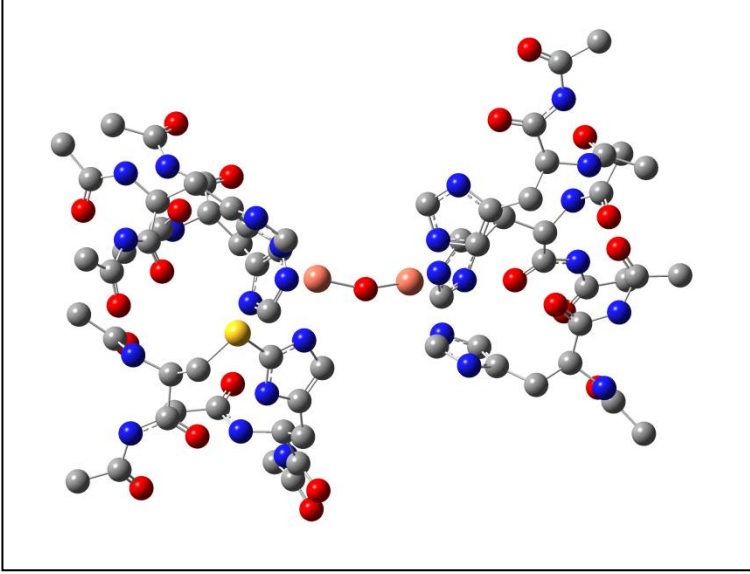
Native MnCO 2/1 molekülünde His109 ve His240 imidazol halkaları ile metaller arasında ki bağ bakır içeren yapıya göre yaklaşık 0,19 Å kısalmıştır. Diğer kordinasyon bağ mesafelerinde ise ufak farklanmalar bulunmaktadır. His109 ve His240 imidazol azotlarına ait mulliken yükleri incelendiğinde karakteristik bir farklanma gözlenmemiştir. Sonuç olarak imidazol halkasının konumlanmasına göre bağ karakteristiğinin değişmekte olduğunu düşünmekteyiz. MnA için mulliken yük değeri 0,819 iken MnB için 0,691 dir. Ayrıca MnA'yı kordine eden imidazol azotlarının mulliken yükleride MnB'den ortalama 0,48 daha negatiftir.

Çizelge 3.39 Native bakır ve mangan katekol oksidaz metal-oksijen mesafeleri

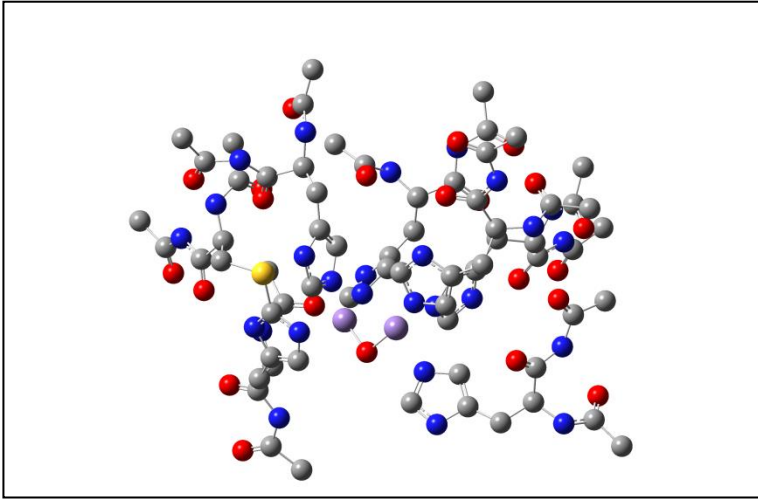
	CuA-O	CuB-O	CuA-CuB
	(Å)	(Å)	(Å)
Native 2/1	1,799	1,792	3,524
	MnA-O	MnB-O	MnA-MnB
	(Å)	(Å)	(Å)
Mn 2/1	1,679	1,834	2,729

Mn 2/1 yapısında metallerin mulliken yüklerinin farklı olmasıyla birlikte oksijen ile aralarındaki bağın mesafeleride farklıdır. MnA MnB'ye göre daha pozitifdir. Dolayısıyla oksijen ile aralarındaki etkileşim daha güçlüdür. Bunun sonucunda bağ mesafesi MnB-O'ya göre daha kısadır. Mn 2/1 yapısında metaller

arasındaki mesafenin native Cu 2/1'e göre daha kısa olmasının sebebi ise Metal-O-Metal açısındaki daralmadır.



Şekil 3.23 Optimize native bakır katekol oksidaz 2/1,aktif merkez (B3LYP)



Şekil 3.24 Optimize native mangan katekol oksidaz 2/1,aktif merkez (B3LYP)

4. TARTIŞMA

Histidin konformer taraması sırasında HID_NV ve HIE_NV formları için diğer formların aksine çok daha yüksek sayıda konformer bulunmuştur. Terminallerin ve imidazol halkasının yüksüz olmasının bu duruma neden olduğunu düşünmekteyiz. Yüklü kısımların sayısının artışıyla birlikte hidrojen bağı oluşma olanakları artmış ve yapı belirli konformerlere yönelmiştir.

Yapılan analiz sonucunda histidin aminoasidinin her bir formunun molekül içi hidrojen bağı oluşturabildiği gözlenmiştir. Bir çok yapıda hem terminallerin birbirleriyle hemde imidazol halkasıyla aynı anda hidrojen bağı oluşturduğu durumlar yaygındır. İmidazol halkası-terminal etkileşimi ile imidazol halkasının yanında ikinci bir halkasal yapı oluşmaktadır. Sonuç olarak histidin aminoasidinin her bir imidazol formunun farklı pH ve yük durumlarında yüksek hidrojen bağı oluşturabilme ve molekül içi hareket kapasitesine sahip olduğu söylenebilir.

Hesaplamalar için kullanılan cc-PVTZ yöntemi genel anlamıyla başarılı sonuçlar vermiştir. Ancak HIP_NW formlarında istenmeyen bir hidrojen transfer problemi gerçekleşti. Bu açıdan yöntemin terminaller arası etkileşim konusunda istenen başarıyı gösteremediği açıktır. Problemin giderilebilmesi amacıyla aug-cc-pVDZ/aug-cc-pVTZ yöntemleriyle hesaplamalar gerçekleştirildi ve hidrojen transfer problemi giderildi. İleri tarihte bu yöntemler ile çalışmalarımızı geliştirmeyi planlamaktayız.

4.1. Katekol oksidaz

Daha önce bahsedildiği üzere hesaplamalarda kullanılan yapı pdb.org veritabanından elde edildi. Bakır atomları ile birlikte aktif merkezde yer alan altı histidin ve bir sistein aminoasitlerini kapsayan yapı enzimin bütününden ayrıldı. Kopan peptit bağlarının hesaplamayı olumsuz etkilemesi için uç kısımlar uniform bir yapıya dönüştürüldü (Bölüm 3.2.1. Hesaplama Hazırlıkları).

Katekol oksidaz aktif merkez ve reaksiyon mekanizması üzerine gerçekleştirilen bir çok çalışma, histidin amino asitlerinin kısmi kullanımı (sadece imidazol halkalarının hesaplamaya dahil edilmesi) veya aktif merkez yapısını taklit eden komplekslerin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara Güell and Siegbahn (2007) ve Martinez et al., (2012) örnek verilebilir. Bu açıdan bu çalışmada kullanılan aktif merkez yapısının kapsamı kritiktir.

Bakırlar arasındaki mesafe, reaksiyonun gerçekleşmesi ve substrat bağlanma modunun belirlenmesi açısından kritiktir (Koval et al. 2006, Martinez et al., 2012). Yapılan çalışmalara (Karlin et al., 1985, Wi et al., 2001) göre optimum katekolaz aktivitesi için metaller arasındaki mesafe 2,9-3,2 aralığında olmalıdır. Martinez'e (2012) göre metaller arasındaki mesafenin artması didentate bağlanmayı engelleyici bir durumdur.

Kristal yapıda bakırlar arasında 2,82 Å mesafe bulunurken, PM3tm yöntemi ile elde edilen optimize yapıda bu mesafe 3,49 Å'e çıkmıştır. Bu mesafe metaller üzerine didentate bağlanmayı desteklemek için yüksek gözükmektedir. PTU-aktif merkez hesaplamalarında ise bu mesafe 3,8 Å'e kadar çıkmıştır. Güell and Siegbahn'da (2007) bu mesafe 4,2 Å olarak bildirilmiştir.

Aktif merkez bakırlarının mangan ile değiştirilerek gerçekleştirilem PM3tm hesaplamalarında metal-imidazol mesafelerinde kısalma gözlenmiştir. Bu açıdan manganın daha kararlı bir kordinasyon gerçekleştirdiği önerilebilir. Ancak bu yöntemde mangan ile elde edilen yapılar kristal yapıya göre çok fazla bozulmuş gözükmemektedir. Ek olarak aktif merkezde yer alan bakırların birer birer mangan ile değiştirildiği hesaplamalar da gerçekleştirildi. Bu yapılar enerjetik olarak kıyaslandığında aralarında belirgin bir farklanma gözükmemektedir. Bununla

birlikte geometrik olarak substrat girişini engelleyebilme olasılığı olan aminoasit yönelmeleri bulunmaktadır, ancak kesin ifade edebilmek için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

B3LYP yöntemi ile yapılan çalışmalarda yapısal ve sistemsel problemlerden dolayı az sayıda hesaplama tamamlanabildi. Bununla birlikte bu yöntemler ile elde edilen veriler ışığında, molekül içi yük dağılımına dair daha net fikirler elde edildi. Optimize bakır CO yapısının incelendiğinde aminoasitlerin merkezden uzak kısımlarının birbirlerinden uzaklaşacak şekilde bir konumlanma gerçekleştirdiği görülmektedir. Kristal yapıya göre oldukça farklı olmasından ötürü, hesaplama öncesi çeşitli geometrik kısıtlamalar yapılması tarafımızca önerilmektedir.

Mangan CO hesaplamasında elde edilen yapı, bütün itibariyle kristal yapıyla daha uyumludur. Metaller arasında mesafe ise $2.8 \text{ \AA}$ 'e düşmüştür. Bu değer reaksiyon aktivitesi için önerilen optimum mesafelerden kısmen düşüktür, ancak reaksiyona engel bir durum olduğunu düşünmemekteyiz. Mangan CO yapısında metaller üzerinde yüklerin farklı dağılmış olmasının monodentate bağlanma için uyumsuz bir durum oluşturuyor olması olasıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ackermann, J., Buchler, S. and Meyer, F.**, 2007, Structure-activity correlations in highly preorganized dicopper catechol oxidase model systems, *Comptes Rendus Chimie*, 10, 421-432.
- Andrew, R. L.**, 2001, Molecular Modelling Principles and Applications. 2nd edition, *Pearson Education*, 744p.
- Bassan, A., Borowski, T. and Siegbahn, P.E.M.**, 2004, Quantum chemical studies of dioxygen activation by mononuclear non-heme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad, *Dalton Transactions*, 3153–3162.
- Belle, C., Selmeczi, K., Torelli, S. and Pierre, J-L.**, 2007, Chemical tools for mechanistic studies related to catechol oxidase activity, *Comptes Rendus Chimie*, 10, 271- 283.
- ChembridgeSoft Corporation**, 2009, ChemBioOffice Ultra, 2010.
- Donald W. Rogers**, 2003, Computational Chemistry Using the PC, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 349p.
- Dunning, T.H. Jr. and Hay, P. J.**, 1976, Modern Theoretical Chemistry, Ed. H. F. Schaefer III, Plenum, New York, 1-28.
- Eicken, C., Krebs, B. and Sacchettini, J.C.**, 1999, Catechol oxidase — structure and activity, *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 677–683.
- Frisch, E., Hratchian, H.P., Dennington II, R. D., Keith, T. A., Millam, J., Nielsen A. B., Holder, A. J. and Hiscocks J.**, 2009, GaussView 5 Reference, *Gaussian, Inc., Wallingford CT*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. and Fox, D. J., 2010, Gaussian 09, Revision B.01, *Gaussian, Inc., Wallingford CT*.

Gentshev, P., Möller, N. and Krebs, B., 2000, New functional models for catechol oxidases, *Inorganica Chimica Acta*, 300 – 302, 442 – 452.

Gerdemann, C., Eicken, C. and Krebs, B., 2002, The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins, *Accounts of Chemical Research*, 35, 183-191.

Güell, M. and Siegbahn, P.E.M., 2007, Theoretical study of the catalytic mechanism of catechol oxidase, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12:1251–1264.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gonzalez-Alvarez, M., Alzuet, G., Borrás, J., Garcia-Granda, S. and Montejo-Bernardo, J.M.**, 2003, Structural and functional models for the dinuclear copper active site in catechol oxidases synthesis, x-ray crystal structures, magnetic and spectroscopic properties of m-methoxo-bridged dinuclear copper(II) complexes with N-substituted sulfonamide ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96, 443–451.
- Hass, M.A.S., Hansen, D.F., Christensen, H.E.M., Led, J.J. and Kay, L.E.** 2008, Characterization of conformational exchange of a histidine side chain: protonation, rotamerization, and tautomerization of his61 in plastocyanin from *anabaena variabilis*, *Journal of the American Chemical Society*, 130 , 8460–8470.
- Kao, C-H., Wei, H.-H., Liu, Y.-H., Lee, G.-H., Wang, Y. and Lee, C.-J.**, 2001, Structural correlation of catecholase-like activities of oxy-bridged dinuclear copper(II) complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 84, 171-178.
- Karlin, K.D., Gultneh, Y., Nicholson, T. and Zubieta, J.**, 1985, Catecholate coordination to copper: structural characterization of a tetrachloro-o-catecholate-bridged dicopper(II) complex as a model for intermediates in copper-catalyzed oxidation of catechols, *Inorganic Chemistry*, 24, 3725-3727.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. and Krebs, B.**, 1998, Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center, *Nature Structural Biology*, 5(12), 1084-1090.
- Kopple, J.D. and Swendseid, M.E.**, 1975, Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man, *The Journal of Clinical Investigation*, 55, 881-891.
- Koval, I.A., Gamez, P., Belle, C., Selmeçzib, K. and Reedijk, J.**, 2006, Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies, *Chemical Society Reviews*, 35, 814–840.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kruse, H., Goerigk, L. and Grimme, S., 2012, Why the standard B3LYP/6-31G* model chemistry should not be used in DFT calculations of molecular thermochemistry: understanding and correcting the problem, *The Journal of Organic Chemistry*, 77, 10824 – 10834.

Martínez, A., Membrillo, I., Ugalde-Saldívar, V.M., Gasque, L., 2012, Dinuclear copper complexes with imidazole derivative ligands: theoretical study related to catechol oxidase activity, *The Journal Of Physical Chemistry*, 116, 8038 – 8044.

McGuirl, M.A. and Dooley, D.M.,1999, Copper-containing oxidases, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 138-144.

Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2008, Lehninger Principles of Biochemistry, W.H. Freeman and Company, 1158p.

Ohlinger, W. S. and Hehre, W. J., 2007, Spartan'08, Irvine, CA:Wavefunction, Inc

Paier, J., Marsman, M. and Kresse, G., 2007, Why does the B3LYP hybrid functional fail for metals?, *The Journal of Chemical Physics*, 127(2), 024103.

Penalver, M.J., Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Molina, F., Varon, R. And Garcia-Canovas, F., 2005, Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase, *Journal of Molecular Catalysis B*, 33, 35–42.

Ramachandran, K.I , Deepa, G. and Namboori, K., 2008, Computational Chemistry and Molecular Modeling Principles and Applications, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 397p.

Rosenzweig, A.C. and Sazinsky, M.H., 2006, Structural insights into dioxygen-activating copper enzymes, *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 729–735.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Saito, T., Kataoka, Y., Nakanishi, Y., Matsui, T., Kitagawa, Y., Kawakami, T., Okumura, M. and Yamaguchi, K., 2009, Theoretical studies on chemical bonding between Cu(II) and oxygen molecule in type 3 copper proteins, *International Journal of Quantum Chemistry*, 109, 3649–3658.

Siegbahn, P.E.M., 2004, The catalytic cycle of catechol oxidase, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9, 577–590.

Siegbahn, P.E.M. and Borowski, T., 2006, Modeling enzymatic reactions involving transition metals, *Accounts of Chemical Research*, 39(10), 729-738.

Schneebeli, S.T., Bochevarov, A.D. and Friesner, R.A., 2011, Parameterization of a B3LYP specific correction for non-covalent interactions and basis set superposition error on a gigantic dataset of CCSD(T) quality non-covalent interaction energies, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(3), 658–668.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M. and Machonkin, T.E., 1996, Multicopper oxidases and oxygenases, *Chemical Reviews*, 96, 2563–2605.

Swanson, T.A., Kim, S.I., and Glucksman, M.J., Biochemistry Molecular Biology & Genetics, 2010 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 398p.

Uranga, J., Mikulskis, P., Genheden, S. and Ryde, U., 2012, Can the protonation state of histidine residues be determined from molecular dynamics simulations, *Computational and Theoretical Chemistry*, 1000, 75–84.

Wang, L., Sun, N., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D.R., 2006, A histidine/tryptophan π -stacking interaction stabilizes the heme-independent folding core of microsomal apocytochrome b5 relative to that of mitochondrial apocytochrome b5, *Biochemistry*, 45, 13750-13759.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wikipedia.org, 2013, Histidine, <http://en.wikipedia.org/wiki/Histidine>

Wikipedia.org, 2013, Density Functional Theory, http://en.wikipedia.org/wiki/Density_functional_theory

Yoon, J., Fujii, S. and Solomon, E.I., 2009, Geometric and electronic structure differences between the type 3 copper sites of the multicopper oxidases and hemocyanin/tyrosinase, Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(16), 6585– 6590.

ÖZGEÇMİŞ

Ad/Soyad: Enis ÜNAL

Doğum Yeri/Tarihi: Bandırma/01.09.1986

Uyruğu: T.C

Cinsiyet: Erkek

Medeni Hali: Bekar

Adres: Kazımdirik mah. 153 sokak no:55/2.

e-mail: enisunal@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2005-2010)

Yüksek Lisans,: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya A.B.D.
(2010-2013)