



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FLAVOENZİMLERDEKİ FLAVİN OKSİDASYONU MEKANİZMASININ HESAPSAL MODELLENMESİ

İLKE DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FLAVOENZİMLEDKİ FLAVİN OKSİDASYONU MEKANİZMASININ HESAPSAL MODELLENMESİ

İLKE DEMİR
(520815001)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2017



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



COMPUTATIONAL MODELLING OF THE FLAVIN OXIDATION MECHANISM IN FLAVOENZYMES

İLKE DEMİR
(520815001)

MASTER THESIS
Department of Chemistry

Thesis Supervisor
Prof.Dr.Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek her türlü desteği ile bana yardımcı olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Safiye ERDEM'e ,

Hayatım boyunca karşılıksız sevgileri ile maddi ve manevi her türlü konuda arkamda duran, beni bu günlere getiren sevgili aileme,

Görüş ve düşünceleri ile fikir alışverişinde bulunduğum, Marmara Üniversitesi hesaplamalı organik kimya laboratuvarında güzel günler geçirdiğim sevgili arkadaşlarıma,

FEN-C-YLP-090217-0064 nolu proje desteği için Marmara Üniversitesi BAPKO birimine teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2017

İlke DEMİR

İÇİNDEKİLER

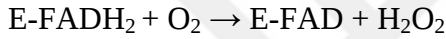
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
YENİLİK BEYANI	viii
SEMBOLLER.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	2
1.2.1. Flavoproteinler.....	2
1.2.1.1. Flavin koenzimleri.....	4
1.2.1.2. Redoks reaksiyonlarında flavinler.....	6
1.2.1.3. Net redoks değişimi olmayan reaksiyonlarda flavinler	7
1.2.1.4. Işık emisyonu ve diğer reaksiyonlara giren flavinler	8
1.2.2. Moleküler oksijen ve flavin ile reaksiyonları	8
1.2.2.1. Moleküler oksijen.....	8
1.2.2.2. Reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres.....	9
1.2.2.3. Flavinin oksijenle reaksiyonları	11
1.2.3. Literatürdeki çalışmalar ve önerilen mekanizmalar	11
2. MATERYAL VE YÖNTEM	22
2.1. Kullanılan Materyaller	22
2.2. Kullanılan Yöntem	22
2.2.1. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (YFT)	22
2.2.2. Açık kabuk ve kapalı kabuk hesaplamaları	23
2.2.3. Potansiyel enerji yüzeyi ve geometri optimizasyonları.....	24

2.2.4. IRC (İçsel Reaksiyon Koordinatı) Hesaplamaları.....	26
2.2.5. İzlenen Çalışma Planı.....	27
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
3.1. Flavinin <i>Re</i> -yüzünden Modellenen Mekanizmalar	28
3.1.1. <i>Re</i> -yüzünden 1. Mekanizma (M1).....	28
3.1.2. <i>Re</i> -yüzünden 2. Mekanizma (M2).....	32
3.1.3. <i>Re</i> -yüzünden 3. Mekanizma (M3).....	36
3.1.4. <i>Re</i> -yüzünden 4. Mekanizma (M4).....	41
3.2. Flavinin <i>Si</i> -yüzünden Modellenen Mekanizmalar.....	45
3.2.1. <i>Si</i> -yüzünden 1. Mekanizma (M5).....	45
3.2.2. <i>Si</i> -yüzünden 2. Mekanizma (M6)	48
3.2.3. <i>Si</i> -yüzünden 3. Mekanizma (M7).....	51
3.3. Üç Mekanizmalı Spin Dönüşümlü FAD Yükseltgenmesi.....	54
4. GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ÖZET

FLAVOENZİMLERDEKİ FLAVİN OKSİDASYONU MEKANİZMASININ HESAPSAL MODELLENMESİ

Flavoproteinler vücutta indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları, moleküler oksijenin aktivasyonu, ışık emisyonu, fotosentez, bitki fototropizması, DNA tamiri ve biyolojik saatin ayarlanması gibi birçok önemli kimyasal reaksiyonu katalizleyen, aktif bölgelerinde riboflavin bulunduran enzimlerdir. Riboflavin enzimin aktif bölgesinde flavin adenin dinükleotit (FAD) ve flavin mononükleotit (FMN) olarak bulunabilir. Flavoproteinlerde çeşitli enzim mekanizmaları sonucu kataliz sırasında FAD indirgenmektedir. İndirgenmiş flavin aşağıdaki reaksiyona göre moleküler oksijenle reaksiyona girerek tekrar oksitlenir ve enzim tekrar aktif hale gelir.



Reaksiyon sonunda oluşan hidrojenperoksit bir reaktif oksijen türüdür ve oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres, hücre yaşlanmasına hatta hücre ölümüne sebep olabilecek önemli bir sorundur. Bu nedenle reaksiyonun aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Literatürde flavinin reaksidasyon mekanizması bazı enzimlerle çalışılmıştır ve son yıllarda söz konusu reaksiyon ile ilgili çalışmalar hızla artmaktadır.

Bu tez çalışmasında herhangi bir enzime bağlı kalmadan flavinin tam indirgenmiş formu (FADH₂) ve moleküler oksijen arasındaki reaksiyon modellenmiştir. Önerilen mekanizmalardaki tüm yapılar gaz fazında, yoğunluk fonksiyoneli teorisi (YFT) M06-2X/6-31+G(d,p) ve UM06-2X/6-31+G(d,p) yöntemi ile optimize edilmiştir ve Gibbs serbest enerjileri hesaplanmıştır. Relatif enerjiler ve optimize yapılar potansiyel enerji yüzeyinde gösterilmiştir. Flavinin *si* ve *re*-yüzünden triplet, singlet ve açık kabuk singlet olmak üzere yedi mekanizma modellenmiştir. Daha sonra *re*-yüzünden modellenen üç mekanizma spin dönüşüm noktası olup olmadığı araştırılmak üzere aynı potansiyel enerji yüzeyinde çakıştırılmıştır. Önerdiğimiz mekanizmaya göre açık kabuk enerji yüzeyinde FADH....OOH biradikal araürünü oluştuktan sonra triplet-singlet spin dönüşüm noktası gözlenmiştir. Reaksiyon triplet FAD....O₂ kompleksiyle başlayarak triplet FADH....OOH radikal ara ürününü oluşturur ve bu ara ürün açık kabuk singlet biradikal hale geçer. Daha sonra açık kabuk singlet biradikal enerji yüzeyi ile kapalı

kabuk singlet enerji yüzeyi çakışarak kovalent bağlı, kararlı FADH-OOH ara ürünü oluşur. Reaksiyon 25.2 kkal/mol aktivasyon enerjili hız belirleme adımında OOH'ın FADH'tan hidrojeni almasıyla biter. Sonuç olarak bizim önerdiğimiz mekanizma bu reaksiyonun herhangi bir enzim olmadan da gerçekleşebileceğini kanıtlamaktadır. Bu mekanizmanın detaylarının anlaşılması oksidatif stres ve nörodejenerasyon hakkında gelecekteki terapötik yaklaşımların tasarımına yardımcı olabilir.



ABSTRACT

COMPUTATIONAL MODELLING OF THE FLAVIN OXIDATION MECHANISM IN FLAVOENZYMES

Flavoproteins are enzymes that contain riboflavin in their active sites and catalyze very important reactions in the living systems such as oxidation-reduction reactions, activation of molecular oxygen, light emission, photosynthesis, phototrophism, DNA repair and circadian rhythm regulation. Riboflavin can be found in the active sites of flavoproteins as flavin adenin dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN). As a result of various enzyme mechanisms in the flavoproteins, FAD is reduced during the catalysis. Reduced flavin is reoxidized by reacting with molecular oxygen according to the following reaction and the enzyme becomes active again.



Hydrogen peroxide formed at the end of the reaction is a reactive oxygen species which causes oxidative stress. Oxidative stress is an important problem that can lead to cell damage and even cell death. For this reason, elucidating the mechanism of this reaction is very important. The mechanism of flavin reoxidation in several enzymes has been studied in the literature and studies about this reaction are increasing rapidly in recent years.

In this study, the reaction between fully reduced form of flavin (FADH₂) and molecular oxygen is modeled in gas phase regardless of any enzyme. All the structures in proposed mechanisms were optimized with the density functional theory (DFT) M06-2X/6-31+G(d,p) and UM06-2X/6-31+G(d,p) method and Gibbs free energies were calculated. Relative energies and optimized structures were shown on the potential energy surfaces. Seven mechanisms have been modeled on flavin *si* and *re*-faces as triplet, singlet and singlet biradical. Since this reaction involves a spin-forbidden change from triplet to singlet, three of the mechanisms modelled on *re*-face were superposed on the same potential energy surface to search for the possibility of any spin-crossing point. We propose that a triplet-singlet spin crossing point has been observed in the open shell potential energy surface after the formation of FADH....OOH biradical intermediate. Reaction starts with triplet FAD....O₂ complex which is converted to

triplet FADH...OOH intermediate and then it crosses with open shell singlet state somewhere near the singlet FADH...OOH biradical intermediate. Afterwards, the open shell singlet surface crosses with the closed shell surface and the stable FADH-OOH covalent intermediate forms. The reaction is finalized at the rate-determining step with 25.2 kcal/mol activation energy while OOH abstracts the second hydrogen from FADH. As a result, our proposed mechanism confirms that this reaction can even occur nonenzymatically. Understanding the details of the mechanism may help to design future therapeutic approaches about oxidative stress and neurodegeneration.

YENİLİK BEYANI

Literatürde flavoproteinlerdeki indirgenmiş flavinin geri oksidasyonu reaksiyonu için hesapsal olarak çalışılmış sınırlı sayıda kaynak mevcuttur. Bu konudaki çalışmalar glikoz oksidaz, monoamin oksidaz, aril-alkol oksidaz, pirozinaz 2-oksidad, p-hidroksifenilasetat 3-hidroksilaz gibi belirli enzimlerle kısıtlıdır. Hesaplamalar genellikle enzimin re-yüzünden flavinin yarı indirgenmiş formu (FADH^-) ile yapılmış olup tepkimenin tüm basamaklarını kapsamamaktadır. Söz konusu çalışmalara rağmen bu reaksiyonun mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında ise, literatürden farklı olarak herhangi bir enzime bağlı kalmadan, sadece flavinin tümüyle indirgenmiş formu (FADH_2) ve moleküler oksijen arasındaki mekanizma ilk kez tüm basamaklarıyla detaylı olarak modellenmiştir. Çeşitli mekanizmalar için kapalı kabuk singlet, açık kabuk triplet ve singlet biradikal potansiyel enerji yüzeyleri elde edilmiştir. Flavinin *si*-yüzünden de singlet ve triplet olmak üzere üç mekanizma modellenmiş ve bu mekanizmalar detaylı olarak incelenmiştir. Sonuç olarak flavinin re-yüzünden enzimsiz gerçekleşebilen, oda şartlarında olası, üç-mekanizmalı spin-dönüşümlü bir mekanizma önerilmiştir.

Aralık, 2017

Prof.Dr. Safiye ERDEM

İlke DEMİR

SEMBOLLER

E	: Enerji
G	: Gibbs Serbest Enerjisi
ΔG	: Reaksiyon serbest enerjisi değişimi
$\text{\AA}$	: Angstrom
S	: Spin
ρ	: Elektron Yoğunluğu
α	: Alfa Spin Orbitali
β	: Beta Spin Orbitali

KISALTMALAR

AAO	: Aril-alkol Oksidaz
Asn	: Asparjin
C₂	: p-Hidroksifenilasetat 3-Hidroksilaz enziminin oksijenaz parçası
CoA	: Koenzim A
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
FADH⁻	: Flavin Semikinon Formu
FADH₂	: Flavin İndirgenmiş Formu
FMN	: Flavin Mononükleotit
GOX	: Glikoz Oksidaz
His	: Histidin
HPAH	: p-Hidroksifenilasetat-3-Hidroksilaz
IRC	: İçsel Reaksiyon Koordinatı
LF	: Lumiflavin
Lys	: Lisin
M1	: Mekanizma 1
M2	: Mekanizma 2
M3	: Mekanizma 3
M4	: Mekanizma 4
M5	: Mekanizma 5
M6	: Mekanizma 6
M7	: Mekanizma 7
MAO B	: Monoaminoksidaz B
NADP⁺	: Yükseltgenmiş Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
P2O	: Piranoz 2-oksidad

PDB	: Protein Data Bank
PES	: Potansiyel Enerji Yüzeyi
PHBH	: p-Hidroksibenzoat Hidroksilaz
RF	: Riboflavin
RHF	: Kısıtlanmış Hartree-Fock
ROT	: Reaktif Oksijen Bileşiğı
Thr	: Treonin
UHF	: Kısıtlanmamış Hartree-Fock
UYFT	: Kısıtlanmamış Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi
YFT	: Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Lumiflavin, (RF) Riboflavin, (FMN) Flavin Mononükleotit, (FAD) Flavin adenin dinükleotit.....	3
Şekil1.2. İzalloksazin halkasının okside, semikinon ve indirgenmiş formları.....	5
Şekil 1.3. (a) FAD düzlemsel, (b) FADH ₂ eğik.....	6
Şekil 1.4. Hücredeki reaktif bileşikler ve antioksidan dengesi.....	10
Şekil 1.5. Moleküler oksijen ve indirgenmiş flavin moleküler orbitallerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 1.6. GOX'un H ₂ O ₂ oluşumundaki optimize edilmiş geçiş konumu.....	15
Şekil 1.7. MAO B'nin H ₂ O ₂ oluşum mekanizmasındaki geçiş konumu yapısı.....	16
Şekil 1.8. Reaksiyona giren triplet kompleks protonlanmış histidinden proton alındıktan sonra oluşan triplet ara ürün, reaksiyon sonucu spin dönüşümüyle oluşan FAD ve H ₂ O ₂	17
Şekil 1.9. AAO için önerilen FAD oksidasyonu mekanizması.....	17
Şekil 1.10. P2O için önerilen mekanizma.....	19
Şekil 1.11. C2 için önerilen mekanizma.....	20
Şekil 1.12. (a) Monooksijenazlar için önerilen mekanizma, (b) Oksidazlar için önerilen mekanizma, c) HPAH için önerilen mekanizma.....	21
Şekil 2.1. Kapalı kabuk ve açık kabuk moleküler orbitallerin şematik olarak gösterimi.....	24
Şekil 2.2. (a) İki boyutlu potansiyel enerji yüzeyi, (b) Üç boyutlu potansiyel enerji yüzeyi.....	25
Şekil 2.3. Gaussian programında hesaplanan bir IRC grafiği örneği.....	26
Şekil 3.1. Re-yüzünden 1. Mekanizma.....	29
Şekil 3.2. Re-yüzünden 1. Mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).....	30

Şekil 3.3. <i>Re-yüzünden 1. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....</i>	31
Şekil 3.4. <i>Re-yüzünden 2. Mekanizma.....</i>	32
Şekil 3.5. <i>Re-yüzünden 2. Mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).....</i>	34
Şekil 3.6. <i>Re-yüzünden 2. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....</i>	35
Şekil 3.7. <i>Re-yüzünden 2. mekanizmaya ait spin yoğunluğu değişim grafiği.....</i>	36
Şekil 3.8. <i>Re-yüzünden 3. Mekanizma.....</i>	37
Şekil 3.9. <i>Re-yüzünden 3. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).....</i>	38
Şekil 3.10. <i>Re-yüzünden 3. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....</i>	39
Şekil 3.11. <i>Re-yüzünden 3. mekanizmaya ait spin yoğunluğu değişim grafiği.....</i>	40
Şekil 3.12. <i>Re-yüzünden 4. Mekanizma.....</i>	41
Şekil 3.13. <i>Re-yüzünden 4. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).....</i>	43
Şekil 3.14. <i>Re-yüzünden 4. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....</i>	44
Şekil 3.15. <i>Si-yüzünden 1. Mekanizma.....</i>	45
Şekil 3.16. <i>Si-yüzünden 1. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol)</i>	46
Şekil 3.17. <i>Si-yüzünden 1. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....</i>	47
Şekil 3.18. <i>Si-yüzünden 2. mekanizma.....</i>	48
Şekil 3.19. <i>Si-yüzünden 2. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).....</i>	50

Şekil 3.20. Si-yüzünden 2. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O_2) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....	50
Şekil 3.21. Si-yüzünden 3. mekanizma.....	51
Şekil 3.22. Si-yüzünden 3. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kcal/mol).....	52
Şekil 3.23. Si-yüzünden 3. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O_2) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.....	53
Şekil 3.24. Mekanizmaların çakıştırılmış potansiyel enerji yüzeyleri.....	55



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Re-yüzünden 1. Mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	29
Tablo 3.2. Re-yüzünden 2. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	33
Tablo 3.3. Re-yüzünden 3. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	37
Tablo 3.4. Re-yüzünden 4. mekanizma yapılarının M06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	42
Tablo 3.5. Si-yüzünden 1. mekanizma yapılarının M06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	46
Tablo 3.6. Si-yüzünden 2. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	49
Tablo 3.7. Si-yüzünden 3. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.....	52

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Flavoproteinler vücutta birçok önemli kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayan aktif bölgelerinde riboflavin bulunduran enzimlerdir (Massey, 2000; Mack ve Grill, 2006). Riboflavin enzimin aktif bölgesinde flavin adenin dinükleotit (FAD) ve flavin mononükleotit (FMN) olarak bulunabilir. Flavınların vücuttaki indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlemesi FAD yapısındaki izoalloksazin halkasının yüksek konjugasyon özelliği sayesinde gerçekleşir (Abbas ve Sibirny, 2011; Macheroux ve ark., 2011). Flavının üç tane oksidasyon formu vardır. Bunlar okside formu (FAD), semikinon formu (FADH⁻) ve indirgenmiş formudur (FADH₂) (Silverman ve Holladay, 2014).

$E-FADH_2 + O_2 \rightarrow E-FAD + H_2O_2$ flavoproteinlerdeki bu reaksiyon çeşitli enzim mekanizmaları sonucu oluşan indirgenmiş flavinin moleküler oksijenle reaksiyona girerek tekrar oksitlenmesi reaksiyonudur. Bu reaksiyon bütün flavoproteinlerin çalışma mekanizmalarındaki son adımdır. Bu reaksiyonda enzim mekanizmaları sonunda oluşan FADH₂ tekrar FAD haline geçerek enzimdeki aktivitesine devam eder. Reaksiyon sonucu oluşan diğer ürün hidrojenperoksit bir reaktif oksijen türüdür (ROT). ROT'lar oksijenin reaksiyonları sonucu oluşan ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle birçok reaksiyona girerek hücrenin yapısını bozan bileşiklerdir (Pryor ve ark., 2006). Hidrojenperoksit çeşitli reaksiyonlara girerek diğer reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumuna da sebep olmaktadır (Walling, 1975; Koppenol, 2001).

Hücrede ROT'ların artmasıyla antioksidanlar ve ROT'lar arasındaki denge bozularak oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres sonucu hücre yapıları bozulur, hücrede yaşlanma veya hücre ölümü görülür. Bunun sonucu olarak vücuttaki birçok organ hasar görür ve çeşitli hastalıklar meydana gelir (Hepel ve Andreescu, 2015).

İndirgenmiş flavinin moleküler oksijenle geri yükseltilmesi mekanizmasının, flavoproteinlerdeki işlevi ve oluşturduğu ürünler nedeniyle önemi büyüktür. Bu reaksiyonla ilgili çalışmalar son yıllarda hızla artmasına rağmen mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Literatürde çeşitli enzimlerle bu mekanizma deneysel ve teorik olarak çalışılmıştır. Deneysel verilerde, spektroskopik yöntemlerle oksidaz gibi bazı

enzimlerde herhangi bir ara ürün gözlenmediği, monooksijenazlarda ve P2O enzimlerinde ise flavin halkasının C(4a) konumuna bağlı bir ara ürün gözlemlendiği bildirilmiştir (Massey, 1994; Bruice, 1984; Mattevi, 2006; Sucharitakul ve ark., 2008). Ayrıca teorik olarak bu reaksiyonun spin dönüşümlü bir reaksiyon olduğu bilinmektedir (Prabhakar ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasının amacı herhangi bir enzime bağlı kalmadan flavinin tam indirgenmiş formu (FADH₂) ve moleküler oksijen arasındaki temel mekanizmayı yoğunluk fonksiyoneli teorisi ile modelleyerek herhangi bir çevresel etki olmaksızın bu tepkimenin gerçekleşme olasılığını araştırmaktır. Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki incelemeler hedeflenmiştir:

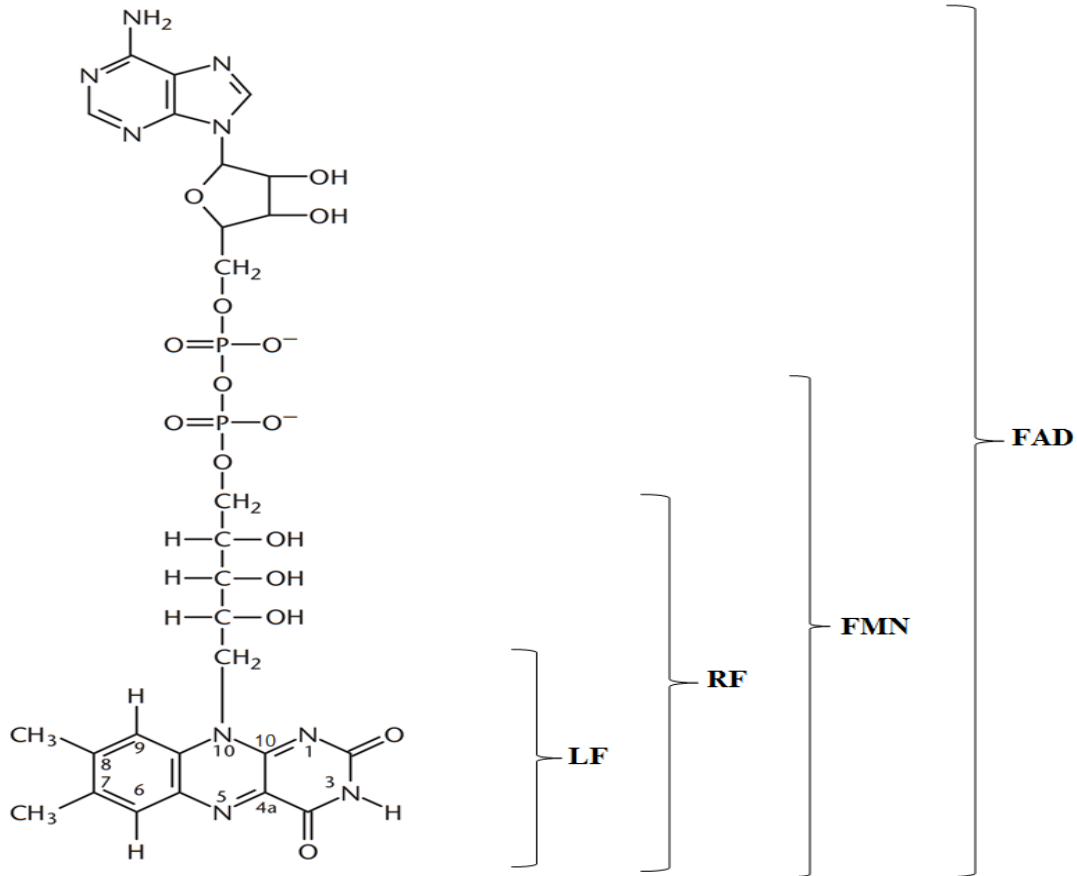
1. Mekanizmanın flavinin *si* ve *re*-yüzlerinden hangisinden daha kolay gerçekleştiğinin araştırılması.
2. Deneysel ve teorik veriler göz önüne alınarak flavine kovalent bağlı herhangi bir ürünün oluşup oluşmadığı. Diğer bir deyişle, mekanizmanın tek basamaklı mı yoksa çok basamaklı mı olduğunun araştırılması.
3. Mekanizmanın triplet, açık kabuk singlet ve kapalı kabuk singlet olmak üzere hangi enerji yüzeylerinden ilerlediği.
4. Literatürdeki bazı kaynaklarda anlatılanlar gibi spin dönüşümlü olarak gerçekleşip gerçekleşmediği.
5. Mekanizmaların aktivasyon enerji engelleri hesaplanarak tepkimenin en olası gidiş yolunun belirlenmesi.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Flavoproteinler

Flavoproteinler bir nükleik asit türevi olan riboflavin [7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitil) izoalloksazin, vitamin B2] içeren enzimlerdir. Riboflavinin, flavin adenin dinükleotit (FAD) ve flavin mononükleotit (FMN) olmak üzere biyolojik aktif formları vardır. Bu nükleotitler enzimlere bağlanarak flavoproteinleri oluştururlar (Abbas ve Sibirny, 2011). 200'den fazla flavoprotein bilinmektedir ve 40'dan fazlası insan organizmasında bulunur. Çok farklı biyokimyasal reaksiyonları katalizledikleri için önemleri büyüktür.

Flavoproteinler; elektron taşıma işleminde, enzim işlevlerini kontrol eden proseslerde, hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonları için moleküler oksijenin aktivasyonunda, çeşitli substratların dehidrojenasyon ve hidrojenasyonunda, ışık emisyonu (biyoluminesans), fotosentez, bitki fototropizması, DNA tamiri ve biyolojik saatlerin düzenlenmesinde yer alırlar (Massey, 2000; Mack ve Grill, 2006).



Şekil 1.1. (LF) Lumiflavin, (RF) Riboflavin, (FMN) Flavin mononükleotit, (FAD) Flavin adenin dinükleotit.

Çoğu flavoenzimde FAD ve nadiren FMN enzime kovalent olmayan şekilde bağlıdır (%90). Flavoproteinlerin sadece % 5-10'unda kovalent bağlı FAD bulunur, ancak bu enzimlerin daha güçlü bir redox özellikleri vardır (Lienhart ve ark., 2013). Kovalent bağlanma otomatik oksidasyonun bir sonucu olarak, flavin halka sisteminin 8 konumu ve 6 konumu ile bir histidin ve bir sistein kalıntısının tiol grubu arasında meydana gelir (Abbas ve Sibirny, 2011).

Flavoenzimlerin çoğunluğu oksidoredüktazdır (%91). Geri kalan kısmını ise transferazlar (%4.3), liyazlar (%2.9), izomerazlar (%1.4) ve ligazlar (%0.4) oluşturur.

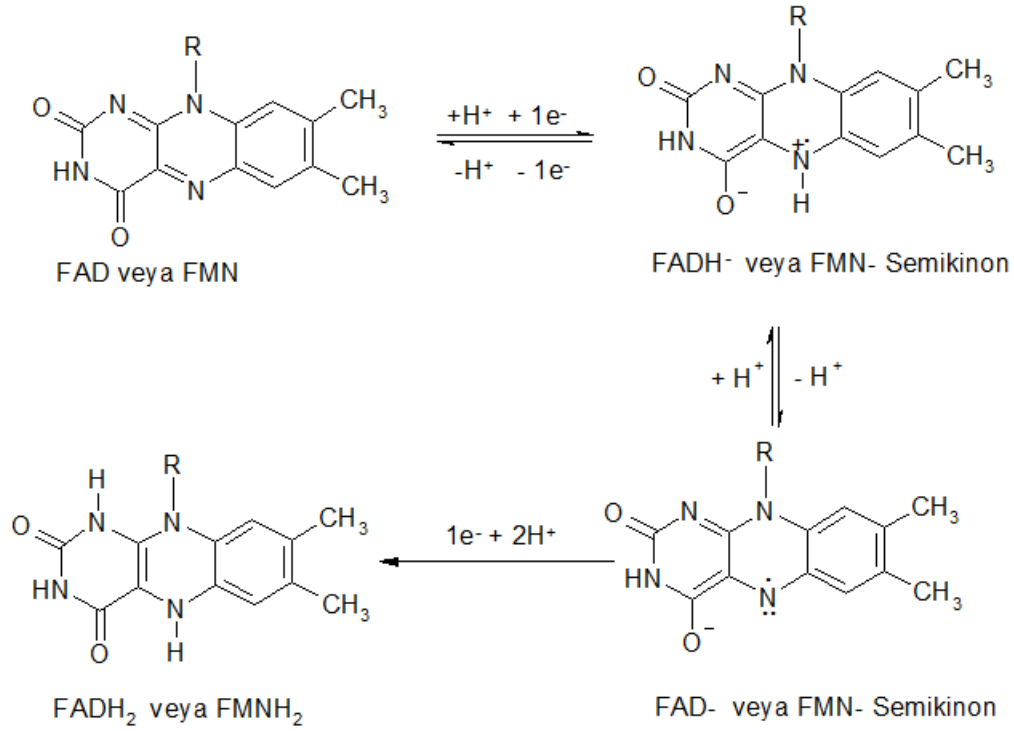
Oksidoretüktazlardaki en büyük üç grup; EC 1.1.4'deki monooksijenazlar ve hidroksilazlar, EC 1.1'deki CH-OH grubunu oksitleyen enzimler ve EC 1.1.3'deki CH-CH grubunu oksitleyen enzimlerdir. Flavoproteinlerde kofaktör olarak FAD (298 protein) FMN'e (98 protein) göre daha fazla bulunur. Riboflavin, riboflavin kinaz hariç herhangi bir enzimde aktif olarak kullanılmaz, ancak bazı organizmalarda kofaktör bu şekilde saklanır (örneğin tavuk yumurtalarında proteine riboflavin bağlıdır) ya da memeliler gibi vitamin B2 sentezi yapamayan organizmalar, difüzyon yoluyla besinlerden alınması için riboflavin spesifik taşıyıcıları kullanırlar (Macheroux ve ark., 2011).

Literatürde flavoproteinlere ait ilk çalışma 1879 yılına dayanmaktadır. Bu çalışmada A. Wynter Blyth tarafından inek sütü bileşimini araştırırken parlak sarı bir pigment izole edilmiştir ve buna laktokrom adı verilmiştir. Şimdilerde flavin olarak bilinmektedir. 1920'lerde ve 1930'ların başında bu parlak yeşilimsi flüoresanslı sarı pigment çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve B vitamini kompleksinin bir bileşeni olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra yapısı 1934 yılında Richard Kuhn ve Paul Karrer tarafından aynı anda belirlenmiş ve riboflavin adını almıştır. Bu çalışmadan kısa bir süre sonra Hugo Theorell ve arkadaşları ise flavin mononükleotitin (FMN) yapısını belirlemiş, proteinde katalitik olarak aktif olanın riboflavin değil flavin mononükleotit (FMN) olduğunu söylemişlerdir. Birkaç yıl sonra Hans Krebs bir flavoprotein olan D-amino asit oksidazı (DAAO) keşfetmiş ve 1938'de Warburg ve Christian bu enzimde flavinin yapısının FMN ile aynı olmadığını saptamışlardır. DAAO üzerinde daha sonra yapılan çalışmalarda Todd ve grubu 1954'te enzimdeki grubun ikinci bir flavin formu olan flavin adenin dinükleotit (FAD) olduğunu kanıtlamışlardır (Massey, 2000).

1.2.1.1. Flavin koenzimleri

Flavinin aktif formları flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotittir (FAD). Flavinin aktivite gösteren kısmı yüksek konjugasyona sahip olan izoalloksazin trisiklik halka sistemidir. Bu özelliği sayesinde elektron akseptörü özelliği gösterir ve redoks reaksiyonlarından sorumludur. Flavin aynı anda bir veya iki elektron kabul edebilir (Walsh, 1980). Flavinin üç tane oksidasyon formu vardır. Bunlar okside formu (FAD), semikinon yani yarı indirgenmiş formu ($\text{FADH}^\cdot$) ve indirgenmiş formudur (FADH_2). Okside flavine 2H^+ ve 2e^- eklenerek indirgenmiş flavin, bu yapıdan 1H^+ ve

$1e^-$ alınarak flavinin yarı indirgenmiş formu olan semikinin yapısı veya semikinin yapısından $1H^+$ ve $1e^-$ eksiltilerek tekrar oksitlenmiş flavin elde edilebilir (şekil 1.2) (Miura, 2001; Silverman ve Holladay, 2014).

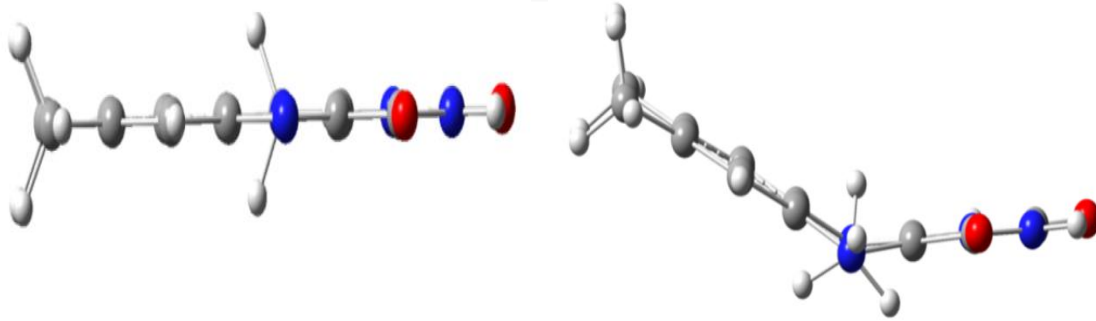


Şekil 1.2. İzalloksazin halkasının okside, semikinin ve indirgenmiş formları.

İzalloksazin halka yapısının kimyasal özellikleri, üç halka sisteminin özelliklerini gösterir. Primidin kısmı ksilen halkasına göre elektron bakımından daha fakirdir. Ksilen halkasında C(8)-CH₃ ve ardından C(6) pozisyonları reaktivite göstermektedir. Bu iki halka arasında pirazin halkası köprü kurar ve flavinlerin kimyasal reaksiyonları çoğunlukla bu bölgede olur. Pirazinin N(5) ve C(4a) kısımları reaksiyonlarda en etkili kısımlardır ve elektrofilik karaktere sahiplerdir. Nükleofilik ve fotokimyasal reaksiyonlar için uygun yerlerdir. Pirimidin halkası hidrofilik özelliktedir ve hem donör hem de alıcı olarak hidrojen bağlama etkileşimlerine uğrayabilir. Ksilen parçası ise hidrofobiktir ve proteinlerde aromatik aminoasit yan zincirleri ile yığılmanın haricinde spesifik etkileşimlere girdiği henüz keşfedilmemiştir. İzalloksazin halkasına farklı yerlerden sübstituentler bağlanabilir bu durum hem ksilen hem de pirazin halkalarında gözlemlenir (Macheroux ve ark., 2005; Ghisla ve Edmondson, 2014). Flavınlerin redoks potansiyelleri kovalent bağlı ve kovalent bağı olmadan bulunduğu enzimlerde aktif

bölgedeki etkileşimlere göre veya farklı PH derecelerine göre de değişim gösterebilir (Bhattacharyya ve ark., 2007).

İzoalloksazin halkası farklı oksidasyon derecelerinde farklı özellikler göstermektedir. FAD yapısında aromatiklik görülürken FADH₂'de görünmez. Oksitlenmiş izoalloksazin halkası düzlemdir ve halkadaki N(10) düzlemde uzanır. Bu merkezde önemli miktarda sp² hibritleşmesi vardır. Proteinlerin içindeyken düzlemden hafif sapmalar olabileceği gözlenmiştir. Kristalografik çalışmalarda indirgenmiş flavinin eğik olduğu görülmüştür. Bunun nedeni; indirgenmiş formunda pirazin halkasının 8 π elektron sistemiyle anti aromatik olduğu, bu anti aromatikliği düzeltmek amacıyla da halkanın N(5)-N(10) ekseninde eğilerek kelebek veya eğik konformasyona dönüştüğü şeklinde açıklanmıştır. Ancak flavinin indirgenmiş formu üzerine yapılan manyetik rezonans çalışmalarında bağlanmış indirgenmiş flavinin nispeten düzlemsel olduğu, bir veya iki elektron ile indirgenmesiyle halkanın geometrisindeki değişimin fazla olmadığı görülmüştür. Yapılan hesapsal çalışmalarda ise flavinin okside ve semikinon formunun düzlemsel veya hafif eğik, indirgenmiş flavinin ise eğik geometride olduğu saptanmıştır (Şekil 1.3) (Walsh ve ark., 2003; Rizzo, 2001; Ghisla ve Edmondson, 2014; Topal, 2017).



(a)

(b)

Şekil 1.3. (a) FAD düzlemsel, (b) FADH₂ eğik (Topal, 2017).

1.2.1.2. Redoks reaksiyonlarında flavinler

Flavinin en önemli özelliği daha önce de belirtildiği gibi geri dönüşümlü bir veya iki elektron kabul ederek redoks reaksiyonlarına girme kapasitesidir. Bu reaksiyonlar genel olarak hızlıdır ve kinetik olarak kolaydır. Flavoproteinlerin çoğunluğu net redoks reaksiyonu verirler. Bir flavoenzim tarafından katalize edilen reaksiyonlar indirgeyici ve

yükseltgeyici olan iki yarı tepkimeyi içerir. Hemmerich ve grubunun 1977 yılında yaptığı çalışmaya dayanarak Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından flavoenzimler verdiği redoks reaksiyonlarına göre beş gruba ayrılmıştır (Hemmerich ve ark., 1977; Eduardo ve Edwards, 2007; Abbas ve Sibirny, 2011).

1. Transhidrojenazlarda, bir organik substrattan diğerine uygun hidrojen iyonları ile birlikte iki elektron transfer edilir.
2. Dehidrojenaz-oksidazlarda, iki elektron organik substrattan flavine geçer; burada moleküler oksijen oksitleyici substrat olarak görev yapar ve reaksiyon sonunda H_2O_2 'ye indirgenir.
3. Dehidrojenaz-monooksijenazlarda, flavin genellikle indirgenmiş piridin nükleotiti ile indirgenir ve yardımcı bir substrat varlığında O_2 ile oksitlenir. Oksijenin bir atomu yardımcı substrata geçerken diğeri H_2O 'ya indirgenir.
4. Dehidrojenaz-elektron transferazlarda, flavin indirgenmiş bir substrattan iki elektron transferi ile indirgenir ve daha sonra sitokromlar ve demir sülfür proteinleri gibi alıcılarda ard arda tek elektron transferi ile yeniden oksitlenir.
5. Elektron transferazlarda, flavin tek elektron basamakları ile indirgenir ve tekrar tek elektronla oksitlenir.

1.2.1.3. Net redoks değişimi olmayan reaksiyonlarda flavinler

Genel olarak flavoproteinler net redoks reaksiyonlarına girerler ancak böyle olmayan çeşitli flavoproteinlerde vardır. Bunlar dört grup altında incelenebilir.

1. Bu gruptakiler iki elektronlu flavin kimyasına uyan N-metilglutamat sentaz ve 5-hidroksivaleril-koenzim A (CoA) dehidratazlarıdır.
2. Diğerleri serbest radikal kimyasını içeren korismat sentaz, DNA fotolizaz, (6-4) fotolizaz, ve 4-hidroksibutiril-koenzim A (CoA) dehidratazlarıdır.
3. (R)-2-hidroksiasil-CoA dehidratlar, izopentenil difosfat izomeraz, ve UDP galaktopiranoz mutaz enzimlerini içeren bu grupta flavinin rolü belirsizdir.
4. Asetohidroksiasit sentaz ve hidroksinitril liyaz enzimlerinde ise flavinler katalizlere doğrudan katılmamaktadır (Bornemann, 2002).

1.2.1.4. Işık emisyonu ve diğer reaksiyonlara giren flavinler

Flavinler fototropizm gibi proseslerde bulunabilirler. FMN bitkilerin fototropinlerinde kofaktör olarak bulunur. Mavi ışığa duyarlı reseptörler olarak bitkilerin ışık kaynaklarına doğru bükülmesi tepkisinden, kloroplast hareketlerinden ve bunun gibi birçok diğer olaydan sorumludur. FMN fototropine kovalent olmayan şekilde bağlı durmaktadır. (Briggs ve Christie., 2002). FAD ve metenil tetrahidrofolat kriptokromlarda kofaktör olarak bulunurlar. Ayrıca FAD BLUF proteinlerinde kovalent olmayan şekilde bağlı durarak mavi ışığa duyarlı reseptörler olarak görev yapar (Gomelsky ve Klug, 2002; Lin ve ark, 1995). FMN içeren floresan proteinleri, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas putida*'nın mavi ışık fotoreseptörlerinden üretilmiştir. Bu proteinler ortamda oksijen olsun veya olmasın floresan etkisini gösterebilmeleri açısından önemlidirler (Drepper, 2007). Flavınların sirkadyan ritimle de yakından ilgili olduğu Sancar ve grubunun çalışmalarından bilinmektedir (Sancar, 2000; Öztürk ve ark., 2011). Riboflavin ise bitkilerde hastalık direnci oluşturmak için gereken bir dizi sinyal iletim yolunu aktive etmektedir (Dong ve Beer, 2000; Abbas ve Sibirny, 2011).

1.2.2. Moleküler oksijen ve flavin ile reaksiyonları

1.2.2.1. Moleküler oksijen

Oksijen yaşam için olmazsa olmaz kaynaklardan biridir ve birçok kimyasal tepkimeye girer. Ancak bazı oksijen türlerinin geçirdiği reaksiyonlar sonucu toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Oksijenin aktif olan diğer iki türü singlet oksijen ve ozondur (O_3). Ozon biyomoleküllerin havadaki oksidasyonundan sorumludur ve fotokimyasal reaksiyonlarda radikal olmayan güçlü bir oksidandır.

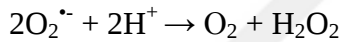
Oksijen temel halde triplet olarak bulunur. triplet halindeyken (3O_2) moleküler orbitallerinde elektronlar spinleri aynı olacak şekilde ayrı ayrı durmaktadır. Biradikal singlet halde (1O_2) ise elektronlar yine ayrı orbitallerde ancak biri α diğeri β olarak ters spinde dururlar. Bu da enerji gerektirdiğinden singlet oksijen triplet oksijenden 1eV (23 kcal/mol veya 94 kJ/mol) kadar daha yüksek enerjiye sahiptir. Singlet oksijen uzun yaşam süresine (10^{-6} – 10^{-5} s) sahiptir ve hızlıca reaksiyona girebilir. Bütün bunlar singlet oksijenin kimyasal olarak triplet oksijenden daha reaktif olduğunu açıklamaktadır (Pryor ve ark., 2006; Foote ve Clennan, 1995).

Triplet oksijen uyarılarak singlet hale geçer ve aşırı derecede reaktif olduğundan canlı organizmalarda kolaylıkla reaksiyona girerek hücreye ciddi derecede zarar verir. (Laloi ve Havaux, 2015; Davies, 2003).

1.2.2.2. Reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres

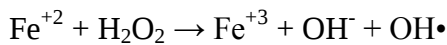
Yukarıda bahsedildiği gibi moleküler oksijenin çeşitli reaksiyonları sonucu hücreler için zararlı derecede reaktif olan radikaller veya bileşikler oluşabilir. Bunlara reaktif oksijen türleri (ROT) denmektedir (Sayre ve ark., 2007). Bu yüzden singlet oksijen de bir ROT'tur. Diğerleri ise oksijenin reaksiyonu sonucu oluşan bileşiklerdir. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$), peroksinitrit ($OONO^{\bullet}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ROT olarak sayılırlar (Pryor ve ark., 2006).

Bu bileşiklerden H_2O_2 indirgenmiş flavinin moleküler oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Ayrıca aşağıdaki reaksiyonlara göre de H_2O_2 oluşur (Wentworth ve ark. 2001; Hayyan ve ark., 2016).

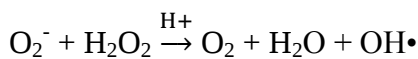


H_2O_2 bir reaktif oksijen bileşiği olduğu gibi tepkimelere girerek diğer reaktif oksijen bileşiklerini de oluşturur. İn vivo koşullarda kolaylıkla suya karışarak hücre içine girebilir. Ortamda geçiş metalleri olduğunda Fenton tepkimeleriyle, süperoksit radikalleri olduğunda Haber-Weiss tepkimeleriyle hidroksil radikalini oluşturur. Bu radikal, reaktivitesi en yüksek olan reaktif oksijen bileşiklerinden biridir (Walling, 1975; Koppenol, 2001).

Fenton Reaksiyonu:

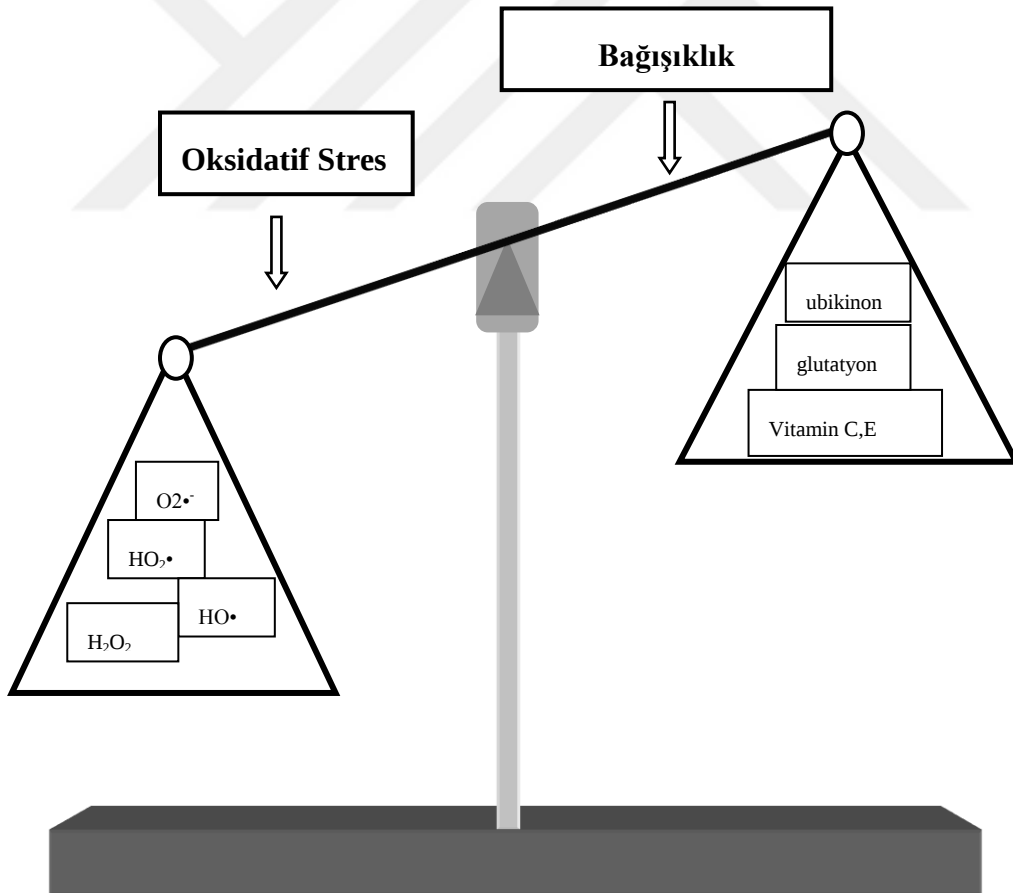


Haber-Weiss Reaksiyonu:



Normal bir hücrede koruyucu olarak antioksidan enzimleri, vitamin C ve E, ubikinon, glutatyon ve ürik asit gibi antioksidan bileşikleri bulunur. Bu antioksidan miktarı ile çeşitli tepkimeler sonucu oluşan reaktif radikaller denge halindedir. Hücredeki bu

denge nin bozulmasına oksidatif stres denir. Hücrede ROT'lar gibi yüksek reaktivite gösteren bileşikler arttığında denge reaktif radikallere doğru kayar. ROT'lar oksitleyici özelliklerinden dolayı hücredeki protein, karbonhidrat, lipit ve nükleik asit yapılarına zarar verirler. Bunun sonucunda DNA, RNA, şeker türevleri ve membranlar zarar görerek hücrede yaşlanma veya hücre ölümü görülür. Oksidatif stres beyni, kalbi, böbrekleri, akciğer ve karaciğerleri, deriyi, gözleri ve daha birçok organı etkileyerek vücutta birçok rahatsızlığa neden olmaktadır. Alzheimer, Parkinson, amiotrofik lateral skleroz ve çoklu skleroz, kardiyovasküler rahatsızlıklar, astım, diyabet, katarakt, deride ve saçta pigment bozulmaları ve bazı kronik hastalıklar bunlara örnektir. Hücrede reaktif bileşiklerin azalmasıyla denge antioksidan yönüne kayar bu da hücrenin antioksidan üretimini durdurarak savunma mekanizmasının zayıflamasına neden olur (Hepel ve Andreescu, 2015; Sayre ve ark., 2007; Fridovich, 2014).



Şekil 1.4. Hücredeki reaktif bileşikler ve antioksidan dengesi

1.2.2.3. Flavinin oksijenle reaksiyonları

Flavoenzimlerde flavin son oksidasyon basamağında moleküler oksijenle tepkimeye girer. Flavinin son oksidasyon basamağı, $E-FADH_2 + O_2 \rightarrow E-FAD + H_2O_2$ şeklindedir. Bu reaksiyon sonunda flavin tekrar okside formuna dönerken H_2O_2 açığa çıkar.

H_2O_2 hücreler için zararlı olan bir reaktif oksijen türüdür ve oksidatif strese neden olmaktadır. Bu nedenle flavoenzimlerdeki bu adımın önemi büyüktür.

Literatürde farklı enzimlerle bu mekanizma çeşitli yönleriyle çalışılmıştır ve son yıllarda bu çalışmalar hızla artmaktadır. Seksen ve doksanlı yıllardaki Bruice ve Massey'in önerilerine göre bu reaksiyon ara ürün oluşturmadan veya flavine kovalent bağlı C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşturarak ilerleyebilir. Enzimlere bakıldığında genel olarak oksijenle reaksiyon verenler dehidrojenazlar, transhidrojenazlar, transferazlar, oksidazlar ve monooksijenazlar olarak sınıflandırılabilir. Dehidrojenaz ve transhidrojenazların oksijen ile yavaş bir şekilde reaksiyon verirken elektron transferazlarda reaksiyonun hızla olduğu, söz konusu enzimlerde herhangi bir ara ürün tespit edilmediği, oksidazlarda ise reaksiyonun oldukça hızlı olduğu ve ürün olarak sadece okside flavin ve hidrojenperoksidin olduğu, herhangi bir ara ürün oluşmadığı bilinmektedir. Ara ürün oluşmuş olsa bile reaksiyon çok hızlı olduğundan tekrar ürüne döndüğü düşünülmektedir. Monooksijenazlarda ise reaksiyon sonunda oksijenin bir atomu subsrta geçerken diğer atomu da indirgenerek H_2O oluşturmaktadır. Bütün bu enzimlerden C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü net olarak monooksijenazlarda saptanmıştır. Kovalent bağlı C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü Bruice ve grubu tarafından 1984 yılında yapılan çalışmada tanımlanmıştır. (Massey, 1994; Eberlein ve Bruice, 1983; Bruice, 1984).

Daha sonraki yıllarda Bruice ve Masseyin yaptığı çalışmaların ışığında farklı enzimlerle deneysel ve hesapsal çalışmalar yapılmış, flavinin bu reaksiyonu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

1.2.3. Literatürdeki çalışmalar ve önerilen mekanizmalar

Bu konuyla ilgili deneysel olarak yapılan bir çalışmada p-hidroksibenzoat hidroksilaz (PHBH) enzimi mutantlarının hidroksilasyon reaksiyonları incelenmiştir.

C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü spektroskopik yöntemlerle gözlenmiştir. Ayrıca bu ara ürünün oluşumunun enzimin çalışma mekanizmasında önemli olduğu belirtilmektedir. Enzim p-hidroksibenzoat'a oluşan bu ara ürün ile orto pozisyonundan etki etmektedir (Malodonado ve ark., 2001).

Sucharitakul ve grubunun yaptığı deneysel bir çalışmada piranoz 2-oksidaz (P2O) enzimi ile çalışılmış ve stopped-flow spektroskopisinde C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü tespit edilmiştir. Ayrıca bu ara ürünün oluşmasında flavoproteinlerde aktif bölgedeki flavinin çevresindeki etkileşimlerin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Burada kullanılan enzimde dielektirik sabiti düşük olan bir çözücünde denemeler yapılmış, bu sayede enzimin aktif bölgesindeki hidrofobik gruplar açılarak ara ürünün oluşumuna fırsat vermişlerdir. Diğer yandan, bu yazarlar, genel olarak flavinlerde enzimin aktif bölgesine bağlı olarak C(4a)'ya bağlı bir ara ürün oluşarak veya herhangi bir ara ürün oluşmadan reaksiyonun devam edebileceğini belirtmiştir (Sucharitakul ve ark., 2008).

Kolin oksidaz (CO) enzimi ile yapılan bir diğer deneysel çalışmada spektroskopik yöntemlerle C(4a)'ya OH ve OOH grubu bağlı olan ara ürünler tespit edilmiştir. Ayrıca kuantum mekanik yöntemlerle (YFT) bu ara ürün yapıları optimize edilmiş, deneysel olarak bulunan sonuçlarla yapılar karşılaştırılmış ve aralarında iyi bir korelasyon olduğunu gözlenmiştir. Bu çalışmada da CO enziminde C(4a)-hidroperoksiflavin yapısının oluşabileceği belirtilmiştir (Orville ve ark., 2008).

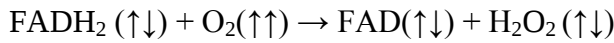
Chenprakhon ve grubu p-hidroksifenilasetat-3-hidroksilaz (HPAH) enzimi ile çalışmış ve spektroskopik yöntemlerle C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününün oluştuğunu bulmuşlardır. Bu ara ürünün monooksijenaz adımı için çok önemli olduğunu, ara ürünün enzimdeki His396 sayesinde oluştuğunu belirtmişlerdir (Chenprakhon ve ark., 2014).

Vibro harveyi lusiferaz enziminin aHis45 mutantlarıyla yapılan deneysel bir çalışmada mutantların C(4a)-hidroperoksiFMNH ara ürünü oluşumundaki etkileri incelenmiştir. Stopped-flow spektroskopisi ile bulunan sonuçlarda, bazı mutantlarda ara ürün oluşurken bazı mutantlarda ara ürün oluşmadığı gözlemlenmiştir. Görülemeyen ara ürünlerin stopped-flow yöntem için çok hızlı olduğu belirtilmiştir. Bazı mutantların C(4a)'ya FMNH₂'nin farklı yüzünden saldırdıkları ve bunun da ara ürünün reaktivitesini etkilediği öne sürülmüştür. Bu çalışmada önerilen mekanizmada da reaksiyonun ara

ürün oluşarak veya herhangi bir ara ürün oluşmadan ilerleyebileceği belirtilmektedir (Li ve ark., 1999).

C(4a)-hidroperoksiflavin yapısı oksidaz enzimlerinde enzimin aktif bölgesinin çeşitliliğine göre oluşabilir veya oluşmayabilir. Ancak monooksijenaz enzimlerinde enzim mekanizması bu ara ürün oluşuktan sonra devam edebildiği için monooksijenazlarda kesinlikle oluşmaktadır (Mattevi, 2006). Ara ürünün oluşması ve daha sonra ayrılarak reaksiyon sonunda FAD ve H₂O₂ oluşturabilmesi için enzimin aktif bölgesinde bulunan pozitif yükün önemli olduğu söylenmektedir (Gadda, 2012). Monooksijenazlarda da ara ürün oluşurken bu etkileşimler aktif bölgedeki aminoasitler ve NADP⁺ ile sağlanabilir. Bach ve Mattevi'nin yaptığı enzimsiz hesapsal çalışmada FADH⁻ ve O₂ ile C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşurken yapıya su, alkol, amit ve NADP⁺ grupları eklenerek bu grupların oluşturduğu hidrojen bağları ve yüklerin ara ürün oluşumundaki etkileri incelenmiştir. Söz konusu çalışmada da bölgede pozitif yük bulunmasının reaksiyonu kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Bach ve Mattevi, 2013).

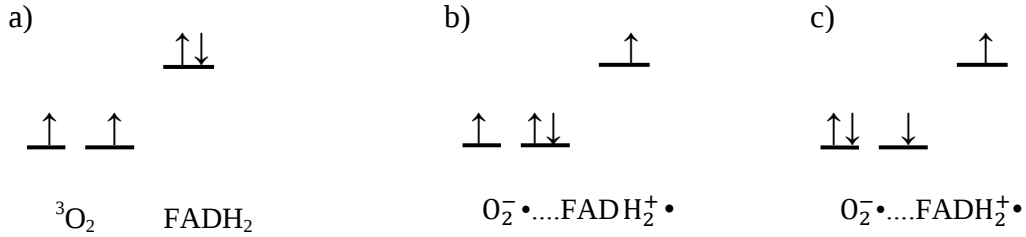
Flavinin moleküler oksijenle olan aşağıdaki tepkimesi triplet oksijenin singlet hale geçmesini içerdiğinden spin yasaklı bir reaksiyondur. Ancak, Prabhakar ve grubu yaptığı hesapsal çalışmada bu geçişin spin dönüşmesi ile olabileceğini teorik olarak kanıtlamıştır (Prabhakar ve ark., 2002).



Moleküler oksijen temel halde triplet olarak bulunur. Flavin ve oksijen reaksiyona girdiğinde singlet olan flavinin moleküler orbitallerindeki spinler zıt yönlü olduğundan triplet oksijenin π^*2p orbitallerinin boş alanlarına uymazlar. Bu yüzden reaksiyonun başlayabilmesi için oksijen flavinle triplet bir radikal çifti kompleksi oluşturur. Daha sonra yapı kompleks halde tripletten singlet biradikal hale geçer. Bu geçişin spin-orbit birleşmesi ile olabileceği ispatlanmıştır. Farklı enzimlere göre bu adımdan sonra C(4a)-hidroperoksiflavin kovalent bağlı ara ürünü oluşabilir veya herhangi bir ara ürün olmadan reaksiyon sonucu yükseltgenmiş flavin ve hidrojenperoksit oluşabilir.

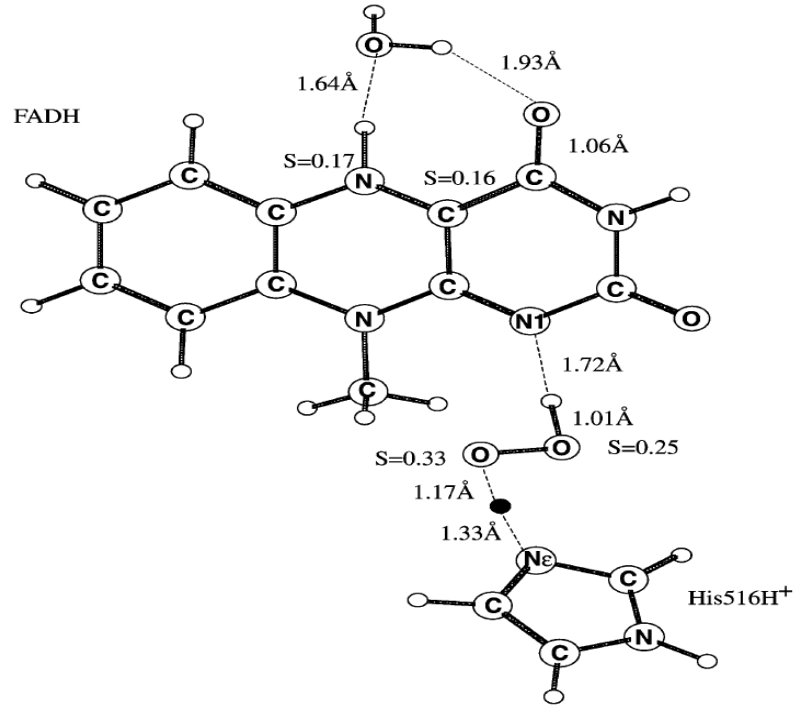
Prabhakar ve grubu bu reaksiyonu hesapsal olarak glikoz oksidaz (GOX) enzimiyle denemişlerdir. Hesaplamalar YFT/B3LYP/DZ(1d,1p) yöntemi ile yapılmıştır. Daha sonra optimize yapılar 6-311+G(2d,2p) temel seti seçilerek yine aynı yöntemle hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre önerilen mekanizmada ilk olarak aktif bölgede triplet

moleküler oksijen bulunmasıyla moleküller arası zayıf titreşimler triplet FADH_2^+ (radikal).... O_2^- (radikal) kopleksini oluşturacak olan ilk elektron sıçramasını başlatır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Moleküler oksijen ve indirgenmiş flavin moleküler orbitallerinin şematik gösterimi. (a) triplet moleküler oksijen ve singlet indirgenmiş flavin, b) triplet radikal kompleks, c) singlet radikal kompleks.)

Başlangıçta singlet FADH_2 ve triplet oksijen birleşerek triplet radikal çiftini oluşturur. Daha sonra triplet radikal çifti singlet biradikal hale geçer ve reaksiyondaki diğer adımlar singlet gerçekleşir. Bu reaksiyonda moleküler oksijene proton transferi flavinin N1 konumundan gerçekleşir. Bu adım $\text{O}_2^- \cdots \text{H}^+$ etkileşiminden dolayı herhangi bir aktivasyon enerjisi gerektirmez ve bu sırada başlangıç kompleksi singlet halde olduğundan herhangi bir spin dönüşümü olmaksızın reaksiyon tek adımda gerçekleşir. H_2O_2 oluşumunda moleküler oksijen bir hidrojeni flavinin N1 konumundan, diğerini protonlanmış histidinden alır. Böylece reaksiyon sonunda singlet FAD ve H_2O_2 oluşur. GOX'un aktif bölgesindeki protonlanmış histidin aminoasidi sayesinde reaksiyonun aktivasyon enerji bariyeri oldukça düşüktür (6.6 kcal/mol). Ayrıca aynı çalışmada flavinin N5 konumundaki hidrojenin GOX'un aktif bölgesindeki bir su molekülü ile çok kuvvetli H-bağı yaptığı görülmüştür. Bu nedenle, histidinin moleküler oksijene proton vermeden önce aktif bölgedeki su molekülleri tarafından protonlandığı önerilmektedir ancak bu öneri modellenmemiştir (Prabhakar ve ark., 2002; Prabhakar ve ark., 2003). Çalışılan mekanizmanın geçiş konumu şekil 1.6. da görülmektedir.

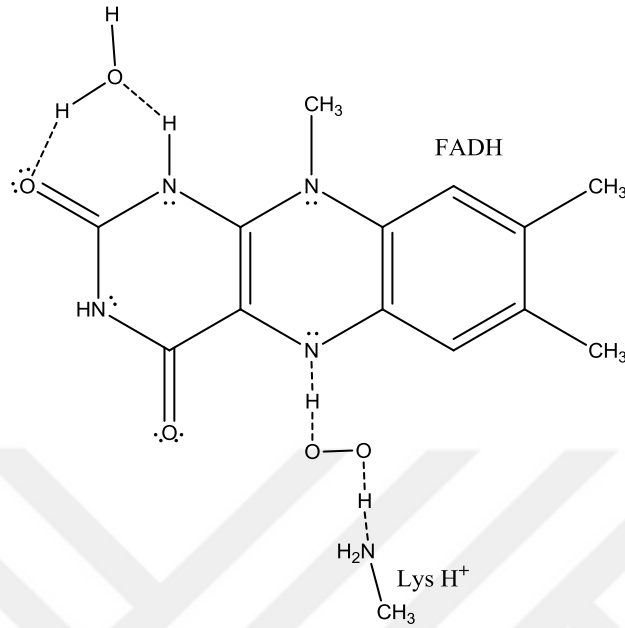


Şekil 1.6. GOX'un H₂O₂ oluşumundaki optimize edilmiş geçiş konumu. (Prabhakar ve ark., 2003)

Prabhakar ve grubunun monoaminoksidaz B (MAO B) enzimi ile yaptığı başka bir hesapsal çalışmada hesaplamalarda YFT/B3LYP/6-311+G(d,p) yöntemi kullanılmış ve FADH₂ nin O₂ ile reaksiyonu MAO B'nin aktif bölgesindeki aminoasitlerle incelenmiştir. Burada önerilen mekanizmada da reaksiyon spin dönüşümlü olarak GOX'dakine benzer bir şekilde gerçekleşmektedir. MAO B enziminde GOX'daki reaksiyonun tek adımda ve düşük enerjili olarak gerçekleşmesini sağlayan protonlanmış histidin aminoasidi yerine flavin halkasının N5 konumunun yakınında protonlanmış lisin aminoasidi bulunmaktadır. Flavinin N1 konumunun yakınında da su molekülü flavinle hidrojen bağı etkileşimi yapmış halde bulunmaktadır.

Bu mekanizmaya göre moleküler oksijen flavinin N5 konumunun ve protonlanmış lisinin arasına girerek triplet radikal çift oluşturur. Bu basamağın aktivasyon enerji bariyeri 7.3 kcal/mol'dür. Daha sonra bu radikal çift tripletten singlete geçer. Singlete geçtikten sonra reaksiyon sonunda FAD ve H₂O₂ oluşurken moleküler oksijen bir hidrojenini flavinin N5 konumundan alırken diğerini protonlanmış lisin aminoasidinden alır. Bu adımın aktivasyon enerji bariyeri de protonlanmış lisin sayesinde oldukça düşüktür (1.1 kcal/mol).

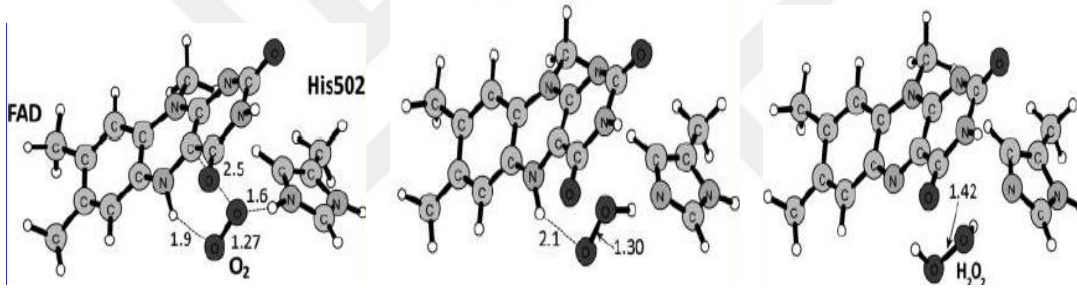
Bu hesaplamalardaki optimize yapıların N1-H bağı daha önceden kırılmış olarak kabul edilmiştir (Prabhakar, 2005). Geçiş konumuna ait yapı şekil 1.7. de verilmiştir.



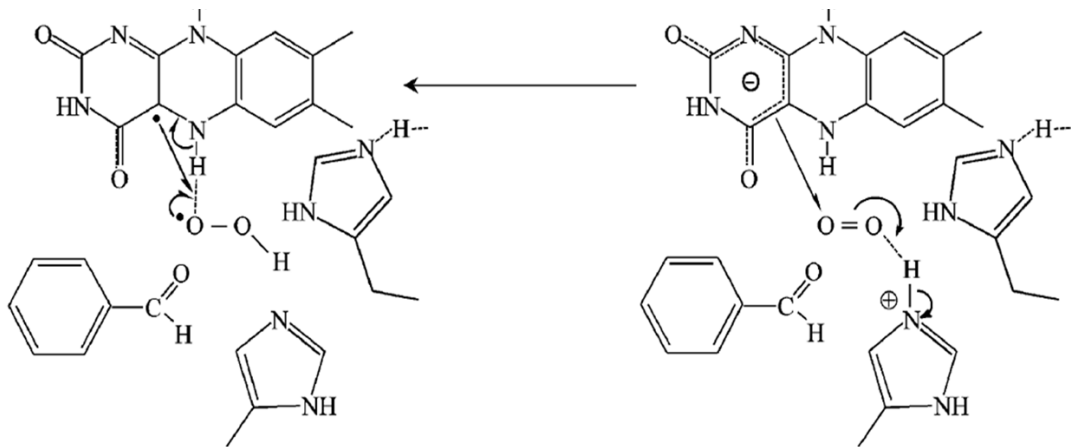
Şekil 1.7. MAO B'nin H₂O₂ oluşum mekanizmasındaki geçiş konumu yapısı

Aril-alkol oksidaz enzimi (AAO) ile yapılan hesapsal çalışmada ilk önce enzimin aktif bölgesi katılmadan flavin ve O₂ kompleks yapıları hesaplanmıştır. Hesaplamalarda açık kabuk UM06/6-31G(d,p), 6-311G(d,p), ve tek nokta enerjileri için 6-311G(3df,3pd)++ temel setleri kullanılmıştır. Burada kullanılan flavin N1 konumundan protonlanmamış ve N5 konumundan protonlanmış anyonik indirgenmiş flavindir (FADH⁻). Hesaplamalarda flavin ve O₂ kompleksi triplet ve singlet olarak optimize edilmiştir. Triplet olarak hesaplanan yapıda flavin ile O₂'nin aralarında bağ görülmeyle oksijenin flavinin üstünde durduğu, singlet hesaplamada ise oksijenin flavinin C(4a) konumuna bağlanıp N5'teki hidrojeni de aldığı C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününü oluşturduğu görülmüştür. Daha sonra AAO'nun aktif bölgesinde olan histidin aminoasidi yapıya protonlanmış olarak eklenerek hesaplama yapılmış ve ürün yapısında oksijenin bir protonu histidinden diğerini de flavinden (N5 konumuna bağlı proton) aldığı görülmüştür. Söz konusu üründe flavinin C4a konumunda kovalent bağ gözlenmemiştir. Bu çalışmalar gaz fazında yapılmıştır. Aynı tepkimeler solvent eklenerek de modellenmiştir. Sadece flavin ve O₂ yapıları kullanıldığında gaz fazında görülenin tersine singlet hesaplamalarda C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü optimize

edilememiştir. Solventli ortamda histidin aminoasidi de katılarak optimizasyon yapıldığında C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü gözlenmemiştir. Enzimin aktif bölgesindeki histidin de eklenerek triplet ve singlet olarak hesaplanan reaksiyona giren yapılar, ara ürünler ve reaksiyon sonucu oluşan ürünler aynı potansiyel enerji yüzeyinde çakıştırılmıştır. Bu çalışmada önerilen mekanizmaya göre, O_2 'nin ilk olarak protonlanmış histidinden proton aldığı ve çakıştırılmış potansiyel enerji yüzeyinden anlaşıldığı üzere bu adımın neredeyse bariyersiz olduğu gözlenmiştir. Daha sonra, $\bullet OOH$ radikali flavinin N5 konumundan ikinci protonu alırken spin dönüşümü ile birlikte ürün olarak FAD ve H_2O_2 oluştuğu ve bu adımın daha yüksek enerji gerektirdiği bulunmuştur. Bu mekanizmada anlatılan yapılar Şekil 1.8. ve 1.9 da verilmiştir (Hernandez-Ortega ve ark., 2012).

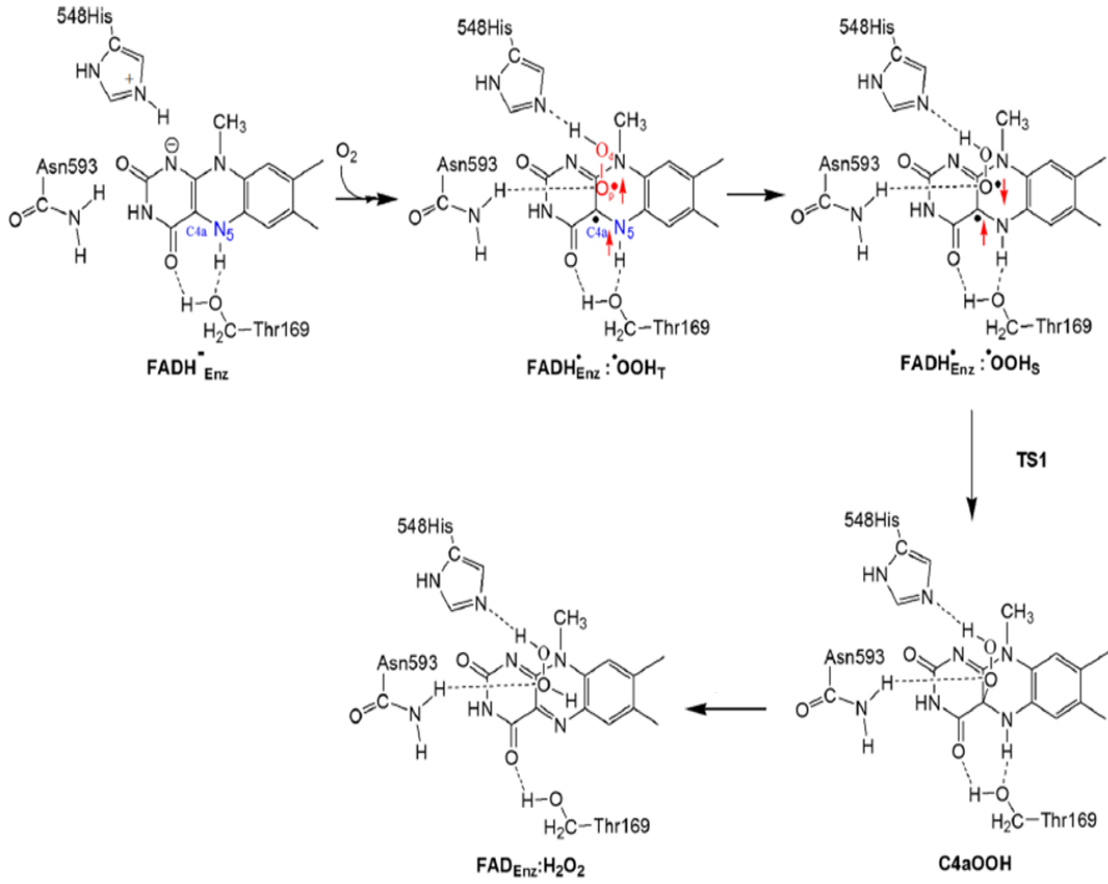


Şekil 1.8. Reaksiyona giren triplet kompleks (solda), protonlanmış histidinden proton alındıktan sonra oluşan triplet ara ürün (ortada), reaksiyon sonucu spin dönüşümüyle oluşan FAD ve H_2O_2 (sağda)



Şekil 1.9. AAO için önerilen FAD oksidasyonu mekanizması.

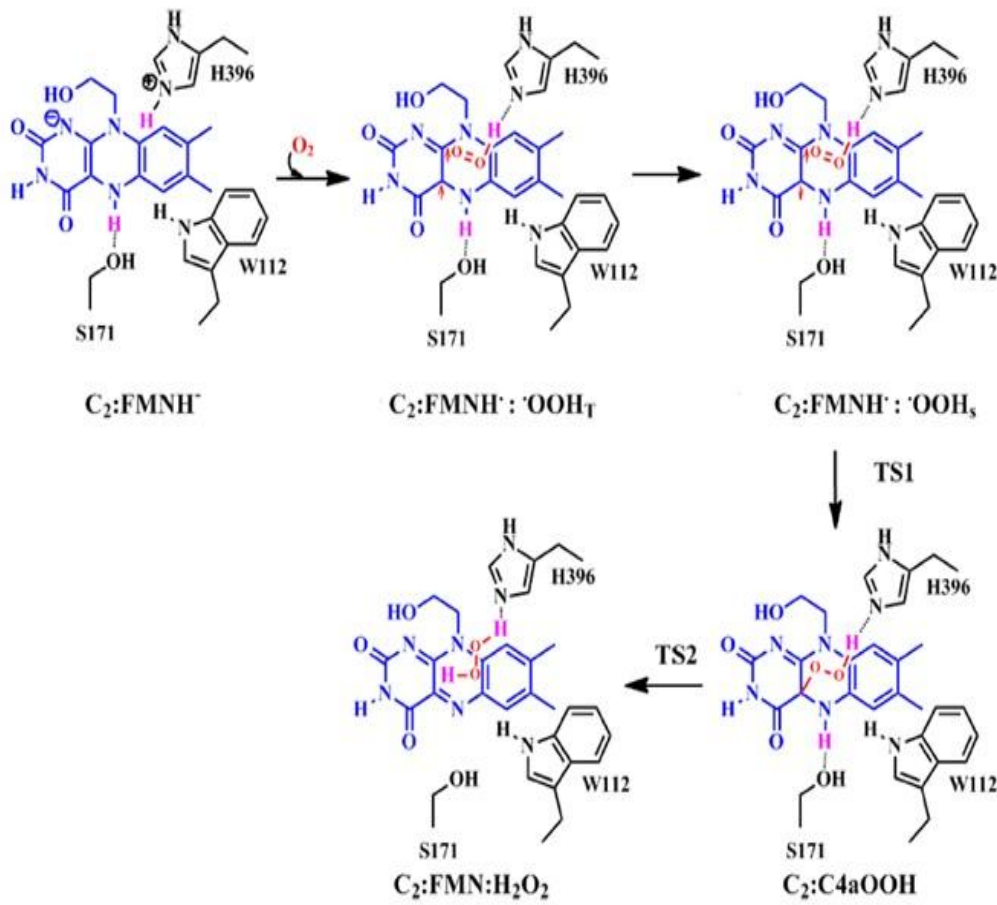
Pirosinaz 2-oksidadaz enzimi oksidadaz olmasına rağmen C(4a)-hidroperoksiflavin ürününün gözlenebildiği bir enzimdir (Wongnate ve ark., 2011-2014). Bu enzimle yapılan çalışmada B3LYP yöntemi, 6-31++G(d,p) ve 6-31G(d) temel setleri kullanılmıştır. Tek nokta enerjileri için de yine aynı yöntem kullanılarak 6-311+G(d,p) temel seti seçilmiştir. Yapılan hesaplamalarda enzimin aktif bölgesindeki önemli aminoasitler olan histidin, treonin ve asparjin de hesaplama katılmıştır. Hesaplama flavinin anyonik indirgenmiş hali ($FADH^-$) kullanılmıştır. Daha önce önerilen mekanizmalarda oksidadazların singlet biradikal $FADH_2^+$ (radikal)... O_2^- (radikal) kompleksi sonrasında ara ürün oluşmadan FAD ve H_2O_2 oluşturacağı, monooksijenazların ise $FADH_2^+$ (radikal)... O_2^- (radikal) kompleksinden sonra C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününü oluşturacağı ve monooksijenasyon döngüsüne gireceği söylenmektedir. P2O'da önerilen mekanizmada ise flavinin N1 konumuna yakın yerde duran protonlanmış histidin asit gibi davranarak O_2 'ye proton-birleşik elektron transferi için proton sağlamaktadır. Oksijen histidinden protonu alırken triplet $FADH$ (radikal)... OOH (radikal) kompleksini oluşturur. Bu adımdan sonra diğer önerilen mekanizmalara benzer şekilde triplet $\rightarrow$ açık kabuk singlet biradikal dönüşümü sağlanır. Açık kabuk singlet biradikal $FADH$ (radikal)... OOH (radikal) kompleksi 0.06 kkal/mol kadar bir enerji gerektirir. Radikal OOH flavinin C(4a) konumuna bağlanarak ara ürün olarak singlet C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününü 10.9 kkal/mol enerji bariyerini aşarak oluşturur. Bu ara ürünün oluşmasında N5 konumundaki hidrojenin, altında bulunan treonin aminoasidi ile hidrojen bağı etkileşimi yapması önemlidir. Reaksiyonun ikinci adımında ise OOH flavinin C(4a) konumundan ayrılırken N5 konumundaki hidrojeni de almaktadır; bu adım geri dönüşümsüzdür ve 24.9 kkal/mol enerji gerektirir. OOH radikali reaksiyona girerken flavinin üzerinde flavin halkasına paralel olarak durmaktadır. Bu konumda aktif bölgedeki önemli aminoasitler olan histidin ve asparjin ile hidrojen bağı etkileşimi yaparak durur. Yalnızca 3 aminoasit ile modellenen bu reaksiyonda, flavinin *re*-yüzü ve *si*-yüzünden olan etkilere de bakılmış ve her iki yüzünden de hesaplanan enerjinin aynı olduğu söylenmiştir. Ancak, gerçek enzimde *si*-yüzünde aktif bölgedeki aminoasitler çok yer kapladığı için reaksiyon gerçekleşmemektedir. Bu çalışmada reaksiyonun hangi taraftan gerçekleşeceği sterik etkinin o bölgede nasıl olduğuyla ilişkilendirilmiştir. Şekil 1.10. da önerilen mekanizma gösterilmiştir (Wongnate ve ark., 2013).



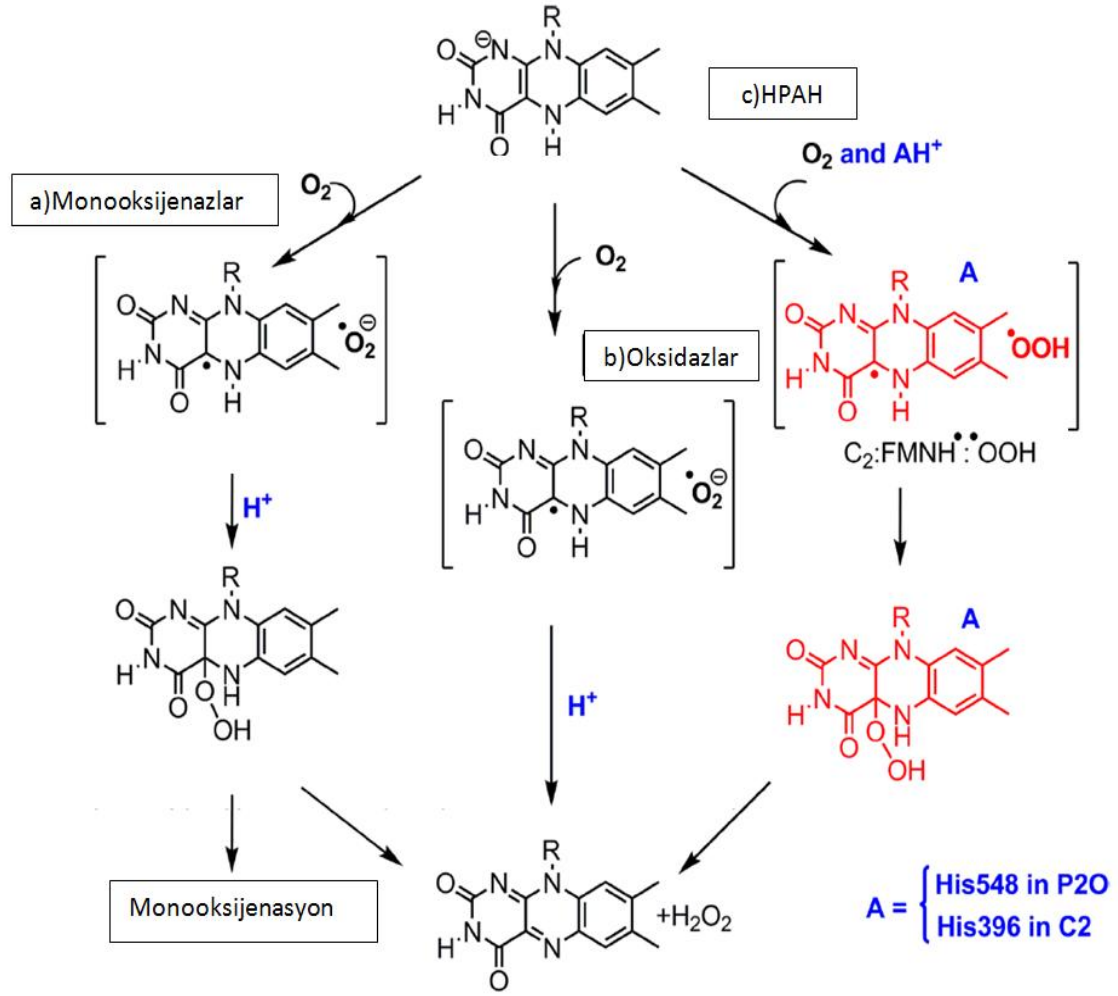
Şekil 1.10. P2O için önerilen mekanizma

Hesapsal olarak yapılan bir diğer çalışma p-hidroksifenilasetat 3-hidroksilaz (HPAH) enziminin oksijenaz parçasıyla (C₂) yapılmıştır. Hesaplamalar gaz fazında B3LYP yöntemiyle 6-31G(d) temel seti seçilerek yapılmıştır. C₂ nin aktif bölgesindeki 3 önemli aminoasit olan serin, triptofan ve histidin hesaplama katılarak FADH[•] ve O₂ ile reaksiyonu incelenmiştir. Bu çalışmaya göre P2O'dakine benzer şekilde triplet O₂ C₂'nin aktif bölgesindeki protonlanmış histidinden proton alarak aktifleşir ve triplet FADH(radikal)...OOH(radikal) kompleksini oluşturur. Bu aşamada singlet C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşmadan önce spin dönüşümü gerçekleşerek açık kabuk singlet biradikal FADH(radikal)...OOH(radikal) kompleksi oluşur. Aktif bölgedeki serin triptofan histidinin yaptığı hidrojen bağı etkileşimleri OOH'ın flavine paralel durmasını sağladığından OOH'ın C(4a) konumuna bağlanması neredeyse enerji bariyeri olmadan gerçekleşir. İkinci adımda ise OOH C(4a)'dan ayrılırken N5'teki hidrojeni alır. Buradaki hidrojeni kolay alabilmesinin sebebi N5'teki hidrojenin serinle hidrojen bağı etkileşimi yapmış olmasıdır. Bu adımın aktivasyon enerjisi 17.2 kcal/mol'dür. Ayrıca bu

çalışmada singlet, açık kabuk singlet biradikal ve triplet yapıların C(4a)-O arası mesafesi gittikçe azaltılarak enerjileri aynı potansiyel enerji yüzeyinde çizilmiştir. Buna göre de C(4a)-O arası mesafe uzakken yapı triplet haldeyken ilk önce açık kabuk singlet biradikale buradan da çok düşük bir enerji bariyeriyle kapalı kabul singlete geçtiği görülmektedir. Şekil 1.11. de önerilen C₂ mekanizması görülmektedir (Visitsathawong ve ark., 2015). Şekil 1.12. da ise C₂ ve P2O için önerilen mekanizmalar diğer mekanizmalarla karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 1.11. C₂ için önerilen mekanizma.



Şekil 1.12. a) Monooksijenazlar için önerilen mekanizma, b) Oksidazlar için önerilen mekanizma, c) HPAH için önerilen mekanizma.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Materyaller

Bu tez çalışmasındaki kullanılan flavin yapısı PDB bank'tan indirilen 2XFN kodlu enzimin aktif bölgesinden alınıp optimize edilmiştir. Hesaplamalar için Marmara Üniversitesi Hesaplamalı Kimya Laboratuvarındaki linux işletim sistemli iş istasyonları kullanılmıştır. Yine bu laboratuvarındaki windows işletim sistemli PC bilgisayarlar verilen işleri takip etmek için kullanılmıştır. Hesaplamalar Gaussian09 programında yapılmıştır (Frisch ve ark., 2010).

2.2. Kullanılan Yöntem

Bu çalışmada modellenen mekanizmalar Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (YFT), M06-2X/6-31+G(d,p) ve UM06-2X/6-31+G(d,p) hesapsal yöntemleri kullanılarak modellenmiştir. Hesaplamalar tüm mekanizmalarda gaz fazında gerçekleştirilmiştir. (Truhlar ve Zhao, 2006).

2.2.1. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (YFT)

Kimyasal sistemlerin elektronik yapılarını aydınlatmak amacıyla son yıllarda Hohenberg ve Kohn'un geliştirdiği YFT yöntemi hesaplamalarda tercih edilmektedir. YFT yönteminde dalga fonksiyonu elektron yoğunluğuna (ρ) bağlı olarak gösterilir. Toplam elektron yoğunluğu iki yeni fonksiyon ile ifade edilir. Bu fonksiyonlar yoğunluk fonksiyonelleridir. $E^X(\rho)$ değişim terimini simgelerken $E^C(\rho)$ korelasyon terimidir. YFT'de toplam enerjiyi oluşturan terimler aşağıda gösterilmiştir.

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC}$$

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho)$$

E^T = elektronların hareketi sonucu oluşan kinetik enerjiyi,

E^V = çekirdek-elektron çekimlerinin ve çekirdek çiftlerinin birbirini itmesi sonucu oluşan potansiyel enerjiyi,

E^J = elektron-elektron itmesine ait terimi,

E^{XC} = değişim ve korelasyon terimini kapsar.

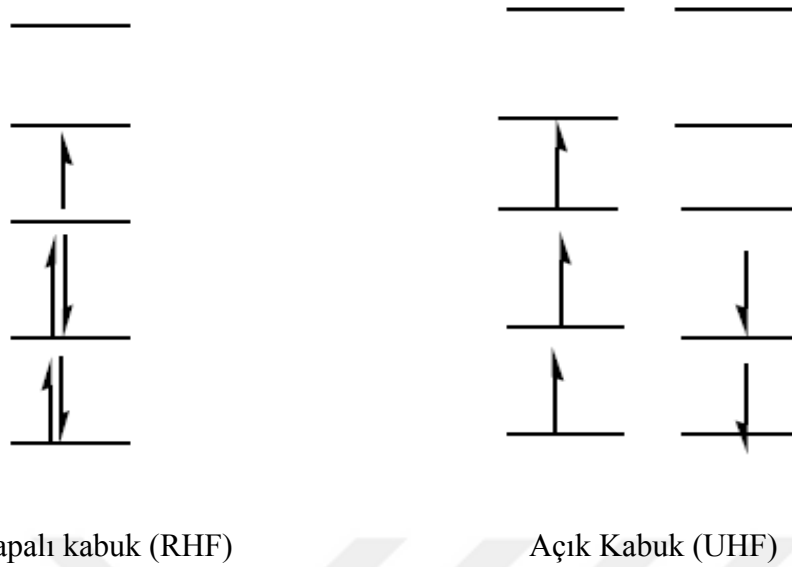
YFT'nin diğer teorilere göre birçok üstün özelliği vardır. Bir sistemde elektronlar etrafındaki diğer elektronlardan etkilenip birbirinden uzak dururlar bu da elektron korelasyonu olarak tanımlanır. Hartree-Fock yöntemi çözümünün zorluğundan ve hesaplamaların uzun süreceğinden dolayı bu etkiyi yeterince hesaplayamaz. YFT bu etkiyi hesaplamalarına katmaktadır ve elektron korelasyonu bu yöntemle daha hassas olarak hesaplanmaktadır. Buna rağmen YFT diğer ab initio yöntemlerinden daha az bilgisayar zamanı harcadığından avantajlıdır (Sarı, 2011; Topal, 2017).

Bu tez çalışmasında YFT yöntemlerinden son yıllarda sıkça kullanılan ve en son geliştirilen yöntemlerden biri olan M06-2X hibrit yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin hesaplamalara dispersiyon etkisini katmasıyla çeşitli tepkimelerin aktivasyon enerjilerinin tahmininde güvenilir sonuçlar verdiği bilinmektedir (Zhao, 2008).

2.2.2. Açık kabuk ve kapalı kabuk hesaplamaları

Kapalı kabuk hesaplamalarında moleküllerdeki bütün elektronların çiftleşmiş olduğu varsayılır. Enerji hesaplanırken oluşturulan moleküler orbitaller ya iki elektronla doludur ya da boştur. Bu nedenle bu hesaplamalarda elektron spinleri hesaba katılmaz. Böyle kapalı kabuk sistemlerde kısıtlanmış Hartree-Fock (RHF) teorisi kullanılır. Bu yöntem radikal sistemlere uygulanamaz.

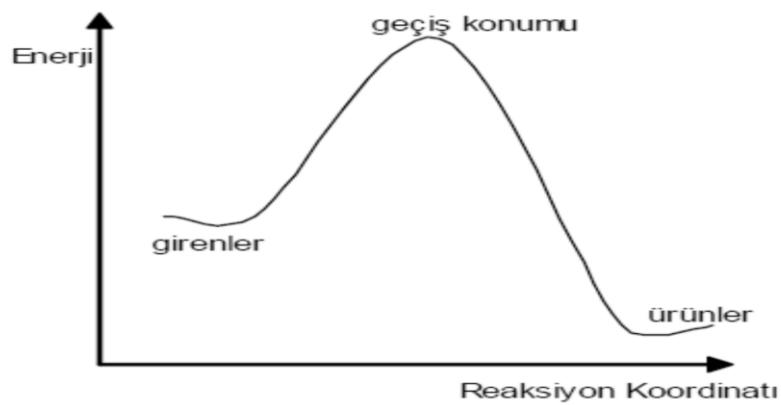
Açık kabuk hesaplamaları için bu tezde triplet ve singlet biradikal olarak modellenen radikal yapılarda kısıtlanmamış yoğunluk fonksiyoneli teorisi (UYFT) kullanılmıştır. UHF veya UYFT yöntemlerinde moleküler orbitaller α ve β olmak üzere iki spin orbitali ile temsil edilirler. Böylece sistemdeki çiftleşmemiş her bir elektronun spin durumu dikkate alınmış olur. (Şekil 2.1). Bu ayrımın yapılmasının önemi spin polarizasyonuna izin vermesidir. Bu orbitaller birbirine çok benzeseler de aynı olmak zorunda değildirler. Bu esneklik nedeniyle daha gerçeğe yakın güvenilir sonuçlar bulunur (Erdem, 2006).



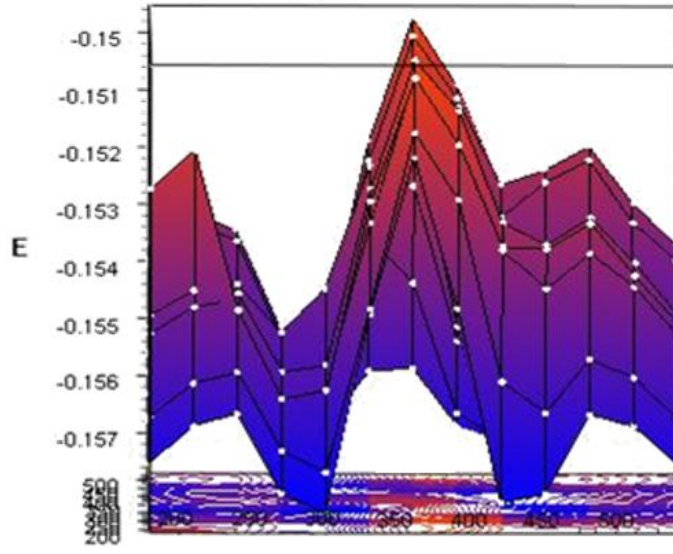
Şekil 2.1. Kapalı kabuk ve açık kabuk moleküler orbitallerin şematik olarak gösterimi.

2.2.3. Potansiyel enerji yüzeyi ve geometri optimizasyonları

Bir moleküler sistemde moleküllerin yapısındaki değişiklik enerjilerinin değişmesiyle sonuçlanır. Potansiyel enerji yüzeyi (PES) bu moleküllerin yapısal olarak değişimini ve enerjilerini gösterir. Orta büyüklükte bir molekülün potansiyel enerji yüzeyi anlaşılacak büyüklükte olduğundan genel olarak kullanılan PES'ler iki veya üç boyutlu olanlardır (Şekil 2.2).



(a)



(b)

Şekil 2.2. (a) İki boyutlu potansiyel enerji yüzeyi, (b) Üç boyutlu potansiyel enerji yüzeyi.

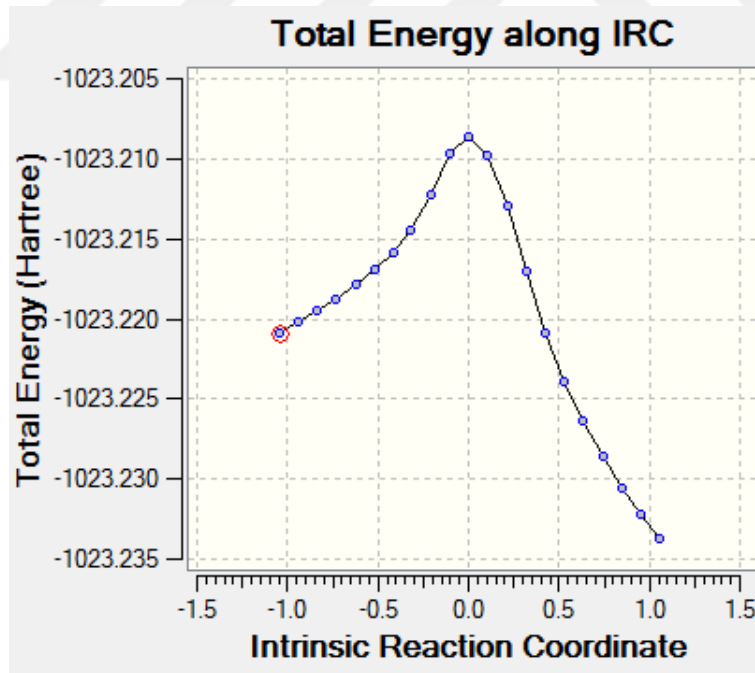
PES'te (şekil 2.2. (b)) minimum ve maksimum noktalar olduğu görülmektedir. Bu noktaların ikisine birden durgun noktalar denmektedir. Minimum noktadan uzaklaştıkça enerji her yönde artar. Minimum noktalarda moleküllerin tüm titreşim frekansları gerçektir ve (+) değerlerdir. PES yüzeyindeki minimum noktaların en düşük enerjisi global minimum noktasıdır. Geçiş konumunda ise PES'te reaksiyon koordinatı hariç diğer bütün yönlerde gidildiğinde enerji artmaktadır. Bu nedenle yalnızca tek bir sanal (-) frekans görülür.

Şekil 2.2. (a)'da iki boyutlu PES'te geçiş konumu görülmektedir. Geçiş konumu ile başlangıç yapısı arasındaki enerji bu adım için gereken aktivasyon enerji bariyeridir. Bu da geçiş konumu teorisine göre reaksiyon hızını belirleyen en önemli faktörlerden biridir. PES'teki geçiş konumu ve minimum noktalar Gaussian09 programı ile hesaplanabilir. Minimum için yapıları optimizasyon hesabı yaptırılarak PES'te bulunabilecekleri en düşük enerji hesaplanmaya çalışılır. Geçiş konumu içinse yapı opt=noeigen anahtar sözcüğü ile optimizasyon ve frekans hesabı yapılarak hesaplanır. Bulunan sonuçların geçiş konumu olup olmadığını anlamak için frekanslarına bakılmalıdır. Sadece bir (-) sanal titreşim veren yapı geçiş konumudur. Geçiş konumunun ilgili reaksiyona uyup uymadığının görmek için ise yapıdaki sanal titreşimin istenen bağların kırılıp oluşmasını yansıtıp yansıtmadığına bakılmalıdır.

(Hratchian ve Schlegel, 2005). Singlet biradikal geçiş yapılarının optimizasyonu için ise opt=noeigen ve guess=mix,always anahtar sözcükleri ile optimizasyon yapılır. Singlet biradikal yapılarda optimize yapılar için dalga fonksiyonunun kararlı olup olmadığı kontrol edilir. Bu amaç için tezde guess=mix,always ve stable=opt anahtar sözcükleriyle hesaplamalar yapılmıştır.

2.2.4. IRC (İçsel Reaksiyon Koordinatı) Hesaplamaları

Bir mekanizmanın reaksiyon koordinatındaki ürün, giren ve geçiş konumu yapılarından emin olmak için IRC hesapları yapılır. IRC hesaplarında her bir geçiş konumundan ileri ve geri yönde ilerlenerek giren ve rneok benzeyen yapılara ulaşılır. IRC adımlarındaki yapılar incelenerek bulunan geçiş konumunun ilgili reaksiyonun geçiş konumu olup olmadığı anlaşılabilir. Aynı zamanda ulaşılan minimum enerjili yapılar optimize edilerek ilgili reaksiyonun ürün ve giren yapıları bulunur. şekil 2.3. te herhangi bir mekanizmanın Gaussian programında hesaplanan IRC grafiği verilmiştir.



şekil 2.3. Gaussian programında hesaplanan bir IRC grafiği rneęi.

2.2.5. İzlenen Çalışma Planı

Bu tez çalışmasında flavinin *si* ve *re*-yüzünden mekanizmalar triplet, açık kabuk singlet biradikal ve kapalı kabuk singlet olarak modellenmiştir. Hesaplamaların hepsi gaz fazında yapılmıştır. Triplet ve açık kabuk singlet biradikal mekanizmalar için YFT/UM06-2X/6-31+G(d,p) yöntemi kullanılmıştır. Kapalı kabuk singlet mekanizmalar için YFT/M06-2X/6-31+G(d,p) yöntemi kullanılmıştır. Mekanizmalardaki giren, ara ürün, ürün ve geçiş konumu yapılarına optimizasyon ve frekans hesabı; bulunan geçiş konumu yapılarına IRC hesabı; açık kabuk singlet biradikal mekanizmadaki yapılara optimizasyon ve frekans hesabından sonra stabilite hesabı yaptırılmıştır. Bu hesaplamalar sonucu bulunan enerjiler giren kompleksine göre relatif enerjiler alınarak hesaplanmış ve PES grafiğinde Gibbs serbest enerjisi olarak gösterilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tümüyle indirgenmiş FADH_2 yapısının oksijen molekülü ile yükseltgenmesine ait tepkime $\text{FADH}_2 (\uparrow\downarrow) + \text{O}_2(\uparrow\uparrow) \rightarrow \text{FAD}(\uparrow\downarrow) + \text{H}_2\text{O}_2 (\uparrow\downarrow)$ flavinin *si*-yüzünden ve *re*-yüzünden ayrı ayrı modellenmiştir. Flavinin *si*-yüzünden modellenen mekanizmalar singlet ve triplet olarak modellenmiştir. Flavinin *re*-yüzünden olan mekanizmalar singlet, triplet ve açık kabuk singlet biradikal olarak modellenmiştir. Daha sonra flavinin *re*-yüzünden olan singlet, triplet ve açık kabuk singlet biradikal olarak modellenen üç mekanizma literatürdeki bilgiler doğrultusunda aynı potansiyel enerji yüzeyi grafiğinde karşılaştırılmıştır.

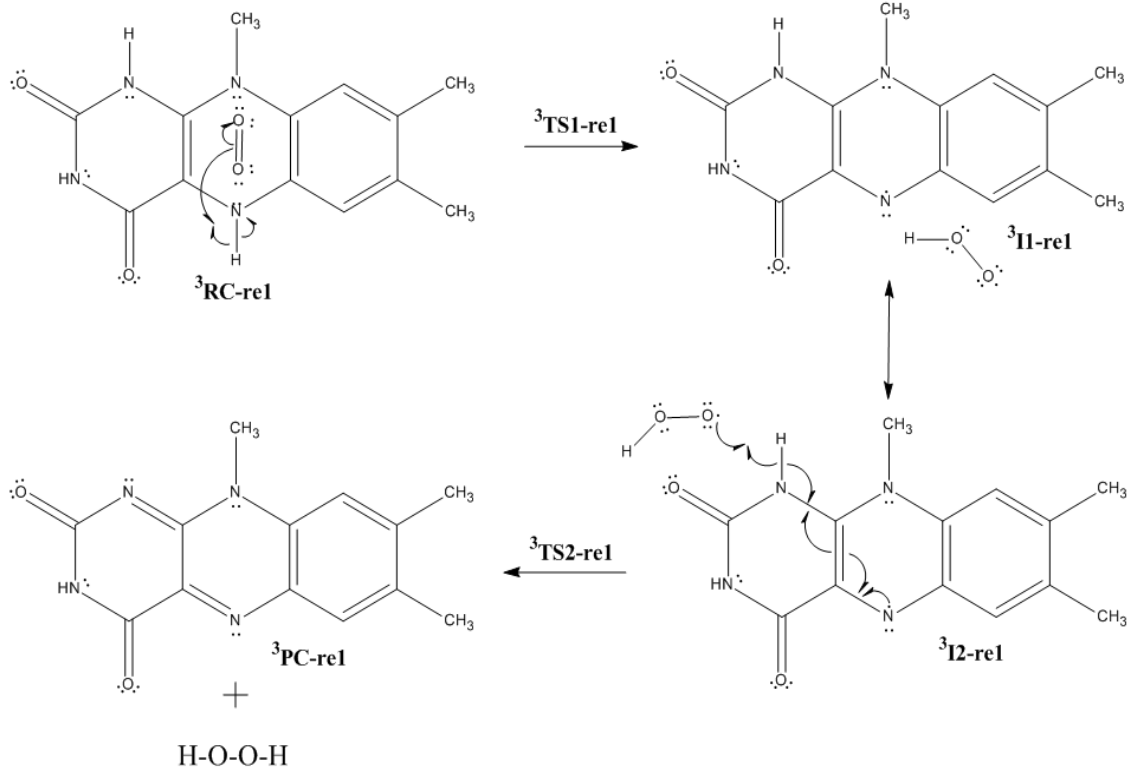
3.1. Flavinin *Re*-yüzünden Modellenen Mekanizmalar

Deneysel ve hesapsal olan çalışmaların çoğunda bu reaksiyon flavinin *re*-yüzünden çalışılmıştır. Bunun en önemli nedeni de genelde deneysel çalışmalarda enzimin aktif bölgesindeki flavin *re*-yüzünden reaksiyonlara girmektedir. Çoğu enzimde flavinin *si*-yüzü enzimdeki aminoasitlerle çevrelenmiştir (Sucharitakul ve ark., 2008; Li ve ark., 1999). Bu nedenle *re*-yüzünden modellenen mekanizmaların deneysel verilerle daha uyumlu olması beklenir. Burada modellenen mekanizmalar daha sonra aynı potansiyel enerji yüzeyinde karşılaştırıldığından yapıları birbirleri ile kıyaslayarak daha iyi anlamak ve yorumlamak amacıyla spin yoğunluklarına da bakılmıştır. Flavinin *re*-yüzünden dört tane mekanizma modellenmiştir.

3.1.1. *Re*-yüzünden 1. Mekanizma (M1)

Re-yüzünden modellenen ilk mekanizma triplet olarak modellenmiştir. Oksijen önce N5'e sonra da N1'e bağlı hidrojenleri alarak iki adımda H_2O_2 oluşumu gerçekleştirmiştir (Şekil 3.1). İlk adımda oksijen N5'in altındaki konuma gelerek hidrojeni almakta ve OOH radikal ara ürünü oluşturmaktadır ($^3\text{I1-re1}$). Şekil 3.2. de görüldüğü gibi bu adımın aktivasyon bariyeri 21.14 kkal/mol'dür. OOH radikal ara ürünü giren kompleksine göre oldukça kararsızdır. Bu nedenle dinamik olarak kolayca yer değiştirebileceği varsayılabilir. İkinci geçiş konumunun geri-IRC hesaplamasından elde edilen ikinci ara ürünün yapısında ($^3\text{I2-re1}$) OOH radikali flavinin yukarısındaki N1 konumuna yakın olarak konumlanmıştır. Bu ara ürünün enerjisinin daha düşük

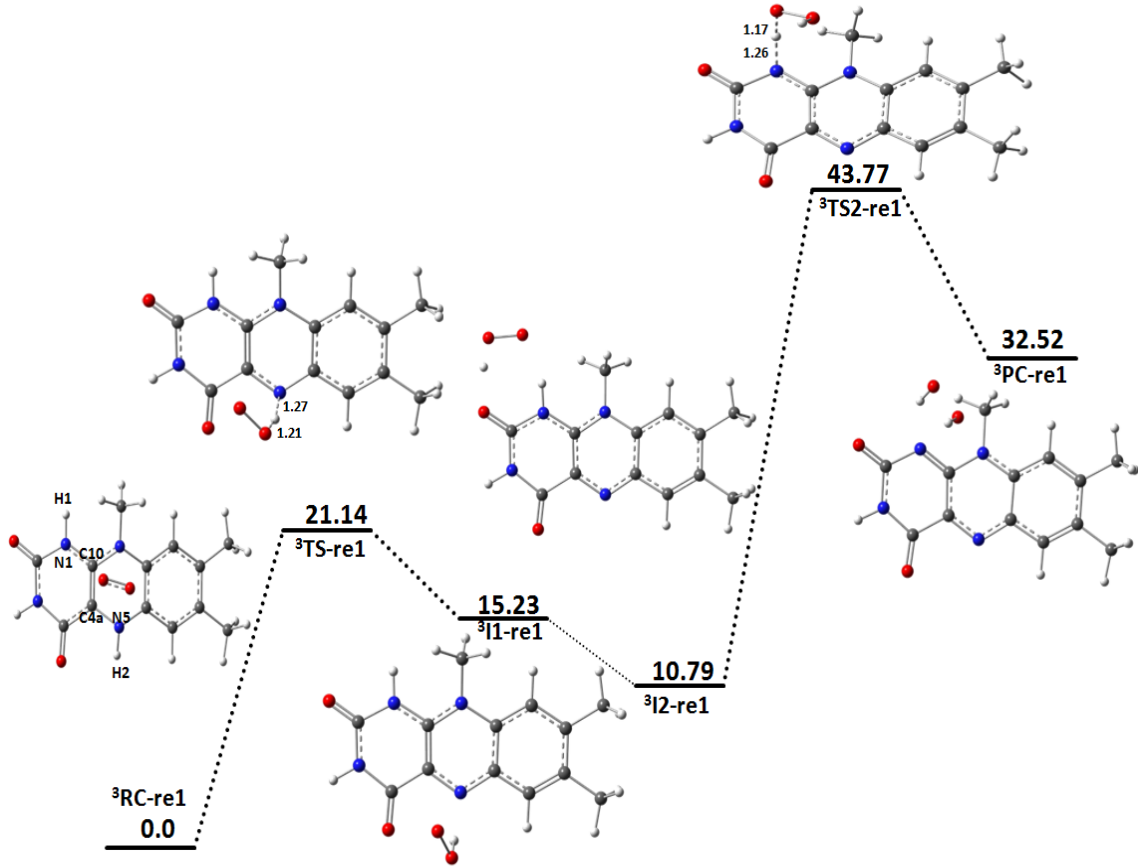
olmasının nedeni flavinin 2. oksijeni ile OOH radikalının hidrojeninin hidrojen bağı yapması olabilir. Reaksiyonun ikinci adımında bu OOH radikali ($^3\text{I2-re1}$) N1'deki hidrojeni alıp sonuç olarak H_2O_2 oluşturmaktadır. Bu adımın aktivasyon bariyeri 43.77 kkal/mol'dür. Optimize edilen yapıların enerjileri Tablo 3.1. de, potansiyel enerji yüzeyindeki optimize edilmiş yapılar Şekil 3.2. de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Re-yüzünden 1. mekanizma.

Tablo 3.1. Re-yüzünden 1. Mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.

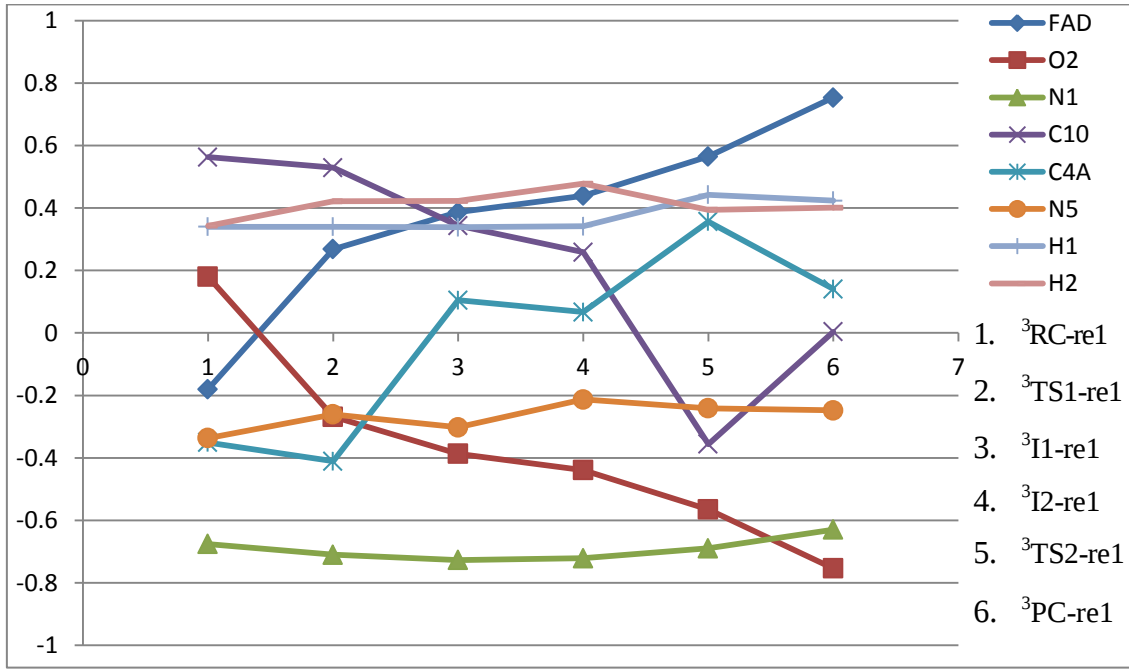
	G(au)	$\Delta G(\text{au})$	$\Delta G(\text{kkal/mol})$
$^3\text{RC-re1}$	-1023.062338	0	0
$^3\text{TS1-re1}$	-1023.028645	0.033693	21.1
$^3\text{I1-re1}$	-1023.038061	0.024277	15.23
$^3\text{I2-re1}$	-1023.045133	0.017205	10.8
$^3\text{TS2-re1}$	-1022.992579	0.069759	43.8
$^3\text{PC-re1}$	-1023.010506	0.051832	32.5



Şekil 3.2. Re-yüzünden 1. Mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kcal/mol).

Bu mekanizmada flavine kovalent bağlı herhangi bir ara ürün tespit edilmemiştir. Literatürde bazı durumlarda tepkimenin hiçbir ara ürün oluşturmadan ilerleyebileceği önerilmektedir (Hernandez-Ortega ve ark., 2012). Oksidaz enzimlerinde bu reaksiyonun flavine kovalent bağlı ara ürün oluşmadan gerçekleştiği söylenmektedir (Prabhakar ve ark., 2002-2003). Modellenen mekanizma bu verilerle uyumludur. Ancak, mekanizmanın aktivasyon bariyerlerine bakıldığında ikinci adımın bariyeri çok yüksek olduğundan bu reaksiyonun oda şartlarında gerçekleşmesi olası görülmemektedir. İkinci adımın enerji bariyerinin yüksek olmasının sebebi $^3\text{I2-re1}$ yapısında oluşan hidrojen bağının kırılıp OOH radikalının yönünü ters tarafa doğru değiştirmesi olabilir. Enzimlerde gerçekleşen FAD yükseltgenme tepkimelerinde enzimin aktif bölgesindeki pozitif yüklü aminoasitlerin reaksiyonun gerçekleşmesinde veya herhangi bir ara ürün oluşmasında etkili olduğu bilinmektedir (Bach ve Mattevi, 2013; Gadda, 2012). Burada modellenen mekanizmanın ikinci adımının aktivasyon bariyerinin yüksek olması hesapların böyle bir çevre etkisinden bağımsız olarak yapılmasından kaynaklanmış

olabilir. Ayrıca, Hernandez-Ortega ve grubu yaptığı çalışmada gaz fazında singlet hesaplamalarda C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü tespit edebilmişken triplet hesaplamalarda bu ara ürünü tespit edememiştir (Hernandez-Ortega ve ark., 2012). Burada modellenen triplet mekanizmada da kovalent bağlı herhangi bir ara ürün tespit edilememesi literatürdeki bu bilgiyle uyushmaktadır. Buna göre, triplet enerji yüzeyinden ilerleyen mekanizmalarda kovalent bağlı bir ara ürün oluşmuyor olabilir. Bu mekanizma için hesaplanan yük değişim grafiği Şekil 3.3. de verilmiştir.



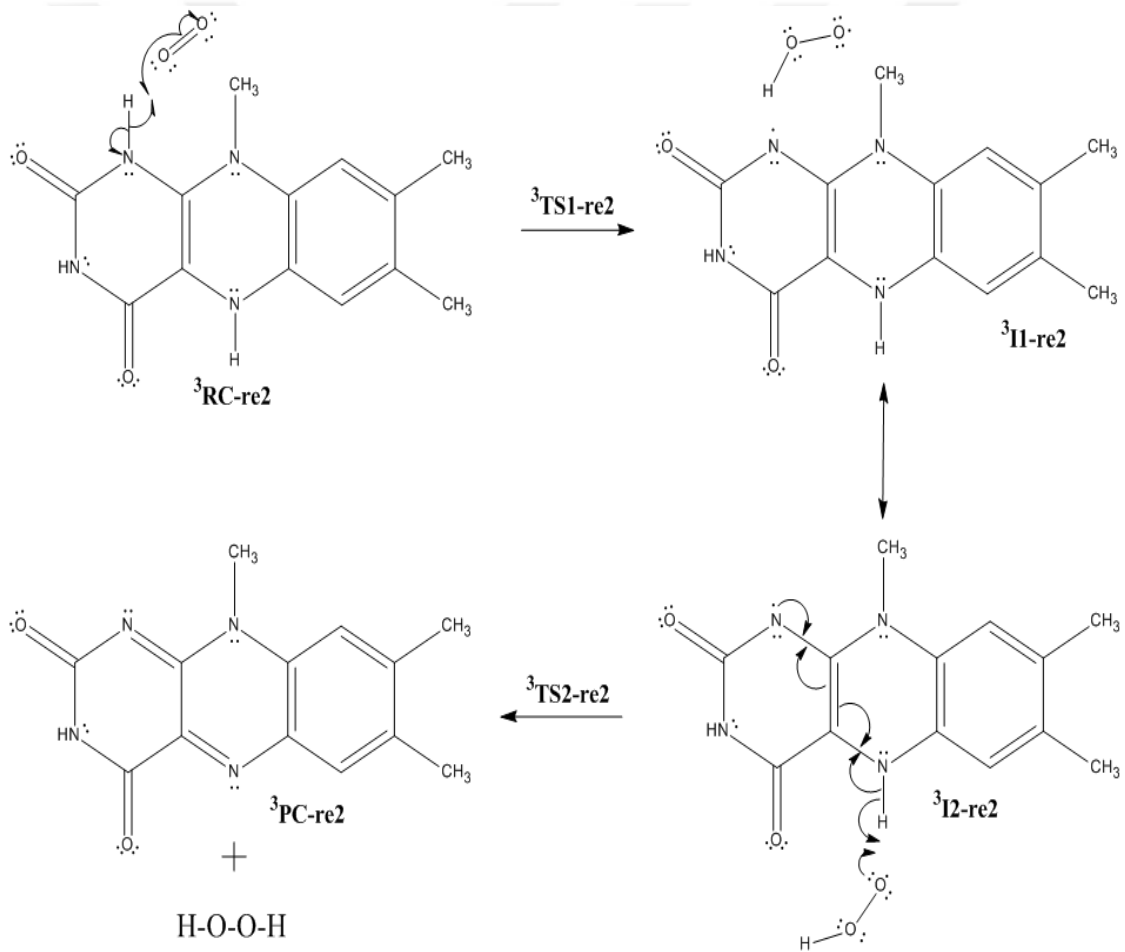
Şekil 3.3. Re-yüzünden 1. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

Yük değişim grafiğine bakıldığında reaksiyonun birinci ve ikinci adımında flavinin toplam yükünde 0.6 ve 0.4'lük (+) yük artışı olurken oksijenin toplam yükünde 0.6 ve 0.4'lük (-) yük artışı olduğu görülmektedir. Buna göre redoks reaksiyonunun önemli bir kısmının reaksiyonun ilk adımında ³I1-re1 oluşurken gerçekleştiği, bir kısmının da ³PC-re1 oluştuğunda gerçekleştiği görülmektedir. Beklenildiği gibi, reaksiyon boyunca flavin halkası elektronlarını oksijene vererek yükseltgenmiş, moleküler oksijen de flavinden elektronları alarak indirgenmiştir. Ayrıca C(4a) konumunun yükü ilk adımda ³TS1-re1 ve ³I1-re1 arasında (+) yöne artarken C(10)'un (+) yükü azalmaktadır. Aynı şekilde ikinci adımda C(4a) konumunun (+) yükü ³I2-re1 ve ³TS2-re1 arasında artarken C(10)'un azalmaktadır. C(4a) ve C(10) yüklerinin birbirini tamamlar şekilde değişimi

C(10)'un bu adımlarda C(4a)'daki elektronları çektiğini göstermektedir. Reaksiyon sonunda ise $^3\text{PC-re1}$ oluştuğunda bu iki konumun yükleri 0'a yakındır. Buradan anlaşılağı üzere redoks reaksiyonu sırasında FAD halkasından oksijen molekülüne elektron transferi C(4a) ve C(10) konumları üzerinden ilerlemektedir. Diğer atomların yüklerinde önemli değışiklikler gözlenmemektedir.

3.1.2. Re-yüzünden 2. Mekanizma (M2)

Re-yüzünden önerilen ikinci mekanizma yine triplet olarak modellenmiştir. M1 mekanizmasının tersine, bu kez oksijen önce N1'den sonra N5'ten hidrojen alarak yine iki adımda H_2O_2 oluşturmaktadır. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Re-yüzünden 2. mekanizma.

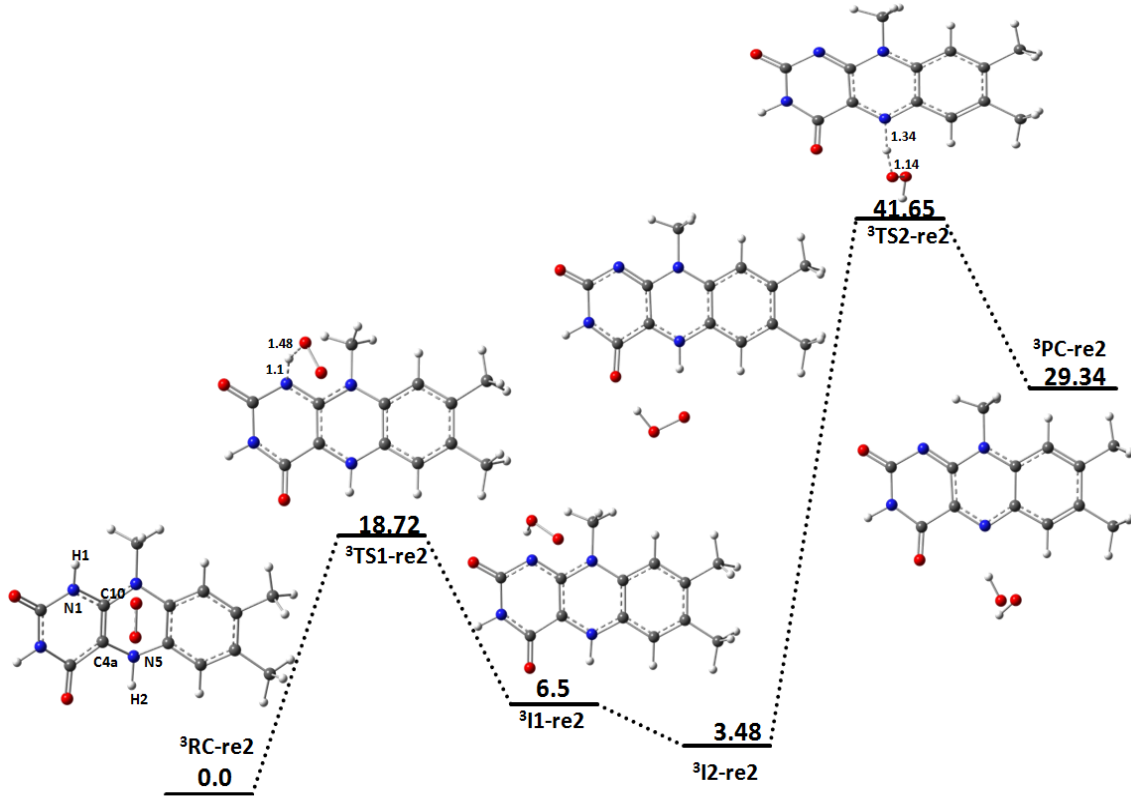
Mekanizmanın ilk adımında moleküler oksijen N1'deki hidrojeni alıp ara ürün olarak $^3\text{I1-re2}$ yapısını oluşturmaktadır. Bu adımın aktivasyon bariyeri 18.72 kkal/mol'dür. Daha sonra OOH radikali N5'in altında konumlanarak $^3\text{I2-re2}$ yapısını oluşturmuştur.

Bu oluşan ikinci ara ürünün (³I2-re2) diğerinden daha düşük enerjili olmasını sebebi flavinin 1. oksijeniyle OOH radikalının hidrojeni arasındaki oluşan hidrojen bağı olabilir. Benzer etkileşim M1'de de görülmektedir. Mekanizmanın ikinci adımında ise OOH radikali N5'teki oksijeni alarak reaksiyon sonunda H₂O₂ (³PC-re2) oluşturmaktadır. Bu adımın enerji bariyeri 41.65 kkal/mol'dür. Optimize edilen yapıların enerjileri Tablo 3.2. de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Re-yüzünden 2. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.

	G(au)	ΔG(au)	ΔG(kkal/mol)
³ RC-re2	-1023.061082	0	0
³ TS1-re2	-1023.031247	0.029835	18.7
³ I1-re2	-1023.050717	0.010365	6.5
³ I2-re2	-1023.055531	0.005551	3.5
³ TS2-re2	-1022.994707	0.066375	41.7
³ PC-re2	-1023.014315	0.046767	29.3

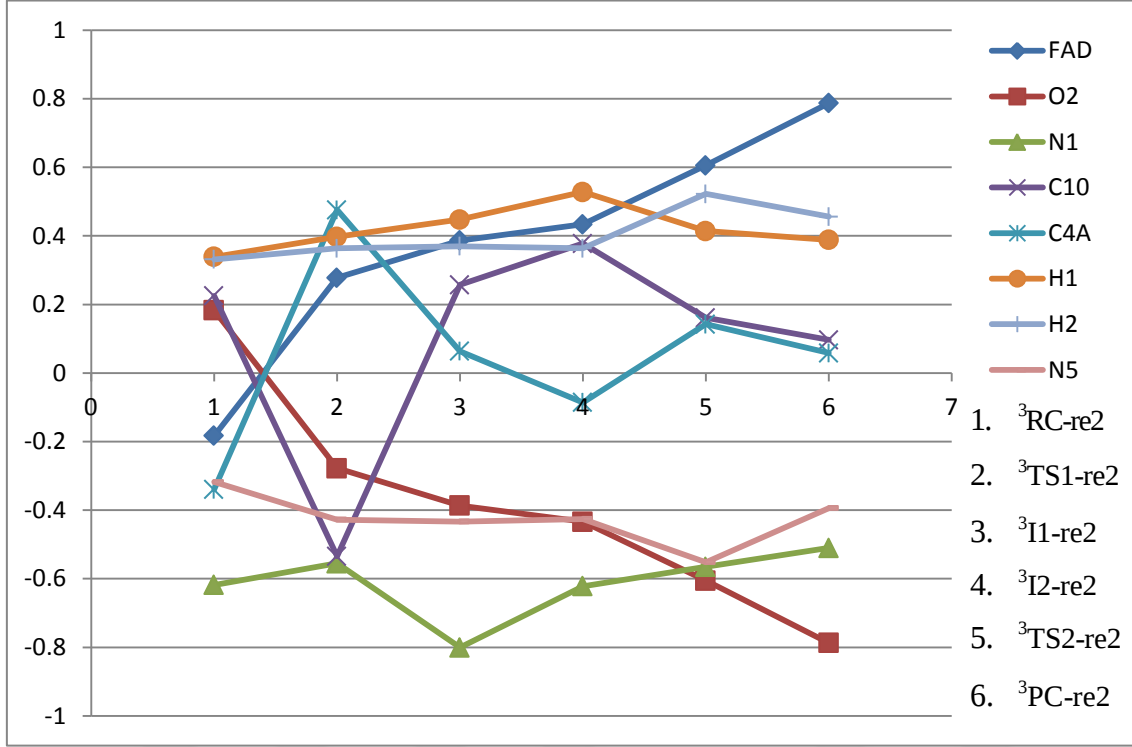
Şekil 3.5. de potansiyel enerji yüzeyindeki optimize edilmiş yapılar gösterilmiştir. Mekanizmada flavine kovalent bağlı herhangi bir ara ürün tespit edilmemiştir. Reaksiyonun ilk adımı oda şartlarında gerçekleşebilirken ikinci adımı yüksek enerjili olduğundan bu mekanizmanın oda şartlarında gerçekleşmesi olası değildir. Bu mekanizmanın M1'e benzer olduğu görülmektedir. İkinci adımın yüksek enerjili çıkması M1'de olduğu gibi hidrojen bağının kırılıp OOH radikalının yönünün değişmesi olabilir. OOH radikali ortamdaki aminoasitlerin etkileşimlerinin eksikliğinden ve pozitif yükün olmamasından bu konumda durmakta zorlanıyor olabilir.



Şekil 3.5. *Re*-yüzünden 2. Mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).

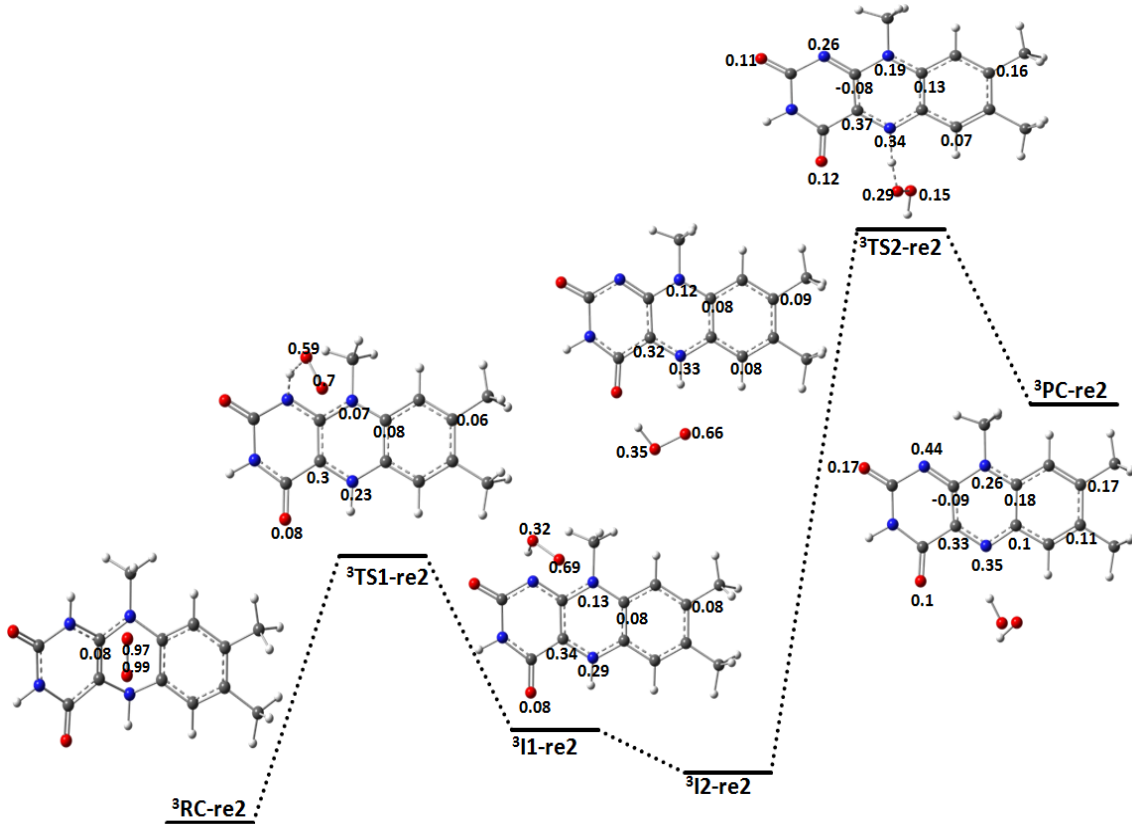
Mekanizmanın yük değişim grafiğine bakıldığında (Şekil 3.6) reaksiyonun birinci ve ikinci adımında flavinin toplam yükünde 0.6 ve 0.4'lük (+) yük artışı olurken oksijenin toplam yükünde 0.6 ve 0.4'lük (-) yük artışı olduğu görülmektedir. Buna göre redoks reaksiyonunun bir kısmının reaksiyonun ilk adımında $^3\text{I1-re2}$ oluşurken gerçekleştiği, bir kısmının da $^3\text{PC-re2}$ oluştuğunda gerçekleştiği görülmektedir. Mekanizmanın yük değişimleri bu yönüyle M1'deki yük değişimlerine benzemektedir. Bu mekanizmada da flavin halkası elektronlarını oksijene vererek yükseltgenmiş, moleküler oksijen de flavinden elektronları alarak indirgenmiştir. İlk adımda moleküler oksijen N1'den hidrojen alırken $^3\text{TS1-re2}$ yapısına kadar C(4a)'da 0.8'lik (+) yük artışı görülürken C(10)'da tam tersi bir durum söz konusudur. Burada C(4a)'daki yükler C(10)'a çekilmektedir. N1'den hidrojen koptuktan sonra $^3\text{I1-re2}$ ara ürünü oluştuğunda C(10)'da 0.8'lik (+) yük artışı olurken C(4a)'da 0.5'lik (-) yük artışı, N1'de ise 0.2'lik (-) yük artışı olmaktadır. Burada C(10)'daki yükler C(4a) ve N1 tarafından çekilmektedir. İkinci adımda ise yüklerde geçiş konumuna kadar net bir değişme vardır ($^3\text{TS2-re2}$). C(4a)'da 0.2'lik (+) yük artışı olurken C(10)'da azalmıştır. Ürün oluştuğunda ise ($^3\text{PC-re2}$)

yüklerin 0'a yaklaştığı görülmektedir. Bu mekanizmada da M1'de olduğu gibi redoks reaksiyonunda elektronlar büyük bir olasılıkla C(4a) C(10) konumları üzerinden transfer olmaktadır. Diğer atomlar göreceli olarak daha az etkilenmektedir.



Şekil 3.6. Re-yüzünden 2. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

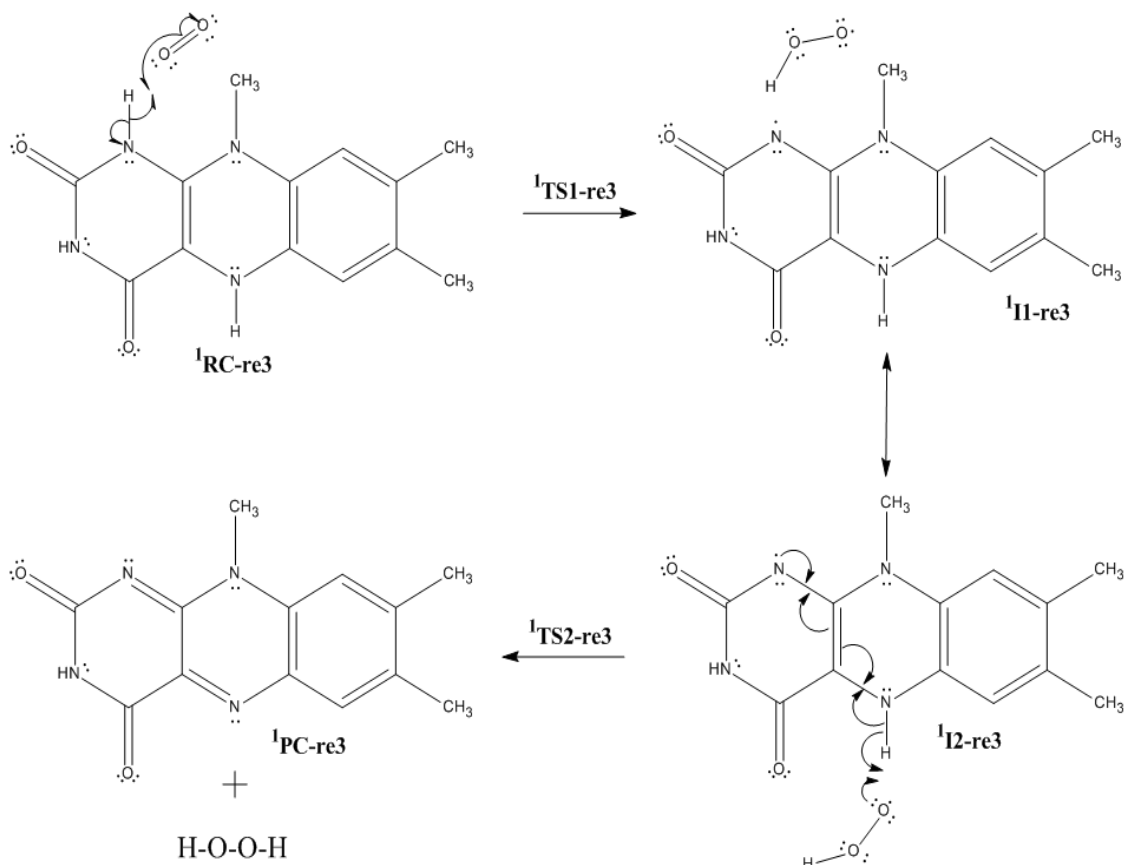
Bu reaksiyon için spin yoğunluklarına bakıldığında (Şekil 3.7) başlangıç kompleksinde (³RC-re2) spin yoğunluklarının 0.97 ve 0.99 olduğu, elektronların spinlerinin aynı yönde ve reaksiyona giren moleküler oksijende durduğu görülmektedir. Tepkimenin triplet oksijen ile başladığı kanıtlanmaktadır. Reaksiyonun ilk adımında oluşan ³I1-re2'de OOH radikalinde toplam 1, FADH halkasında da toplam 1 olmak üzere spin yoğunluğunun paylaşıldığı görülmektedir. Spinlerin ikisi de pozitif yüklü olduğundan bu radikal kompleksinde beklenildiği gibi elektronların biri OOH radikali üzerinde diğeri de flavin halkasında aynı yönlü olarak durmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan üründe ise toplam spin yoğunluğu 2 olup FADH₂ üzerinde olduğu görülmektedir. Mekanizma triplet olduğundan spinler tüm yapılarda aynı yönlü olmalıdır. Bulunan sonuçlar da bunu doğrular niteliktedir.



Şekil 3.7. Re-yüzünden 2. mekanizmaya ait spin yoğunluğu değişim grafiği.

3.1.3. Re-yüzünden 3. Mekanizma (M3)

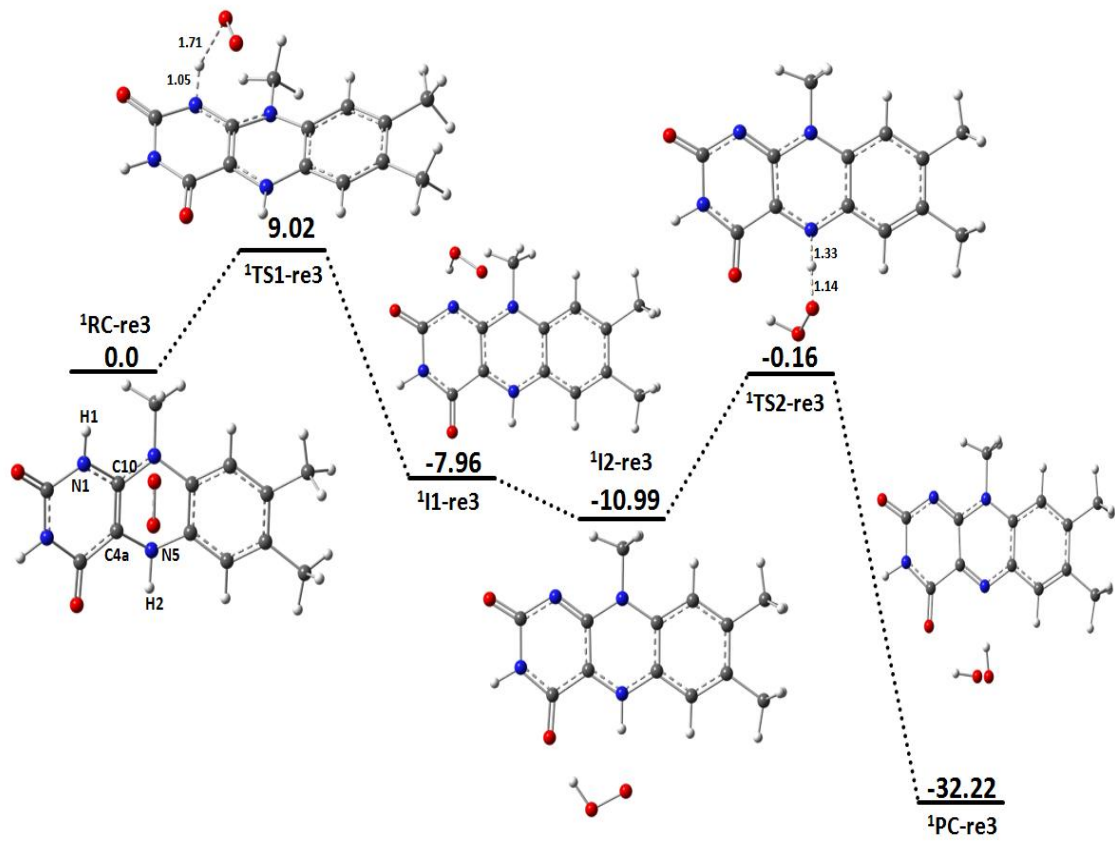
Re-yüzünden önerilen 3. mekanizma açık kabuk singlet biradikal olarak modellenmiştir. Optimize edilen yapıların singlet biradikal olup olmadığı her yapının S^2 değerine bakılarak belirlenmiştir. Modellenen mekanizma iki adımda gerçekleşmektedir (Şekil 3.8). Bu mekanizma da M2'deki gibi moleküler oksijen önce N1'den hidrojeni alıp FADH(radikal)....OOH(radikal) çiftini (1I1 -re3) oluşturmakta; ikinci adımda ise OOH radikali N5'teki hidrojeni alarak reaksiyon sonunda FAD ve H_2O_2 oluşturmaktadır (1PC -re3). İlk adımın aktivasyon bariyeri 9.02 kkal/mol ikinci adımın aktivasyon bariyeri - 0.16 kkal/mol'dür. İlk adımın geçiş konumu (1TS1 -re3) oksijen N1'in üzerinde duracak şekilde sabitlenerek optimizasyonlar yapılmıştır. Bu nedenle bulunan aktivasyon enerjisi bu adım için olabilen en yüksek enerji olarak kabul edilmelidir. Optimize edilen yapıların enerjileri Tablo 3.3. te, potansiyel enerji yüzeyindeki optimize edilmiş yapılar Şekil 3.9. da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Re-yüzünden 3. mekanizma.

Tablo 3.3. Re-yüzünden 3. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.

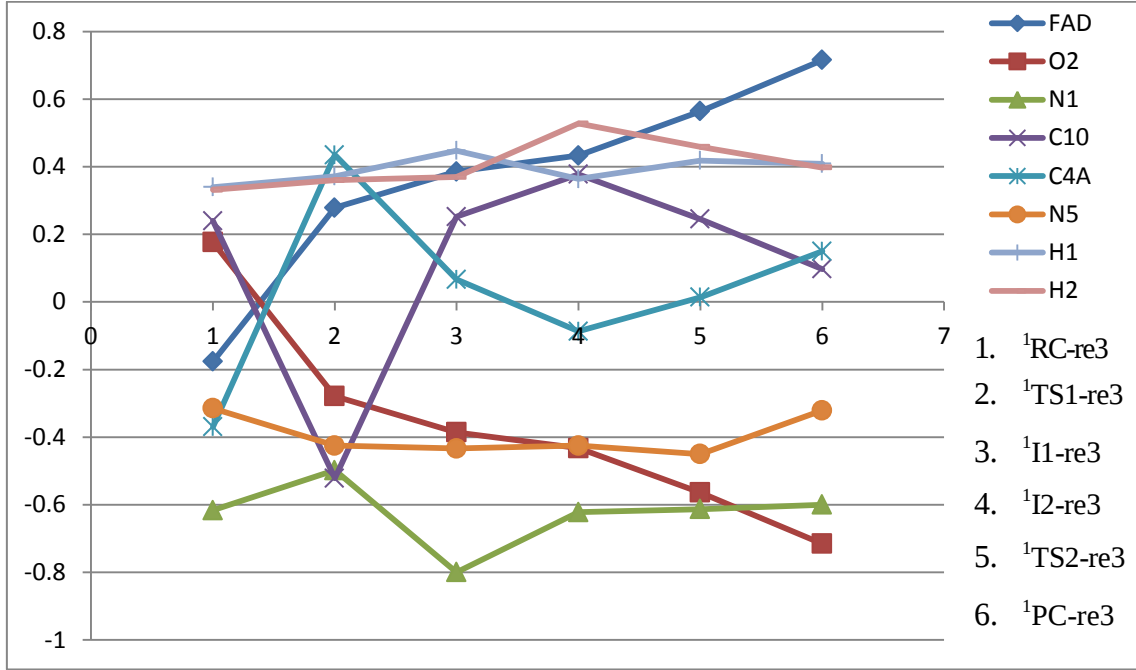
	G(au)	$\Delta G(\text{au})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$
$^1\text{RC-re3}$	-1023.036991	0	0
$^1\text{TS1-re3}$	-1023.022604	0.014387	9.0
$^1\text{I1-re3}$	-1023.049688	-0.0127	-8.0
$^1\text{I2-re3}$	-1023.054517	-0.01753	-11.0
$^1\text{TS2-re3}$	-1023.037257	-0.00027	-0.2
$^1\text{PC-re3}$	-1023.08834	-0.05135	-32.2



Şekil 3.9. *Re*-yüzünden 3. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).

Modellenen mekanizmada flavine kovalent bağlı herhangi bir ürün burada da gözlenememiştir. Bu sonuca göre *re*-yüzünden açık kabuk olarak yapılan hesaplamalarda radikal ara ürün ($\text{OOH}\cdot$) oluşurken flavine kovalent bağlı herhangi bir yapı oluşmadığı söylenebilir. Diğer iki triplet mekanizmaya göre (M1 ve M2) bu mekanizmanın aktivasyon bariyerleri oldukça düşüktür. İkinci geçiş konumunda ($^1\text{TS2-re3}$) aktivasyon bariyerinin düşük olmasının nedeni OOH radikali hidrojeninin flavinin oksijenine doğru yönelmesi ve bu konumda hidrojen bağı oluşturarak daha kararlı bir yapı oluşturması olabilir. Reaksiyonun açık kabuk singlet biradikal olarak başladığı ve ilerlediği düşünülürse bu mekanizma oda şartlarında olabilir. Ancak, singlet flavinin triplet moleküler oksijenle olan reaksiyonunun triplet halde başlayacağı bilinmektedir. Bu nedenle, mekanizmanın M3 yolunu izleyebilmesi için triplet halden singlet hale spin dönüşümü gerçekleşmelidir. Prabhakar ve grubu (2002) tarafından triplet reaktant kompleksinin singlet biradikal reaktant kompleksine dönüşümünün spin-orbit birleşmesi

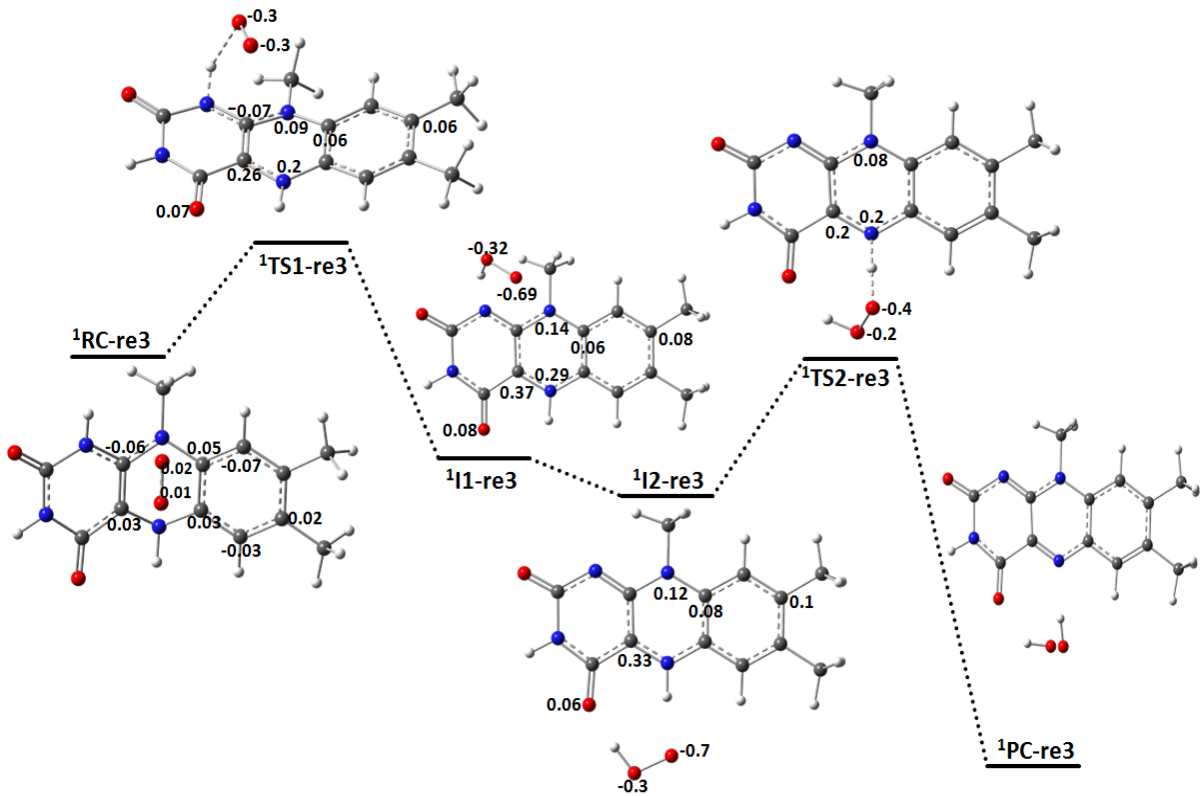
ile mümkün olduğu gösterilmiştir. M3 mekanizmasının reaktant kompleksi $^1\text{RC-re3}$ öncesinde de benzer bir spin dönüşümünün olabileceği düşünüldüğünde tepkimenin diğer basamakları M3 mekanizmasını takip ederek ürünleri oluşturabilir. Mekanizmanın yük değişim grafiği şekil 3.10. da verilmiştir.



Şekil 3.10. Re-yüzünden 3. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O_2) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

Yük değişim grafiği incelendiğinde FAD ve O_2 üzerindeki toplam yük değişimi M1 ve M2 mekanizmalarına benzerdir. Redoks reaksiyonunun bir kısmı reaksiyonun ilk adımında OOH radikal ara ürünü oluşurken, bir kısmı da FAD ve H_2O_2 oluşurken gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada da M2'de olduğu gibi ilk adımda moleküler oksijen N1'den hidrojen alırken $^1\text{TS1-re3}$ yapısına kadar C(4a)'da 0.8'lik (+) yük artışı görülürken C(10)'da tam tersi bir durum söz konusudur. Burada C(4a)'daki yükler C(10)'a çekilmektedir. N1'den hidrojen koptuktan sonra $^1\text{I1-re3}$ ara ürünü oluştuğunda C(10)'da 0.8'lik (+) yük artışı olurken C(4a)'da 0.4'lik (-) yük artışı, N1'de ise 0.3'lik (-) yük artışı olmaktadır. Burada C(10)'daki yükler C(4a) ve N1 tarafından çekilmektedir. İkinci adımda ise C(4a)'da 0.3'lük (+) yük artışı olurken C(10)'da azalmıştır. Ürün kompleksi oluştuğunda ise ($^1\text{PC-re3}$) yükler 0'a yaklaşmıştır. Bu mekanizmada da C(4a) ve C(10) konumlarının önemli olduğu görülmektedir.

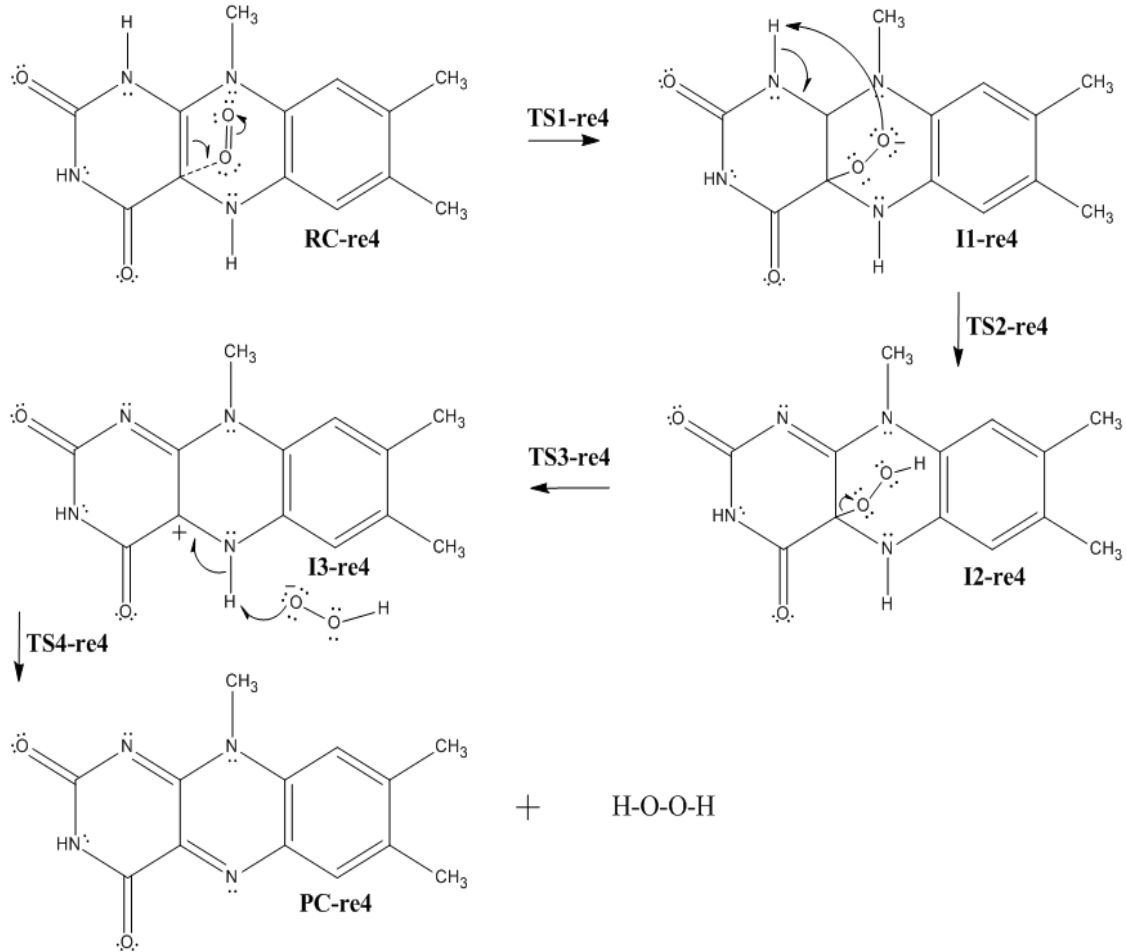
Spin yoğunluğu değişimi incelendiğinde (Şekil 3.11) başlangıç yapısının ($^1\text{RC-re3}$) spinlerinin sıfırdan farklı ancak oldukça düşük olduğu görülmektedir (Spin yoğunluğu < 0.01 olan değerler verilmemiştir). Bu nedenle başlangıç kompleksinin singlet biradikal karakteri ihmal edilebilecek kadar azdır. Tepkime koordinatının ilerleyen yapılarında ise singlet biradikal karakter ortaya çıkmaktadır. Geçiş konumu yapısında ($^1\text{TS1-re3}$) spinler belirginleşerek oksijenlerin üzerindeki toplam spin yoğunluğunun -0.6 olduğu görülmektedir. Oluşan ara üründe ise ($^1\text{I2-re3}$) spin yoğunluğu oksijenler üzerinde toplam -1 'dir. Bu durumda bu ara üründe β spinli bir elektron oksijenler üzerinde dururken α spinli bir elektron da flavin halkasında bulunmaktadır. Mekanizma açık kabuk singlet biradikal şekilde modellendiğinden spinler ayrı orbitallerde ters yöne bakacak şekilde bulunmalıdır. Bu mekanizmadaki bulunan spin yoğunlukları da bunu desteklemektedir. Reaksiyon sonucu oluşan ürüne bakıldığında ise ($^1\text{PC-re3}$) herhangi bir spin yoğunluğu görülememektedir. Buradan oluşan FAD ve H_2O_2 'nin elektronlarının çiftleştiği ve singlet halde bulunmak istediği anlaşılabılır. Son basamakta spin yoğunluğu azalmaya başlayıp, ürüne dönüştüğü noktada yok olarak kapalı kabuk singlet yapıya ulaşmaktadır.



Şekil 3.11. Re-yüzünden 3. mekanizmaya ait spin yoğunluğu değişim grafiği.

3.1.4. Re-yüzünden 4. Mekanizma (M4)

Re-yüzünden modellenen 4. mekanizma kapalı kabuk singlet olarak modellenmiştir. Bu mekanizma dört adımda gerçekleşmektedir (Şekil 3.12).



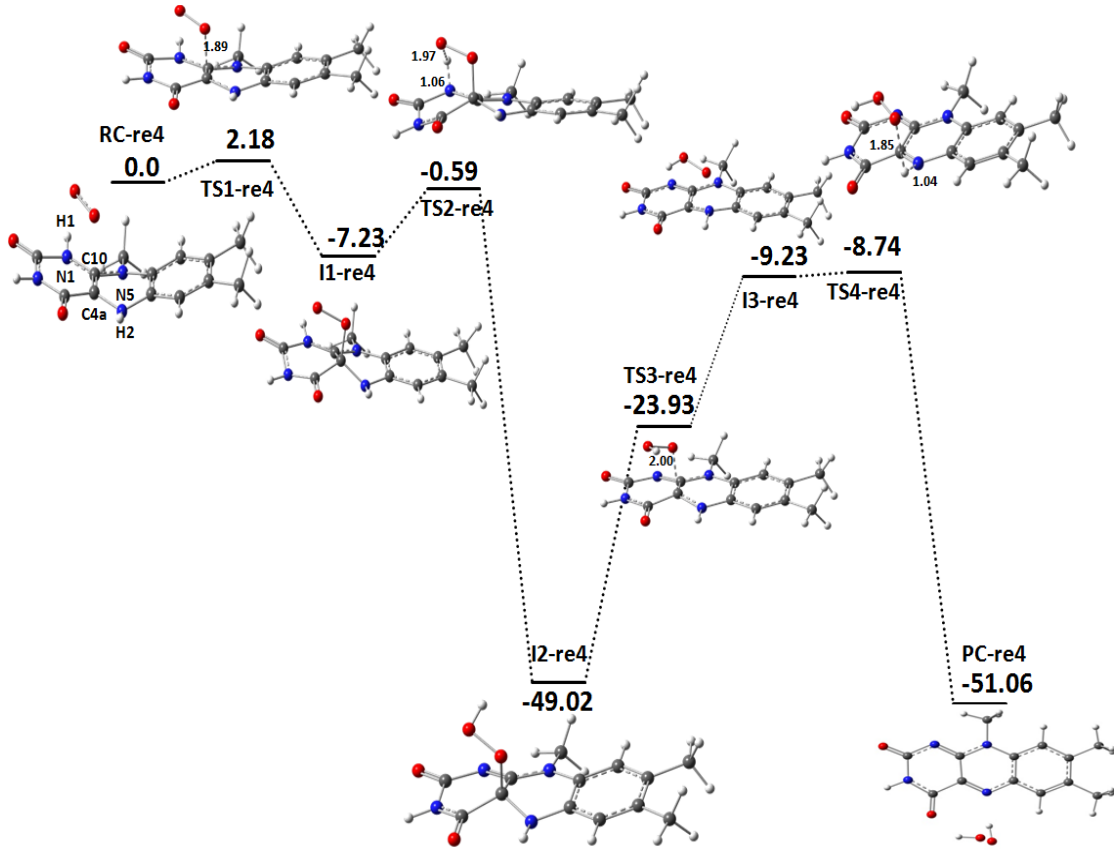
Şekil 3.12. Re-yüzünden 4. mekanizma.

Mekanizmanın ilk adımında moleküler oksijen C(4a)'ya bağlanmakta ve ilk ara ürün olan C(4a)-OO[•] ara ürününü (I1-re4) oluşturmaktadır. Bu adımın aktivasyon bariyeri 2.18 kkal/mol'dür. İkinci adımda C(4a)-OO[•] grubu N1'deki hidrojeni almaktadır. Bunun sonucunda da C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü (I2-re4) oluşmaktadır. İkinci adımın geçiş konumu oldukça kararlı olup giren kompleksine (RC-re4) kıyasla -0.59 kkal/mol'dür. Ayrıca oluşan C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünün çok kararlı olduğu enerjisinin 49.02 kkal/mol düşük olduğundan anlaşılmaktadır. C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü bazı deneylerde gözlenmiştir. Modellenen mekanizmadaki ara ürün oluşumu (I2-re4) literatürle uyushmaktadır (Wongnate ve ark., 2014; Chenprakhon ve ark., 2014).

Mekanizmanın üçüncü adımında oluşan I2-re4 ayrılıp reaksiyon sonunda $\text{OOH}^- \dots \text{FAD}^+$ kompleksi (I3-re4) oluşmaktadır. Bu adımın geçiş konumu ilk giren kompleksinden (RC-re4) 23.93 kkal/mol daha karardır. Bu adımda oluşan I3-re4 ara ürünü dördüncü geçiş konumunun (TS4-re4) geri-IRC hesabı sonucu optimize edilen yapıdır. Reaksiyonun üçüncü adımında üçüncü geçiş konumunun (TS3-re4) ürünü optimize edilememiştir. Bu adımdaki geçiş konumu (TS3-re4) optimizasyonu sırasında sorun yaşandığından oksijen ve C(4a) arası sabitlenerek optimizasyon yapılmıştır. Bu nedenle bu adımdaki aktivasyon bariyerinin olabilecek en yüksek enerjide olduğu göz önüne alınmalıdır. Reaksiyonun dördüncü adımında oluşan OOH^- grubu N5'ten hidrojen alarak H_2O_2 oluşturmaktadır. Oluşan ürün kompleksi (PC-re4), giren kompleksinden (RC-re4) 51.06 kkal/mol daha karardır. Optimize edilen yapıların enerjileri Tablo 3.4. te, potansiyel enerji yüzeyindeki optimize edilmiş yapılar Şekil 3.13. te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Re-yüzünden 4. mekanizma yapılarının M06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.

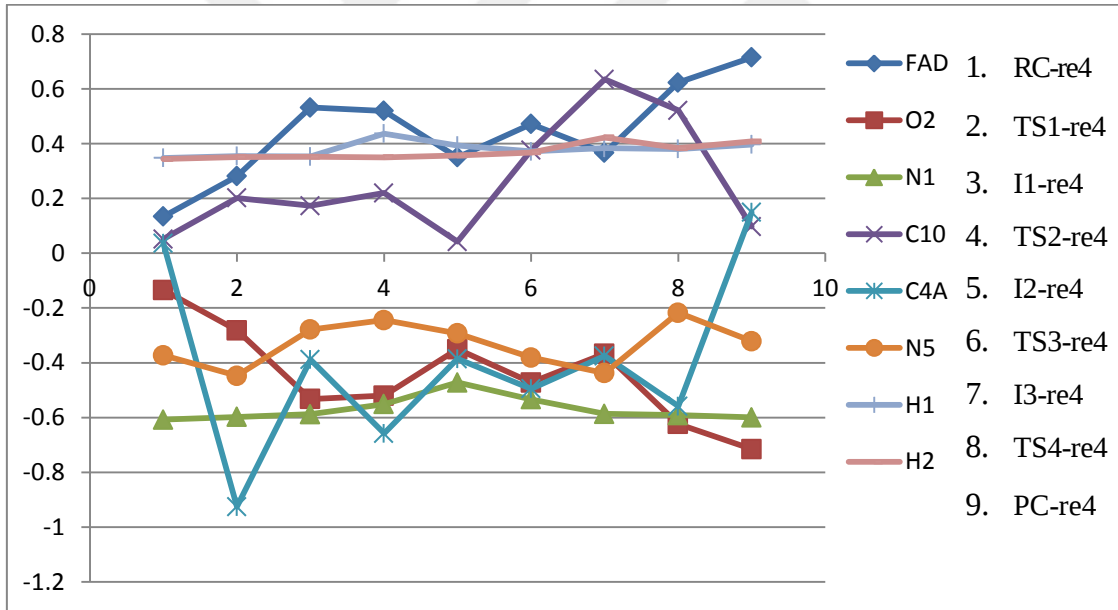
	G(au)	$\Delta G(\text{au})$	$\Delta G(\text{kkal/mol})$
RC-re4	-1023.006981	0	0
TS1-re4	-1023.003504	0.003477	2.2
I1-re4	-1023.018501	-0.01152	-7.2
TS2-re4	-1023.007916	-0.000935	-0.6
I2-re4	-1023.085104	-0.078123	-49.0
TS3-re4	-1023.045122	-0.038141	-23.9
I3-re4	-1023.021692	-0.014711	-9.2
TS4-re4	-1023.020909	-0.013928	-8.7
PC-re4	-1023.088356	-0.081375	-51.1



Şekil 3.13. *Re*-yüzünden 4. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kcal/mol).

Kapalı kabuk sistemi temsil eden bu mekanizmada, *re*-yüzünden açık kabuk olarak modellenen mekanizmaların (M1,M2 ve M3) aksine, kovalent bağlı ara ürün optimize edilebilmiştir. Bu reaksiyon düşük enerji engelleri nedeniyle oda şartlarında gerçekleşebilir gibi görünse de, başlangıçtaki O_2 ve $FADH_2$ triplet kompleksinin spin dönüşümü sonrasında devreye girdiği düşünülebilir. Ancak, tepkime koordinatı O_2 ve $FADH_2$ triplet kompleksinin enerjisine relatif olarak düşünüldüğünde Şekil 3.13'deki I2-re4 ve PC-re4 yapılarının enerjileri bu kadar düşük çıkmayabilir. Beklenildiği gibi, başlangıç kompleksi triplet olarak optimize edildiğinde RC-re4 başlangıç kompleksine göre 33.9 kkal/mol daha düşük enerjili bulunmuştur. Buna göre, hız belirleme basamağı olan TS1-re4 enerjisi 36.1 kkal/mol olacağından bu bariyerin aşılması oda koşullarında olası değildir.

Reaksiyonun yük değişim grafiğine (Şekil 3.14) bakıldığında redoks tepkimesinin önemli kısmının ilk adımda I1-re4 oluşurken gerçekleştiği görülmektedir. Reaksiyondaki en net yük değişimi bu adımda, toplam flavin yükünde 0.5'lik (+) yük artışı ve toplam oksijen yükünde 0.5'lik (-) yük artışı olmasıyla gerçekleşmektedir. C(4a)'nın yükü ilk adımda TS1-re4'e kadar (-) 0.9 artmış, I1-re4 oluştuğunda (-) 0.5 azalmıştır. Redoks reaksiyonundaki en önemli konumun C(4a) olduğu görülmektedir. Bunun sonucunda da oksijen C(4a)'ya reaksiyonun ilk adımında bağlanarak I1-re4 yapısı oluşmuştur. Reaksiyondaki ikinci önemli değişimin son adımda OOH yapısının N5'teki hidrojeni alırken olduğu görülmektedir. Burada toplam flavin yükünde 0.3'lük (+) yük artışı olduğu görülürken toplam oksijen yükünde (-) 0.3'lük yük artışı olduğu görülmektedir. C(10)'da (+) 0.4'lük yük azalışı olurken C(4a)'da tam tersi bir durum vardır. Bu adımda C(10)'un C(4a)'daki yükleri çektiği görülmektedir. Redoks reaksiyonunun büyük bir kısmının da bu adımda olduğu söylenebilir.

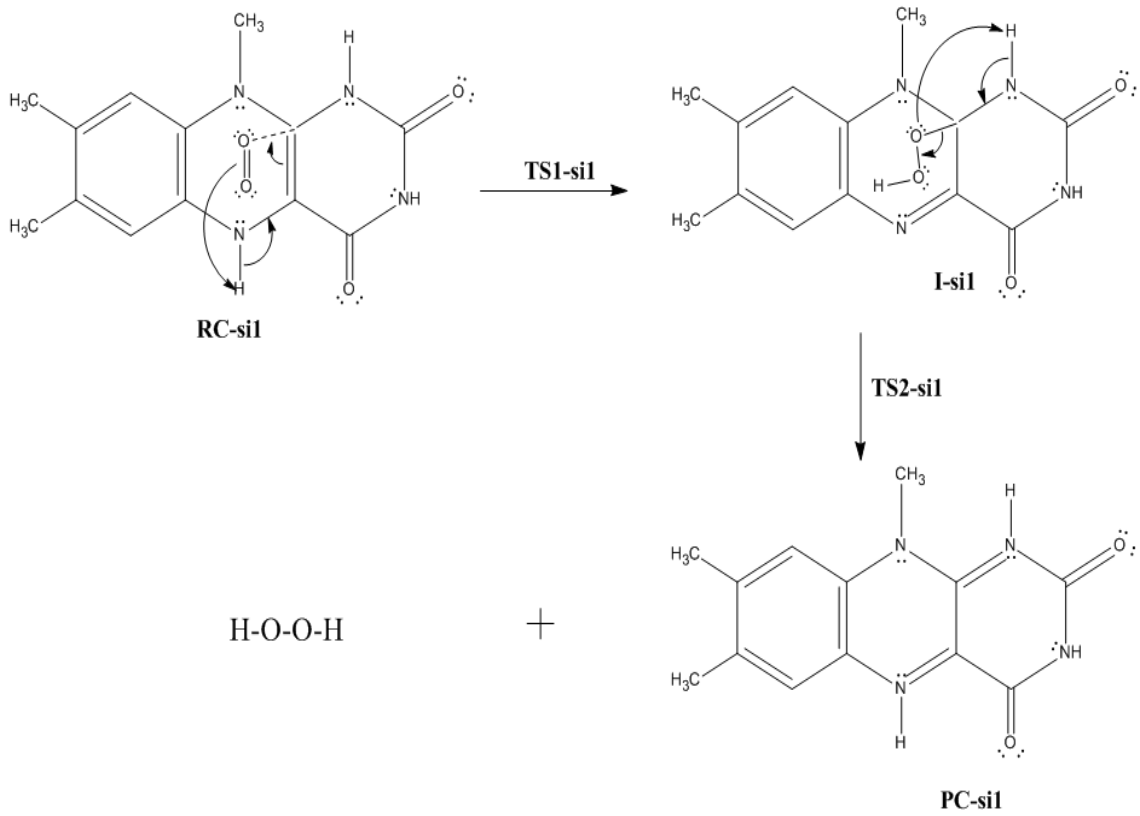


Şekil 3.14. Re-yüzünden 4. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

3.2. Flavinin Si-yüzünden Modellenen Mekanizmalar

3.2.1. Si-yüzünden 1. Mekanizma (M5)

Flavinin *si*-yüzünden modellenen ilk mekanizma kapalı kabuk singlet olarak hesaplanmıştır. Bu mekanizma iki adımda gerçekleşmiştir (Şekil 3.15).

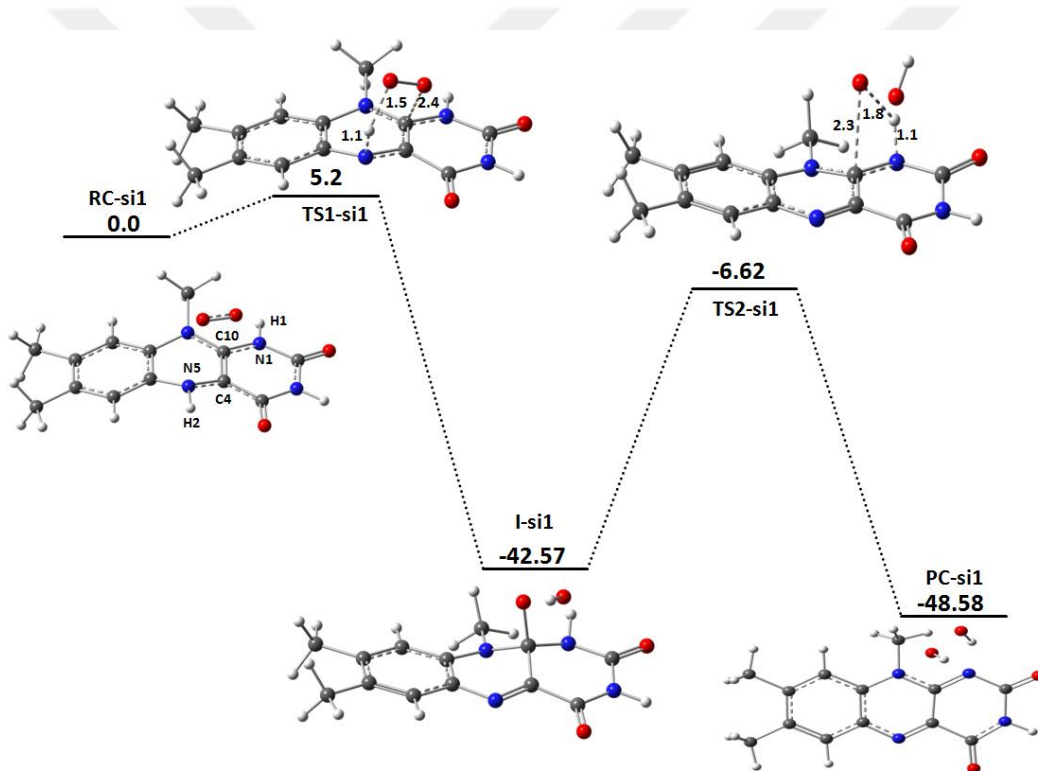


Şekil 3.15. Si-yüzünden 1. mekanizma.

İlk adımda moleküler oksijenin flavinin C(10) konumuna bağlanıp N5 konumundaki hidrojenini aldığı ve I-si1 ara ürününü oluşturduğu görülmektedir. Bu adımın aktivasyon bariyeri 5.2 kkal/mol'dür. Oluşan I-si1 kovalent ara ürün çok kararlıdır ve enerjisi reaktant kompleksine göre -42.57 kkal/mol daha düşüktür. Reaksiyonun ikinci adımında C(10)'a bağlı OOH grubunun ayrıldığı ve ürün olarak FAD ve H₂O₂ oluştuğu görülmektedir (PC-si1). Bu adımda C(10)'a bağlı OOH grubu ayrılırken aynı anda N1'deki hidrojeni almaktadır (TS1-si1). Bu adımın aktivasyon bariyeri -6.62 kkal/mol'dür. Optimize edilen yapıların enerjileri Tablo 3.5. te, potansiyel enerji yüzeyindeki optimize yapılar Şekil 3.16. da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Si-yüzünden 1. mekanizma yapılarının M06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.

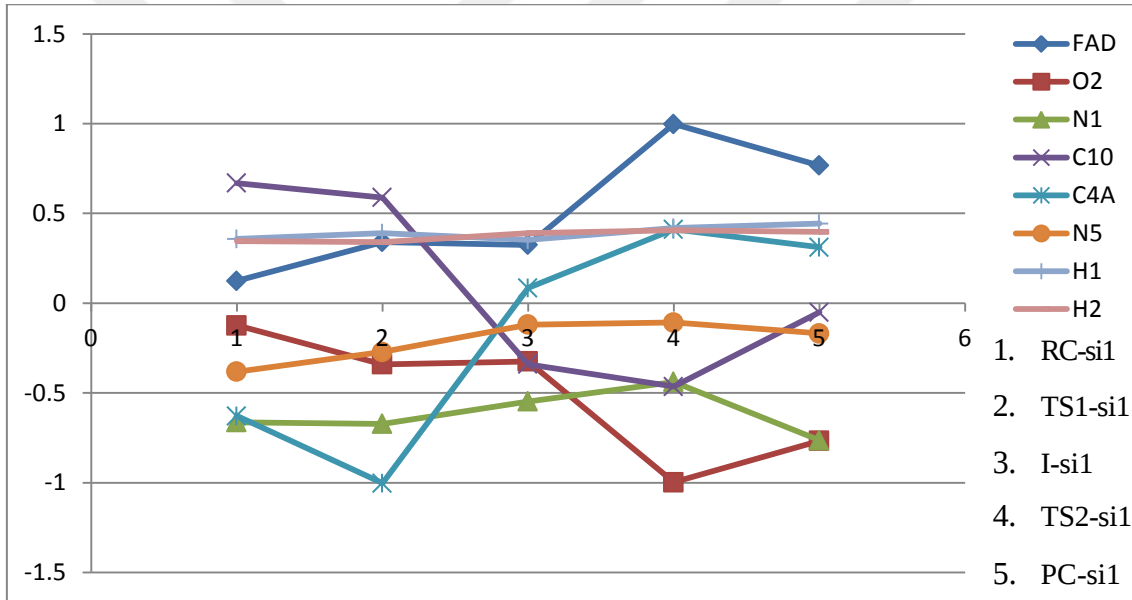
	G(au)	$\Delta G(\text{au})$	$\Delta G(\text{kkal/mol})$
RC-si1	-1023.011928	0	0
TS1-si1	-1023.003636	0.008292	5.2
I-si1	-1023.079777	-0.067849	-42.6
TS2-si1	-1023.022481	-0.010553	-6.6
PC-si1	-1023.089353	-0.077425	-48.6



Şekil 3.16. Si-yüzünden 1. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı ve relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).

Literatürde deneysel olarak bulunan ara ürünün C(4a)-hidroperoksiflavin olduğu bilinmektedir (Mattevi, 2006). Diğer yandan, mekanizmanın hiç ara ürün olmadan da ilerleyebileceği önerilmektedir (Hernandez-Ortega ve ark., 2012). Ancak, literatürdeki çalışmalar çoğunlukla flavinin *re*-yüzünden yapılmıştır. Burada oluşan ara ürünün aktivasyon bariyeri düşük olduğundan flavinin *si*-yüzünden ilerleyen mekanizmada

C(10)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşabilir. Literatürde flavinin *re* ve *si* yüzünün elektrostatik etkileşimlerinin farklı olmadığı sadece çoğu enzimde flavinin *si*-yüzünün enzimin aktif bölgesindeki aminoasitlerle kapalı olduğu için sterik engelden dolayı reaksiyonun *re*-yüzünden devam ettiği söylenmektedir (Wongnate ve ark., 2014). Bu nedenle flavinin *si*-yüzünde sterik engel olmayan enzimlerde bu ara ürün oluşabilir. Oluşan I-si1 ara ürünü ve PC-si1 ürününün aktivasyon bariyerleri düşüktür. M4'teki gibi bu mekanizmanın tamamının singlet olarak ilerlediği düşünüldüğünde mekanizmanın düşük enerji bariyeriyle gerçekleşmesi nedeniyle olası olduğu söylenebilir. Ancak reaksiyon başlangıçta triplet halden singlet hale spin dönüşümü gerektireceğinden ve başlangıç triplet kompleksi M4'teki gibi kararlı olacağından oda şartlarında olası bir mekanizma değildir. Mekanizmaya ait yük değişim grafiği Şekil 3.17. de gösterilmiştir.



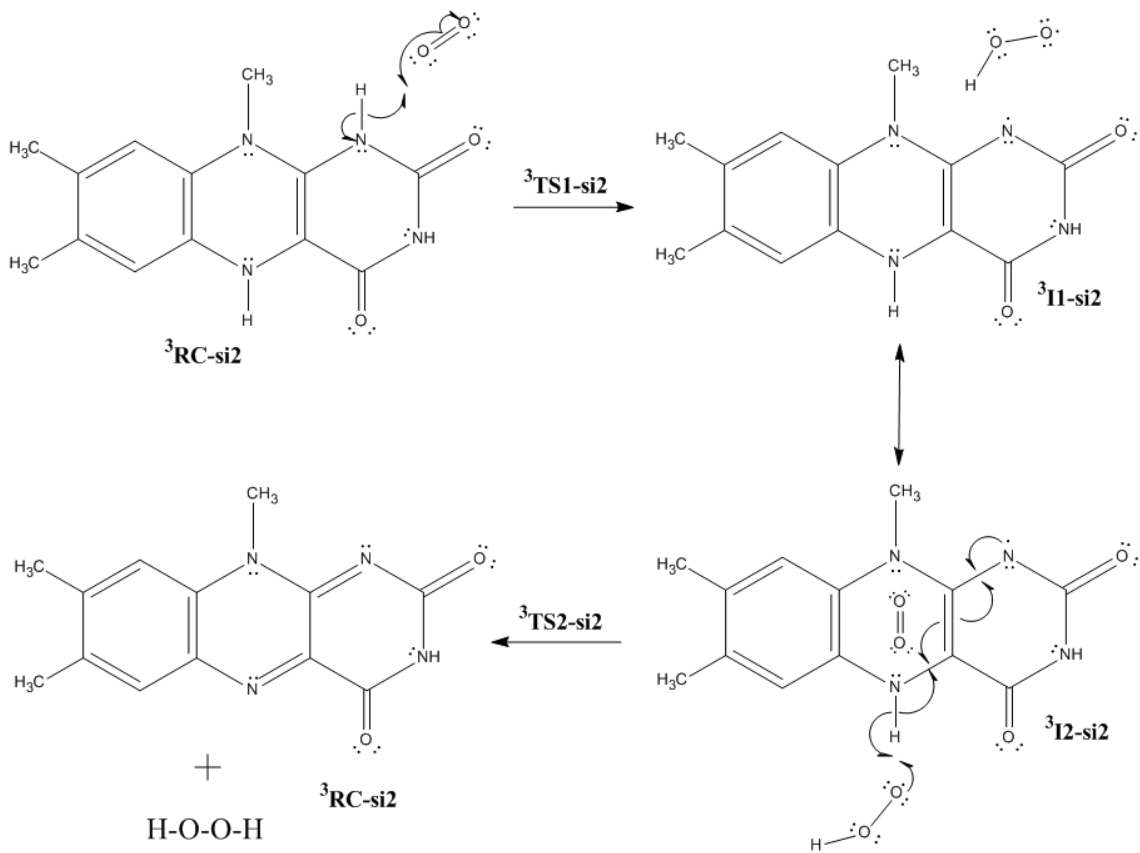
Şekil 3.17. Si-yüzünden 1. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O_2) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

Yük grafiğine bakıldığında reaksiyonun ilk adımında oksijen ve flavinin toplam yüklerinde net bir değişme görülmezken ikinci basamakta flavin halkası yükseltgenirken oksijenin indirgenmesi daha belirgindir çünkü araürün C(10)-hidroperoksiflavin (I-si1) oluştuktan sonra geçiş konumuna (TS2-si1) kadar flavinin toplam yükünde 0.7'lik (+) yük artışı, oksijenin toplam yükünde ise 0.7'lik (-) yük artışı olmaktadır. C(10)'a bakıldığında ilk adımda 0.9'luk bir yük azalması görülürken ikinci adımda 0.3'lük bir yük artışı görülmektedir. C(4a)'da ise bunun tam tersi bir

durum söz konusudur. Buradan da flavinin oksitlenirken oksijen molekülüne aktaracağı elektronların C(10) üzerinde biriken elektronlardan sağlandığı sonucu çıkarılabilir. Reaksiyon boyunca diğer atomların yüklerinde önemli bir değişim gözlenmemektedir.

3.2.2. Si-yüzünden 2. Mekanizma (M6)

Flavinin si-yüzünden modellenen ikinci mekanizma triplet olarak modellenmiştir. Bu mekanizmanın iki adımda gerçekleştiği görülmüştür (şekil 3.18).



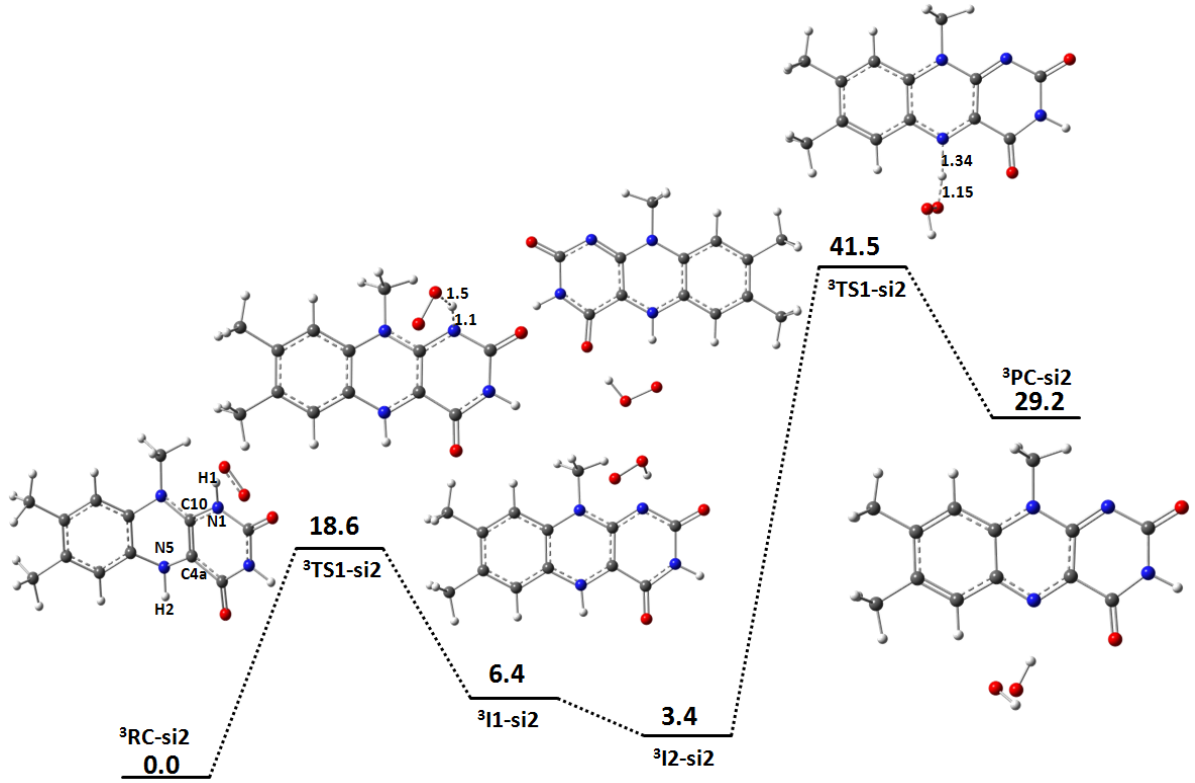
Şekil 3.18. Si-yüzünden 2. mekanizma.

İlk adımda moleküler oksijenin halkaya bağlanmadan N1'deki hidrojeni aldığı görülmektedir. Bu adımın aktivasyon bariyeri 18.6 kkal/mol'dür. Reaksiyonun ikinci adımında OOH grubu N5'teki H'ni almaktadır. Bu adımın aktivasyon bariyeri 41.5 kkal/mol'dür (Tablo 3.6).

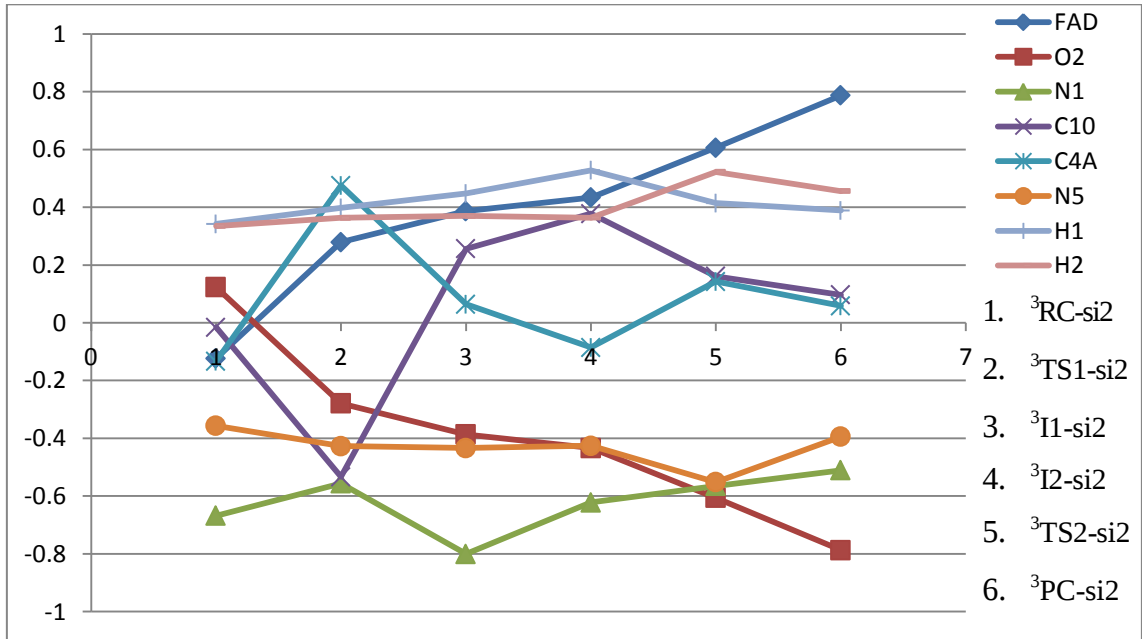
Tablo 3.6. Si-yüzünden 2. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjiler.

	G(au)	$\Delta G(\text{au})$	$\Delta G(\text{kkal/mol})$
$^3\text{RC-si2}$	-1023.060899	0	0
$^3\text{TS1-si2}$	-1023.031255	0.029644	18.6
$^3\text{I1-si2}$	-1023.050719	0.01018	6.4
$^3\text{I2-si2}$	-1023.055531	0.005368	3.4
$^3\text{TS2-si2}$	-1022.994707	0.066192	41.5
$^3\text{PC-si2}$	-1023.014315	0.046584	29.2

Şekil 3.19. da potansiyel enerji yüzeyindeki optimize edilmiş yapılar gösterilmiştir. Kovalent bağlı bir ara ürün optimize edilememiştir. Birinci adımın sonunda oluşan ara ürünlerdeki OOH radikali flavinin N1 konumunun üzerinde durmaktadır ($^3\text{I1-si2}$). Reaksiyondaki ikinci ara üründe OOH grubu N5'teki hidrojeni almak için flavinin alt konumuna gelmektedir ($^3\text{I2-si2}$). Bu ara ürünün enerjisi daha düşüktür. Çünkü OOH radikalının hidrojeni flavinin oksijenine doğru yönelmiştir ve hidrojen bağı yapmaktadır. Benzer ara ürün yapıları M2 ve M3 mekanizmalarında da optimize edilmiştir ve bu yapılar genellikle N1---OOH yapılarından 3 kkal/mol daha karardır. Bu nedenle, ikinci adımın aktivasyon bariyerini yükselten sebeplerden biri olabilir. Bu mekanizma *re*-yüzünden modellenen triplet ve açık kabuk singlet biradikal mekanizmalara (M1, M2 ve M3) oldukça benzemektedir. Mekanizmanın enerjileri M2 ile neredeyse aynıdır, tek fark oksijenin N1'e saldırırken farklı yüzlerden saldırmasıdır. Literatürde flavinin *si* ve *re*-yüzlerinin elektronik konfigürasyonunun aynı olduğundan ve benzer reaksiyonları aynı şekilde yapabileceğinden bahsedilmektedir. Bu iki mekanizmada da enerjilerin çok yakın bulunması literatürle uyumaktadır (Wongnate ve ark., 2014). Bu mekanizmada ikinci basamağının aktivasyon bariyeri yüksek bulunmuştur ve oda şartlarında gerçekleşmesi zordur. Mekanizmanın yük değişim grafiği beklenildiği gibi, *re*-yüzünden triplet olarak modellenen 2. mekanizmayla (M2) neredeyse aynıdır (Şekil 3.20).



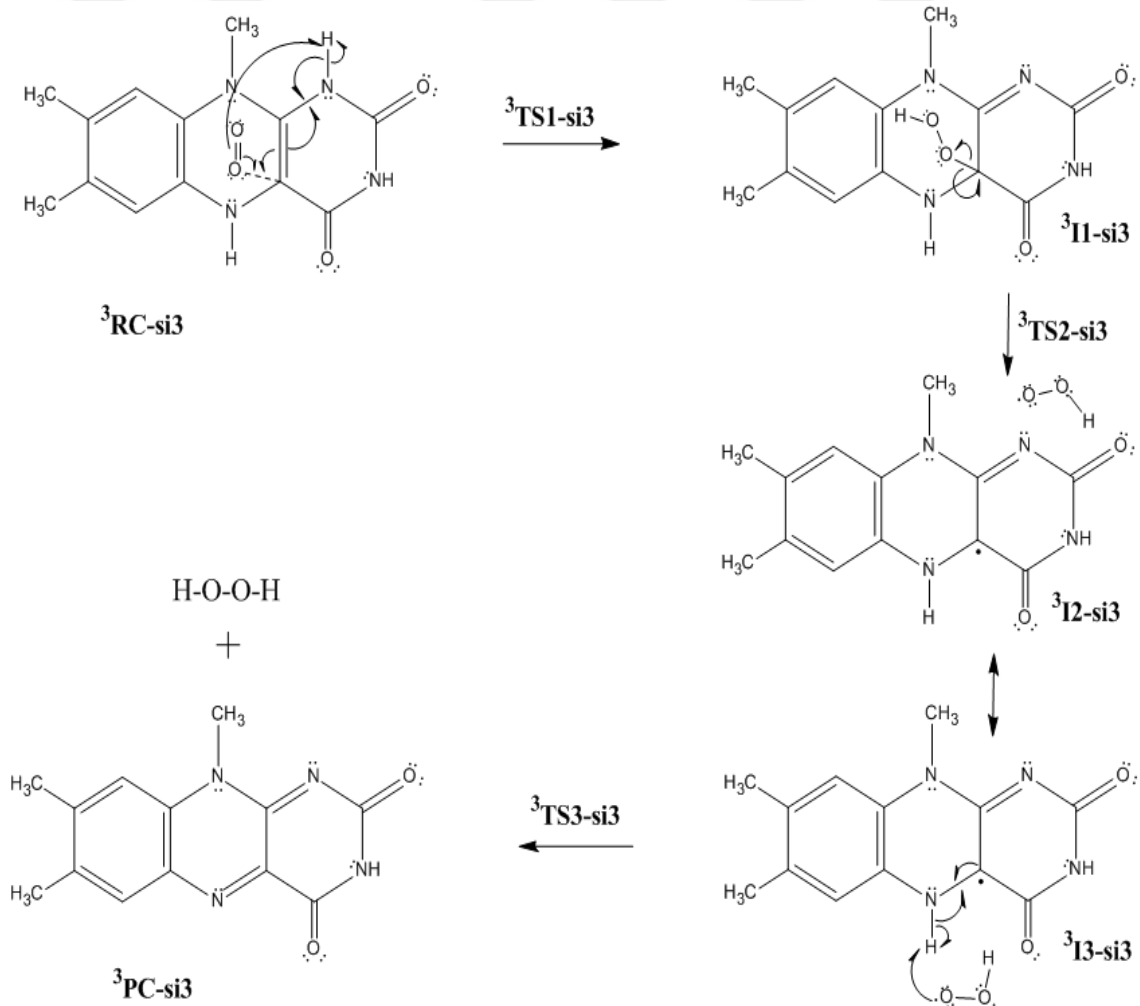
Şekil 3.19. Si-yüzünden 2. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kcal/mol).



Şekil 3.20. Si-yüzünden 2. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O₂) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

3.2.3. Si-yüzünden 3. Mekanizma (M7)

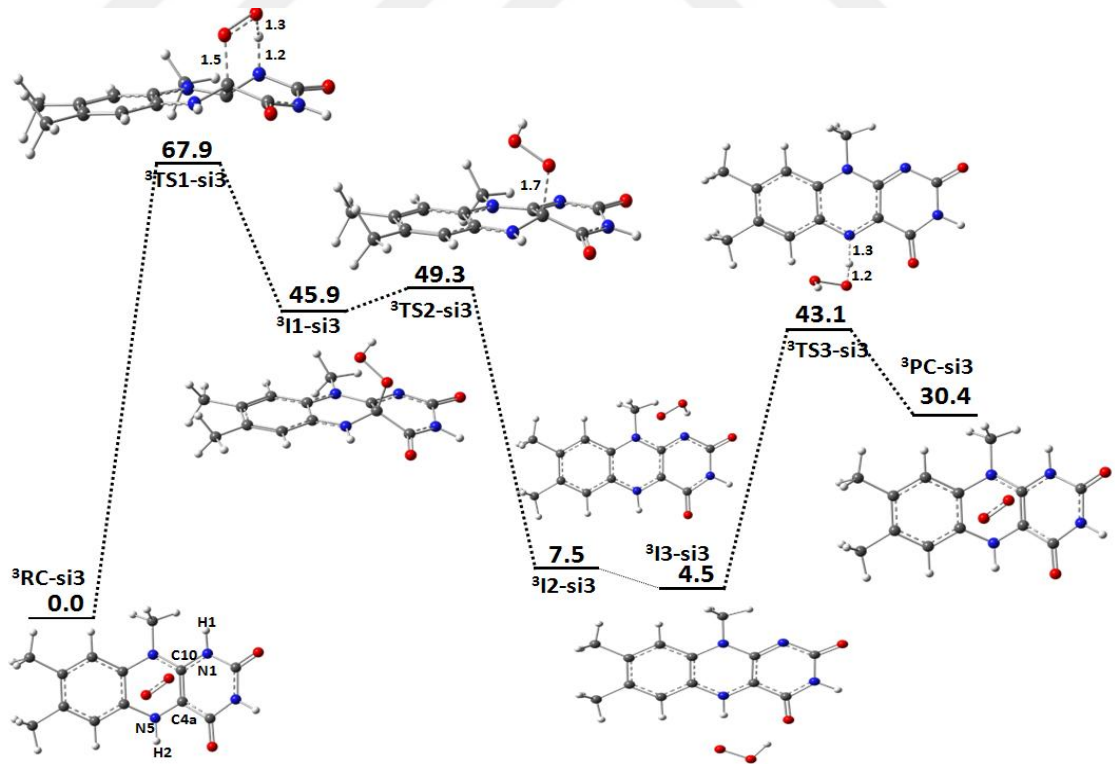
Flavinin *si*-yüzünden modellenen üçüncü mekanizma triplet olarak modellenmiştir. Bu mekanizma üç adımda gerçekleşmektedir (Şekil 3.21). Bu mekanizmaya göre ilk adımda oksijen C(4a)'ya bağlanırken aynı adımda N1'deki hidrojeni almıştır. Bu adımın aktivasyon bariyeri 67.9 kkal/mol bulunmuştur. İkinci adımda C(4a)'daki OOH grubu flavinden ayrılarak ³I2-si3 ara ürünü oluşmuştur. Bu adımın aktivasyon bariyeri 49.3 kkal/mol'dür. Daha sonra OOH grubu N5'in altında konumlanmış (³I3-si3) ve N5'teki H'ni alıp H₂O₂ oluşturmuştur. Bu adımın aktivasyon bariyeri 43.1 kkal/mol'dür. Optimize edilen yapıların enerjileri Tablo 3.7. de, potansiyel enerji yüzeyindeki optimize edilmiş yapılar Şekil 3.22. de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. Si-yüzünden 3. mekanizma.

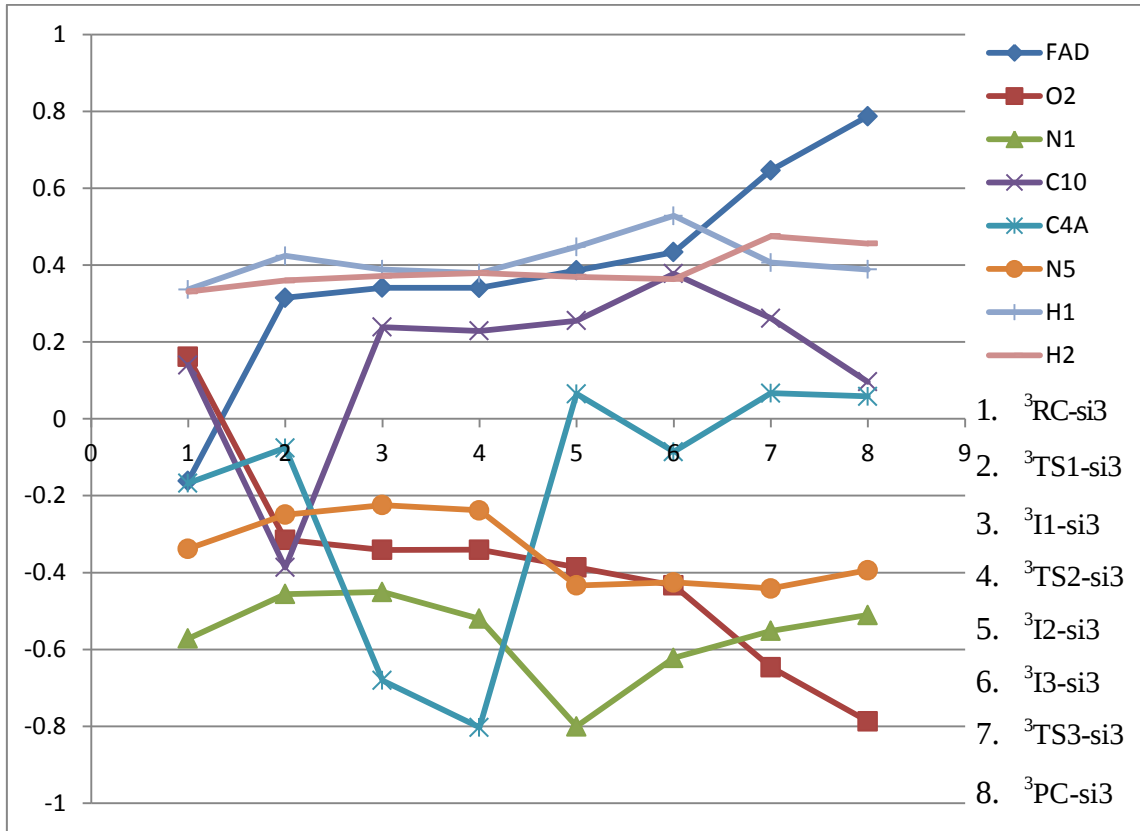
Tablo 3.7. Si-yüzünden 3. mekanizma yapılarının UM06-2X/6-31G(d,p) ile optimizasyonundan elde edilen Gibbs serbest enerjileri ve relatif enerjileri.

	G(au)	$\Delta G(\text{au})$	$\Delta G(\text{kkal/mol})$
$^3\text{RC-si3}$	-1023.062746	0	0
$^3\text{TS1-si3}$	-1022.954519	0.108227	67.9
$^3\text{I1-si3}$	-1022.98956	0.073186	45.9
$^3\text{TS2-si3}$	-1022.984184	0.078562	49.3
$^3\text{I2-si3}$	-1023.050704	0.012042	7.6
$^3\text{I3-si3}$	-1023.055533	0.007213	4.5
$^3\text{TS3-si3}$	-1022.994047	0.068699	43.1
$^3\text{PC-si3}$	-1023.014308	0.048438	30.4



Şekil 3.22. Si-yüzünden 3. mekanizmaya ait reaksiyon koordinatı relatif Gibbs serbest enerji değerleri (kkal/mol).

Mekanizmanın İlk adımında C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününün oluştuğu görülmektedir ($^3I1-si3$). Yüksek enerji bariyerleri nedeniyle bu mekanizma oda şartlarında olası değildir. İlk adımın enerjisinin yüksek olmasının sebebi oksijenin *si*-yüzünden C(4a) konumuna yakın durmak istememesi olabilir. *Si*-yüzünden bulunan singlet kapalı kabuk mekanizmada (M5) ara ürün düşük bir aktivasyon enerjisiyle gerçekleşmiştir ve C(10)'a bağlı haldedir. Flavinin *si*-yüzünden yapılan hesaplamalara bakıldığında reaksiyonun C(4a)'ya değil C(10)'a bağlı ara ürün oluşturmalarının daha kolay olduğu görülmüştür. Mekanizmaya ait yük değişim grafiği Şekil 3.23. de gösterilmiştir.



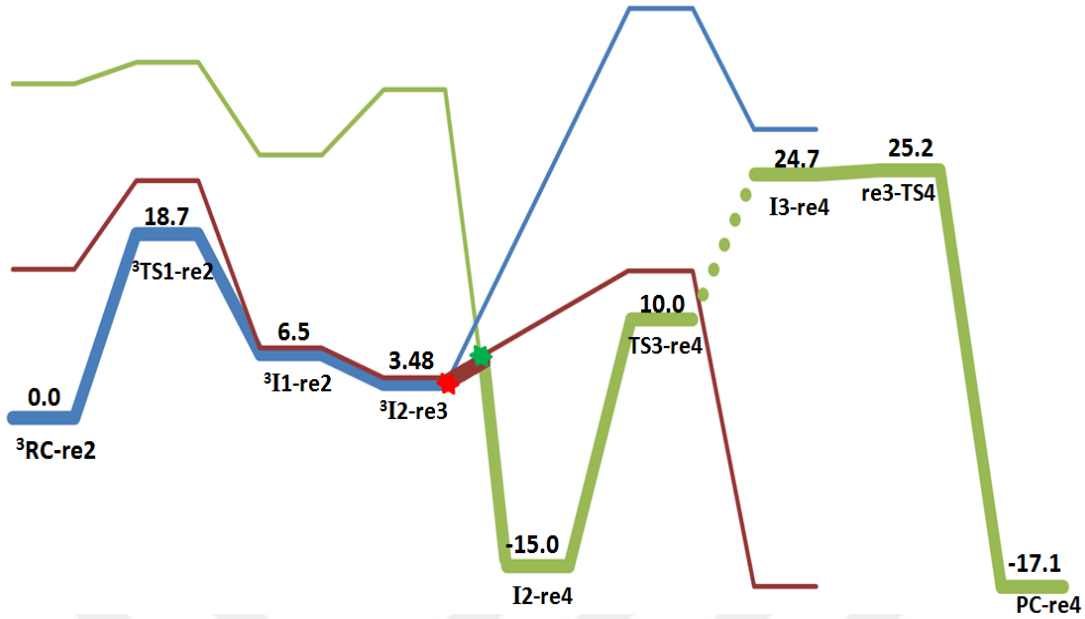
Şekil 3.23. *Si*-yüzünden 3. mekanizma için flavin halkası (FAD), moleküler oksijen (O_2) ve önemli atomlara ait yüklerin reaksiyon koordinatı boyunca değişimi.

Yük değişim grafiğinde toplam flavin ve oksijen yük değişiminin en çok C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşurken ilk adımda olduğu görülmektedir. Burada flavinin toplam 0.5 kadar (+) yük artışı olurken oksijenin toplam yükünde 0.5 kadar (-) yük artışı olmaktadır. Burada flavinin yükseltgendiği görülmektedir. Ayrıca C(4a)'da 0.5'lik (-) yük artışı görülürken C(10)'da ve N1'de (+) yük artışları görülmektedir. Bu

bölgelerdeki elektronlar C(4a) tarafından çekilmiş, sonuç olarak flavine kovalent bağlı C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşmuştur. Flavin ve oksijenin toplam yükünde diğer önemli fark reaksiyonun son adımında gözlenmektedir. Bu adımda flavinin toplam yükünde 0.4'lük (+) yük artışı varken toplam oksijen yükünde tam tersidir. C(4a)'dan OOH ayrılırken de C(4a)'da toplanan elektronların N1 tarafından çekildiği görülebilir. Redoks reaksiyonunun en önemli kısımlarının ilk ve son adımlarda olduğu grafikten anlaşılmaktadır.

3.3. Üç Mekanizmalı Spin Dönüşümlü FAD Yükseltgenmesi

Flavinin moleküler oksijenle hidrojen peroksit oluşturduğu bu reaksiyon spin yasaklı bir tepkimedir. Literatürde Prabhakar vd. tarafından glukoz oksidaz enziminde incelenmiş ve başlangıçta oluşan triplet radikal çiftinin spin-orbit birleşmesi sayesinde singlet radikal çiftine dönüştüğü ispatlanmıştır (Prabhakar ve ark., 2002-2003). Şimdiye kadar bizim incelediğimiz en olası görünen mekanizmalar açık kabuk singlet biradikal mekanizma (M3) ve *si*-yüzünden kapalı kabuk singlet mekanizmadır (M5). Ancak moleküler oksijen reaksiyona girmeden önce triplet enerji düzeyinde bulunmaktadır. Bu nedenle önce aktifleşip singlet enerji düzeyindeki FADH₂ ile biradikal kompleks bir yapı oluşturmalıdır. Şimdiye kadar anlatılan mekanizmalardaki yapılar dikkatli bir şekilde incelendiğinde flavinin *re*-yüzünden yapılan triplet (M2), açık kabuk singlet biradikal (M3) ve kapalı kabuk singlet (M4) mekanizmalarda birbirine benzer kompleks yapıları oluştuğu görülmüştür. M2 ve M3'te mekanizmaların ilk adımının sonunda ara ürün olarak FADH(radikal)...OOH(radikal) kompleksi oluşmaktadır. M4'te ise ikinci adımın sonunda C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü oluşmaktadır. Bu ara ürünün singlet olduğu bu konudaki yapılmış bütün çalışmalarda anlatılmıştır. Bütün reaksiyonların sonunda da FAD ve H₂O₂ oluşmaktadır. Bu nedenle, bu üç mekanizma, yapılar arasında geçişler olabileceği düşünülerek ve literatür verileri göz önüne alınarak, aynı grafikte çakıştırılmıştır. Şekil 3.24. te önerdiğimiz spin dönüşümlü mekanizma görülmektedir. Bu mekanizmada enerjiler M2'nin başlangıç kompleksine göre (³RC-re2) relatif alınarak bulunmuştur.



Şekil 3.24. Mekanizmaların çakıştırılmış potansiyel enerji yüzeyleri. Mavi çizgi triplet enerji yüzeyi. Bordo çizgi açık kabuk singlet biradikal enerji yüzeyi. Yeşil çizgi kapalı kabuk singlet enerji yüzeyidir. Kalın çizgiler bizim önerimize göre mekanizmanın izlediği olası spin-dönüşümlü yolu göstermektedir. (Kırmızı yıldız: Triplet ve açık kabuk singlet biradikal yüzeylerin spin dönüşüm noktası. Yeşil yıldız: Açık kabuk singlet biradikal ve kapalı kabuk singlet yüzeylerin kesişim noktası.)

Bu grafiğe göre mekanizma triplet başlayıp triplet FADH(radikal)...OOH(radikal) kompleksi oluştuktan sonra açık kabuk singlet biradikal enerji yüzeyiyle çakışarak bir spin dönüşümü gerçekleştirir. Triplet yapıda farklı moleküler orbitallerdeki aynı yönlü spinlerden biri ters döner. Daha sonra açık kabuk singlet biradikal enerji yüzeyiyle kapalı kabuk singlet enerji yüzeyi çakışır ve farklı moleküler orbitaldeki ters yönlü spinler aynı orbitale geçip singlet C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününü oluşturur. Mekanizma bundan sonraki adımlarda kapalı kabuk olarak devam eder. Wongnate ve grubunun HPAH enziminin aktif bölgesiyle yaptıkları çalışmada da FADH(radikal)...OOH(radikal) triplet çifti oluştuktan sonra ilk önce spin dönüşümüyle açık kabuk singlet biradikal FADH(radikal)...OOH(radikal) kompleksi oluşacağı ve sonrasında singlet kapalı kabuk C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürününün oluşacağı belirtilmiştir. Ayrıca bu dönüşümün neredeyse bariyersiz olduğundan da bahsedilmiştir. Bu çalışmada önerilen spin dönüşümlü mekanizma literatürle desteklenmektedir ve önerilen çeşitli mekanizmaların birleşimidir (Visitsathawong ve ark., 2015).

4. GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

Bu çalışmada modellenen tüm mekanizmalar gaz fazında YFT M06-2X/6-31+G(d,p) ve UM06-2X/6-31+G(d,p) yöntemi ile çalışılmıştır. İki hidrojenle indirgenmiş flavinin (FADH₂) moleküler oksijenle reaksiyonu spesifik bir enzimin aktif bölgesine bağlı kalmaksızın, sadece flavin halkası hesaba katılarak halkanın *si* ve *re*-yüzünden incelenmiştir. Bu hesaplamalarda *si*-yüzünden üç mekanizma singlet ve triplet olarak, *re*-yüzünden dört mekanizma singlet, triplet ve açık kabuk singlet biradikal olarak modellenmiştir. Hesaplanan bu mekanizmalarda izoalloksazin halkasının önemli bir kısmı olan C(4a)'ya kovalent bağlı bir ara ürün oluşup oluşmadığı veya mekanizmanın kovalent bağlı bir ara ürün olmadan ilerleyip ilerleyemeyeceği araştırılmıştır. Bunun yanında, bu mekanizmanın literatürdeki çalışmalara benzer şekilde spin dönüşümlü olup olmadığı, bu konuda genel bir yargı olmasına rağmen literatürde farklı şekillerde ve farklı enzimlerde anlatılan bu reaksiyonun spin dönüşümünü hangi adımda nasıl gerçekleştirdiği incelenmiştir.

Si ve *re*-yüzünden modellenen triplet mekanizmalarda C(4a)'ya bağlı bir ara ürün bağlanmasının çok zor olduğu görülmüştür. *Si*-yüzünden modellenen (triplet) mekanizmada (M7) bu ara ürün oluşmuş ancak aktivasyon bariyerinin 67.9 kkal/mol olduğu görülmüştür. *Re*-yüzünden modellenen triplet ve açık kabuk singlet biradikal mekanizmalar (M1, M2 ve M3) ve *si*-yüzünden modellenen diğer (triplet) mekanizma (M6) hemen hemen aynı şekilde ve C(4a)'ya bağlı bir ara ürün oluşturmadan ilerlemektedir. Oksidaz enzimlerinde bu ara ürünün oluşmadığı bilindiğinden bu sonuç literatürle uyumludur. Bu sonuca bağlı olarak triplet mekanizmalarda ara ürünün oluşmadığı söylenebilir.

Si ve *re*-yüzünden hesaplanan kapalı kabuk mekanizmalarda ise flavine kovalent bağlı ara ürünler tespit edilmiştir. *Re*-yüzünden modellenen singlet mekanizmada (M4) literatürde önerildiği gibi C(4a)-hidroperoksiflavin ara ürünü bulunmuştur. *Si*-yüzünden modellenen singlet mekanizmada (M5) ise C(10)-hidroperoksiflavin ara ürünü optimize edilmiştir. Buna göre flavin *si*-yüzünden girdiği reaksiyonlarda C(4a) yerine C(10)'a kovalent bağlı bir ara ürün tespit edilebilir. Aktif bölgede flavinin *si*-yüzünde sterik engeli fazla bulunmayan enzimler bu ara ürünü oluşturabilir.

Bulunan bütün mekanizmalardan oda şartlarında gerçekleşmesi en olası olan mekanizmalar, aktivasyon bariyerlerine bakıldığında si-yüzünden singlet mekanizma (M5) ve *re*-yüzünden açık kabuk singlet biradikal olarak hesaplanan mekanizmalardır (M3). Ancak bu reaksiyon (moleküler oksijenin temel durumda triplet olmasından dolayı) triplet başlayacağından spin dönüşümlü olacak ve reaksiyon tek bir enerji yüzeyinde ilerlemeyecektir.

Tepkime sırasında olası bir spin dönüşümünü araştırmak amacıyla *re*-yüzündeki optimizasyonlardan elde edilen yapılar aynı potansiyel enerji yüzeyinde çakıştırılmıştır. Bu önerimize göre triplet başlayan mekanizma potansiyel enerji yüzeyinde triplet FADH(radikal)....OOH(radikal) çiftini oluşturduktan sonra önce açık kabuk singlet biradikal yüzeye daha sonra da kapalı kabuk singlet yüzeye geçerek flavine kovalent bağlı C(4a)-hidroperoksiflavin oluşturmaktadır. Mekanizmanın aktivasyon bariyerlerine bakıldığında oda şartlarında olabileceği görülmektedir.

Sonuç olarak, oksijen varlığında FADH₂ halkasının etrafında enzim veya çözücü etkisi olmasa dahi yükseltgenebilmesi mümkün gözükmektedir. Söz konusu redoks tepkimesi için Şekil 3.24'te gösterilen üç-mekanizmalı ve spin-dönüşümlü reaksiyon yolunu önermekteyiz. Diğer yandan, enzimlerin içinde gerçekleşen FADH₂ yükseltgenmelerinin aktif bölge etkisi ile daha düşük aktivasyon enerjilerine sahip olacağı ve daha hızlı gerçekleşeceği beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, C. A., & Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 321-360.
- Bach, R. D., & Mattevi, A. (2013). Mechanistic aspects regarding the elimination of H₂O₂ from C (4a)-hydroperoxyflavin. The role of a proton shuttle required for H₂O₂ elimination. *The Journal of organic chemistry*, 78(17), 8585-8593.
- Bhattacharyya, S., Stankovich, M. T., Truhlar, D. G., & Gao, J. (2007). Combined quantum mechanical and molecular mechanical simulations of one-and two-electron reduction potentials of flavin cofactor in water, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, and cholesterol oxidase. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(26), 5729-5742.
- Bornemann, S. (2002). Flavoenzymes that catalyse reactions with no net redox change. *Natural product reports*, 19(6), 761-772.
- Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science*, 7(5), 204-210.
- Bruice, T. C. (1984). Oxygen- Flavin Chemistry. *Israel Journal of Chemistry*, 24(1), 54-61.
- Chenprakhon, P., Trisrivirat, D., Thotsaporn, K., Sucharitakul, J., & Chaiyen, P. (2014). Control of C4a-hydroperoxyflavin protonation in the oxygenase component of p-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. *Biochemistry*, 53(25), 4084-4086.
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(3), 761-770.
- Dong, H., & Beer, S. V. (2000). Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology*, 90(8), 801-811.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauß, U., Guterl, J. K., & Jaeger, K. E. (2007). Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nature biotechnology*, 25(4), 443-445.

- Eberlein, G., & Bruice, T. C. (1983). The chemistry of a 1, 5-diblocked flavin. 2. Proton and electron transfer steps in the reaction of dihydroflavins with oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 105(22), 6685-6697.
- Eduardo, S. & Edwards, A.M. (2007). *Flavins: photochemistry and photobiology*, The Royal Society of Chemistry, Chambridge, UK.
- Erdem, S. (2006). Hesaplamalı organik kimya ders notları <http://mimoza.marmara.edu.tr/~erdem/>.
- Foot, C. S., & Clennan, E. L. (1995). Properties and reactions of singlet dioxygen. In *Active oxygen in chemistry*. Springer, Netherlands.
- Fridovich, I. (2014). *Oxidative Stress*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Gadda, G. (2012). Oxygen activation in flavoprotein oxidases: the importance of being positive. *Biochemistry*, 51(13), 2662-2669.
- Ghisla, S., & Edmondson, D.E. (2014). *Flavin Coenzymes* In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Gomelsky, M., & Klug, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in biochemical sciences*, 27(10), 497-500.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical reviews*, 116(5), 3029-3085.
- Hemmerich, P., Massey, V., & Fenner, H. (1977). Flavin and 5-deazaflavin: a chemical evaluation of 'modified' flavoproteins with respect to the mechanisms of redox biocatalysis. *FEBS letters*, 84(1), 5-21.
- Hepel, M. & Andreescu, S. (2015). *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, Volume 2 ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC.
- Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V., & Martínez, A. T. (2012). Role of active site histidines in the two half-reactions of the aryl-alcohol oxidase catalytic cycle. *Biochemistry*, 51(33), 6595-6608.

Hratchian, H. P., & Schlegel, H. B. (2005). Finding minima, transition states, and following reaction pathways on ab initio potential energy surfaces. *Theory and applications of computational chemistry: the first*, 40, 195-249.

International Union of Biochemistry. (1984). Nomenclature of electrontransfer proteins. In *Enzyme nomenclature, recommendations*. Academic Press, Orlando, FL.

Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle—70 years later. *Redox Report*, 6(4), 229-234.

Laloi, C., & Havaux, M. (2015). Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Frontiers in plant science*, 6.

Li, H., Ortego, B. C., Maillard, K. I., Willson, R. C., & Tu, S. C. (1999). Effects of mutations of the α His45 residue of *Vibrio harveyi* luciferase on the yield and reactivity of the flavin peroxide intermediate. *Biochemistry*, 38(14), 4409-4415.

Lienhart, W. D., Gudipati, V., & Macheroux, P. (2013). The human flavoproteome. *Archives of biochemistry and biophysics*, 535(2), 150-162.

Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Raibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L., & Cashmore, A. R. (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science*, 269(5226), 968-970.

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

- Macheroux, P., Ghisla, S., Sanner, C., Rüterjans, H., & Müller, F. (2005). Reduced flavin: NMR investigation of N (5)-H exchange mechanism, estimation of ionisation constants and assessment of properties as biological catalyst. *BMC biochemistry*, 6(1), 26.
- Macheroux, P., Kappes, B., & Ealick, S. E. (2011). Flavogenomics—a genomic and structural view of flavin- dependent proteins. *The FEBS journal*, 278(15), 2625-2634.
- Mack, M., & Grill, S. (2006). Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(3), 265-275.
- Massey, V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22459-22462.
- Massey, V. (2000). The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical society transactions*, 28, 283-296.
- Mattevi, A. (2006). To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends in biochemical sciences*, 31(5), 276-283.
- Miura, R. (2001). Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity. *The Chemical Record*, 1(3), 183-194.
- Ortiz-Maldonado, M., Aeschliman, S. M., Ballou, D. P., & Massey, V. (2001). Synergistic interactions of multiple mutations on catalysis during the hydroxylation reaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase: studies of the Lys297Met, Asn300Asp, and Tyr385Phe mutants reconstituted with 8-Cl-flavin. *Biochemistry*, 40(30), 8705-8716.
- Orville, A. M., Lountos, G. T., Finnegan, S., Gadda, G., & Prabhakar, R. (2009). Crystallographic, Spectroscopic, and Computational Analysis of a Flavin C4a– Oxygen Adduct in Choline Oxidase. *Biochemistry*, 48(4), 720-728.
- Ozturk, N., Selby, C. P., Annayev, Y., Zhong, D., & Sancar, A. (2011). Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 516-521.
- Prabhakar, R., Li, M., Musaev, D. G., Morokuma, K., & Edmondson, D. E. (2005). A density functional theory (DFT) study of the spin forbidden dioxygen activation in monoamine oxidase B (MAO B). *Flavins and Flavoproteins*, 127-131.

- Prabhakar, R., Siegbahn, P. E., & Minaev, B. F. (2003). A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1647(1), 173-178.
- Prabhakar, R., Siegbahn, P. E., Minaev, B. F., & Ågren, H. (2002). Activation of triplet dioxygen by glucose oxidase: spin– orbit coupling in the superoxide Ion. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(14), 3742-3750.
- Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L., & Davies, K. J. (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man!. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(3), R491-R511.
- Rizzo, C. J. (2001). Further computational studies on the conformation of 1, 5-dihydrolumiflavin. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(5), 737-746.
- Sancar, A. (2000). Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 31-67.
- Sarı, Ö. (2011). Polihalojenlenmiş nitrobütadienlerin aromatik aminlerle verdiği reaksiyon mekanizmalarının hesapsal olarak modellenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Sayre, L. M., Perry, G., & Smith, M. A. (2007). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 172-188.
- Silverman, R.B., Holladay, M.W. (2014). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Third edition, Elsevier inc., California, USA.
- Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D., & Chaiyen, P. (2008). Detection of a C4a-hydroperoxyflavin intermediate in the reaction of a flavoprotein oxidase. *Biochemistry*, 47(33), 8485-8490.
- Topal, A. (2017). Flavin redoks tepkimesine sübstitüent etkisinin modellenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

- Truhlar, D.G., Zhao, Y., (2006). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four-MO6 class functionals and 12-other functionals. *Theor Chem Account*, 120, 215-224.
- Visitsatthawong, S., Chenprakhon, P., Chaiyen, P., & Surawatanawong, P. (2015). Mechanism of oxygen activation in a flavin-dependent monooxygenase: a nearly barrierless formation of C4a-hydroperoxyflavin via proton-coupled electron transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 137(29), 9363-9374.
- Walling, C. (1975). Fenton's reagent revisited. *Accounts of chemical research*, 8(4), 125-131.
- Walsh, C. (1980). Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry. *Accounts of Chemical Research*, 13(5), 148-155.
- Walsh, J. D., & Miller, A. F. (2003). Flavin reduction potential tuning by substitution and bending. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 623(1), 185-195.
- Wentworth, P., Jones, L. H., Wentworth, A. D., Zhu, X., Larsen, N. A., Wilson, I. A., ... & Lerner, R. A. (2001). Antibody catalysis of the oxidation of water. *Science*, 293(5536), 1806-1811.
- Wongnate, T., Surawatanawong, P., Visitsatthawong, S., Sucharitakul, J., Scrutton, N. S., & Chaiyen, P. (2013). Proton-coupled electron transfer and adduct configuration are important for C4a-hydroperoxyflavin formation and stabilization in a flavoenzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 136(1), 241-253.
- Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). Density functionals with broad applicability in chemistry. *Accounts of chemical research*, 41(2), 157-167.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İlke DEMİR

Doğum Yeri : ÜSKÜDAR/İSTANBUL

Doğum Tarihi : 21.04.1991

İletişim : ilkedmrr@gmail.com

Eğitim Bilgileri:

Marmara Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya/Organik Kimya / Tezli Yüksek Lisans 2015-2017

Marmara Üniversitesi/ Atatürk Eğitim Fakültesi/Kimya Öğretmenliği 2010-2015

İstanbul Üsküdar Anadolu Lisesi 2005-2009

Sözlü bildiri ve Poster Bildiri:

İ.Demir, S.S.Erdem, Flavinin Oksijen ile *si*-Yüzünden Oksidasyon Mekanizmasının Hesapsal Modellenmesi, 5. İlaç Kimyası Kongresi 30 Mart-2 Nisan 2017, Antalya (Poster)

İ.Demir, S.S.Erdem, DFT Computations on the Mechanism of Flavin Oxidative Half-Reaction, 11th European Conference on Theoretical and Computational Chemistry 4-7 September 2017, Barcelona (Poster)

İ.Demir, S.S.Erdem, Flavinin *re*-Yüzünden Oksidasyon Mekanizmasının Hesapsal Modellenmesi, 3. Hesaplamalı Kimya Kongresi 12-14 Ekim 2017, Ankara (Poster)

Yer aldığı Projeler:

Flavoenzimlerin FAD Oksidasyonu Basamağının Hesapsal Modellenmesi, BAP Projesi, Araştırmacı, 19.01.2017

Florokinolon ve Triazol Yapısı İçeren Yeni Hibrit Bileşiklerin Sentezi ve Tirosinaz ve Alfa-Amilaz İnhibisyon Potansiyellerinin in Vitro ve in Siliko Yöntemlerle İncelenmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 15.10.2017