



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKLÜ ETKİLEŞMELERİN VE STERİK FAKTÖRLERİN
PROTEİN DİNAMİĞİNE ETKİLERİ**

Gözde GEZİCİ

YÜKSEK LİSANS

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hüseyin KAYA

Gaziantep

2015

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**YÜKLÜ ETKİLEŞMELERİN VE STERİK FAKTÖRLERİN
PROTEİN DİNAMİĞİNE ETKİLERİ**

Gözde GEZİCİ

Tez Savunma Tarihi: 04 Eylül 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Hüseyin KAYA
Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hüseyin KAYA
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Murat CANPOLAT

Doç. Dr. Hüseyin KAYA

Yrd. Doç. Dr. Ömer Can DEMİRTAŞ

İmzası

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

04.09.2015

Gözde GEZİCİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın hazırlanması sürecinde bana yol gösteren, yardımlarını, tecrübe ve bilgisini hiç bir zaman esirgemeyen, çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli ortamı hazırlayan değerli hocam Doç. Dr. Hüseyin KAYA'ya ve her konuda sabırla yardımcı olan arkadaşım Gökhan SELAMET'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmam sürecinde benden yardımlarını esirgemeyen aileme, hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ	iii
SEMBOLLER LİSTESİ	v
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Amino Asitler	3
2.1.1. Polar olmayan (hidrofobik) ve alifatik yan zincirli amino asitler	5
2.1.2. Yüksüz (hidrofilik) polar yan zincirli amino asitler	8
2.1.3. Negatif yüklü (asidik) yan zincirli amino asitler	9
2.1.4. Pozitif yüklü (bazik) yan zincirli amino asitler	9
2.2. Peptitler	10
2.3. Proteinler	12
2.3.1. Proteinlerin üç boyutlu yapısı ve sınıflandırılması.....	12
2.3.2. Protein katlanması	14
2.3.2.1. Protein katlanması termodinamiği ve enerji yüzeyleri.....	15
2.4. Bilgisayara Dayalı Hesaplama ve Simülasyon Yöntemleri	21
2.4.1. Moleküler Dinamik (MD) Yöntemi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Katlı Yapı Bilgisine Dayalı Gō-Modeli	26
3.2. Protein Gō-Modelinde Etkileşim Tasvirleri (Kuvvet Alanları)	27
3.2.1. Gerilme etkileşim potansiyeli.....	28
3.2.2. Eğilme etkileşim potansiyeli	29
3.2.3. Bükülme etkileşim potansiyeli	29
3.2.4. Bağımsız etkileşim potansiyelleri	30
3.2.4.1. Lennard-Jones etkileşim potansiyelleri	30
3.2.4.2. Yüklü etkileşim potansiyelleri	32

3.3. Langevin Dinamiği.....	35
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Amino asitlerin farklı pH'larda kimyasal bağlarının gösterimi	3
Şekil 2.2 Amino asitlerin genel yapısı.....	5
Şekil 2.3 Peptit bağının oluşumu.....	11
Şekil 2.4 Proteinlerin birincil yapılarının gösterimi	12
Şekil 2.5 Farklı seviyelerdeki protein yapılarının gösterimi	13
Şekil 2.6 Levinthal paradoksu ve golf sahası ile gösterimi	14
Şekil 2.7 Protein katlanma yolaklarının ve enerji yüzeyi gösterimi.....	15
Şekil 2.8 Protein katlanma yolağı gösterimi	16
Şekil 2.9 Proteinlerin iki durumlu ve çok durumlu geçişleri	17
Şekil 2.10 Farklı protein durumlarının görsel gösterimi	17
Şekil 2.11 İki durum davranışı gösteren proteinler için geçiş sıcaklığında serbest enerji profil tasviri	19
Şekil 2.12 Isı kapasitesine karşılık sıcaklık değişimi eğrisi	21
Şekil 2.13 Simülasyon ölçekleri ve kullanılması önerilen simülasyon teknikleri.....	22
Şekil 3.1 Yerel ve yerel olmayan etkileşimlerin gösterimi	27
Şekil 3.2 Gerilme etkileşim potansiyelinin mesafeye göre değişimi	28
Şekil 3.3 Eğilme etkileşim potansiyelinin eğilme açısına bağlı değişimi	29
Şekil 3.4 Bükülme etkileşim potansiyelinin bükülme açısına bağlı değişimi	29
Şekil 3.5 Kısa ve uzun erişimli Lennard-Jones etkileşimlerin gösterimi	30

Şekil 3.6 (a) Katlı yapıda olan, (b) katlı yapıda olmayan yüklü etkileşmelerin gösterimi	33
Şekil 4.1 Tamamıyla α -yapılı protein ailesinden seçilen proteinlerin katlı yapıları ve PDB kodları.....	39
Şekil 4.2 Tamamıyla β -yapılı protein ailesinden seçilen proteinlerin katlı yapıları ve PDB kodları.....	39
Şekil 4.3 $\alpha + \beta$ - yapılı protein ailesinden seçilen proteinlerin katlı yapıları ve PDB kodları.....	40
Şekil 4.4 Model geçiş sıcaklıklarında elde edilmiş 1shg proteini yolakları.....	45
Şekil 4.5 1shg proteini için ısı kapasitesinin sıcaklığa göre değişimi.....	46
Şekil 4.6 Model geçiş sıcaklıklarında elde edilmiş 2ci2 proteini yolakları.....	47
Şekil 4.7 2ci2 proteini için ısı kapasitesinin sıcaklığa göre değişimi.....	48
Şekil 4.8 Konformasyonel enerji E reaksiyon koordinatı olarak seçildiğinde elde edilen serbest enerji profilleri.....	49
Şekil 4.9 Katlı yapıya benzerlik parametresi Q reaksiyon koordinatı olarak seçildiğinde elde edilen serbest enerji profilleri.....	50

SEMBOLLER LİSTESİ

q_j	j'inci amino asitin elektrik yükü
$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$	Katlı yapıdaki yüklü itici ve çekici etkileşme sayısı toplamı
ΔF_E^\ddagger	Bariyer yüksekliği
ΔH_{cal}	Kalorimetrik entalpi değişimi
ΔH_{vH}	Van't Hoff entalpi değişimi
a_i	i'inci atomun ivmesi
$C_{P,\text{max}}$	Isı kapasitesinin maximum değer
$E_{\text{katlı}}$	Katlı yapı enerjisi
E_{min}^A	Açık yapı topluluğunun minimum konformasyon enerjisi
E_{min}^K	Katlı yapı topluluğunun minimum konformasyon enerjisi
F_i	i'inci atoma etki eden kuvvet
F_{konf}	Toplam konformasyonel kuvvet
F_{min}^A	Açık yapı topluluğunun minimum serbest enerjisi
F_{min}^K	Katlı yapı topluluğunun minimum serbest enerjisi
G_A	Açık durum serbest enerjisi
G_K	Katlı durum serbest enerjisi
$K_\emptyset^{(1)}$	Bükülme etkileşim katsayısı terimi
$K_\emptyset^{(3)}$	Bükülme etkileşim katsayısı terimi
k_a	Açılma oranı
k_B	Boltzmann sabiti
K_d	Denge sabiti
K_{ij}	Etkileşim katsayısı
k_k	Katlanma oranı
K_r	Gerilme etkileşim katsayısı
K_θ	Eğilme etkileşim katsayısı
$L_{\text{yüklü}}^{+,-}$	Pozitif ve negatif yüklü amino asit sayılarının toplamı
$L_{\text{yüklü}}^+$	Pozitif yüklü amino asit sayısı
$L_{\text{yüklü}}^-$	Negatif yüklü amino asit sayısı
m_i	i'inci atomun kütlesi

$N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$	Katlı yapıdaki toplam kontak sayısı
N_{kontak}	Toplam katlı kontak sayısı
q_i	i 'inci amino asitin elektrik yükü
r_{ij}^0	İki amino asit arasındaki denge mesafesi
r_{ij}	İki amino asit arasındaki mesafe
T_{max}	Geçiş sıcaklığı
$U_{ij}^{\text{LJ}}(r_{ij})$	Lennard-Jones etkileşim enerjisi
V_0	Tüm modellerdeki değişmeyen etkileşim potansiyel enerjisi
v_a	Açılma hızı
v_k	Katlanma hızı
$V_{\text{yükü}}$	Yükü amino asitler arasındaki etkileşme potansiyeli
ΔF_A	Açılma serbest enerjisi
E	Konformasyonel enerji
$F(E)$	Serbest enerji
L	Proteindeki amino asit sayısı
Q	Katlı yapıya benzerlik parametresi
R	Yan zincir
t	Zaman
ε	Etkileşme büyüklüğü
τ	Simülasyon zaman ölçeği

KISALTMALAR LİSTESİ

A	Açık Durum
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>GD</i>	Geçiş Durum
K	Katlı Durum
MC	Monte Carlo
MD	Moleküler Dinamik
PDB	Protein Veri Bankası
RNA	Ribonükleik asit

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Standart amino asitler [2].....	4
Tablo 2.2 Polar olmayan (hidrofobik) yan zincirli amino asitler [2]	6
Tablo 2.3 Yüksüz polar (hidrofilik) yan zincirli amino asitler.....	8
Tablo 2.4 Negatif yüklü amino asitler.....	9
Tablo 2.5 Pozitif yüklü amino asitler	10
Tablo 2.6 Proteinlerin yapı derecelerine göre amino asit sayıları.....	11
Tablo 4.1 Tamamıyla α -yapılı protein ailesinden seçilmiş proteinlerin amino asit içerikleri ve katlı yapıdaki bağımsız ve yüklü etkileşme bilgileri.....	41
Tablo 4.2 Tamamıyla β -yapılı protein ailesinden seçilmiş proteinlerin amino asit içerikleri ve katlı yapıdaki bağımsız ve yüklü etkileşme bilgileri.....	42
Tablo 4.3 $\alpha + \beta$ -yapılı protein ailesinden seçilmiş proteinlerin amino asit içerikleri ve katlı yapıdaki bağımsız ve yüklü etkileşme bilgileri.....	43
Tablo 4.4 İncelediğimiz proteinlerin 4 farklı modelden elde edilmiş termodinamik ve kinetik verileri	44

ÖZET

YÜKLÜ ETKİLEŞMELERİN VE STERİK FAKTÖRLERİN PROTEİN DİNAMİĞİNE ETKİLERİ

Gözde GEZİCİ

Yüksek Lisans Tezi, Biyofizik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Hüseyin KAYA

Eylül 2015, 55 Sayfa

Bu tez çalışmasında, basitleştirilmiş zincir temsili içeren protein modelleri ve moleküler dinamik simülasyon tekniği kullanılarak; yüklü etkileşmelerin protein dinamiğine etkileri incelenmiştir. Bu maksatla 3 farklı protein ailesinden 11 farklı protein ele alınmıştır. Yüklü etkileşmelerin farklı proteinlerde; protein katlı yapı kararlılığı, geçiş durum topluluğu dağılımı, serbest enerji bariyer yüksekliği ve protein katlanma oranlarına tamamıyla zıt etkilerinin olabileceği gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Gō-modeli, Moleküler dinamik, Protein katlanması, Serbest enerji, Yüklü etkileşme

ABSTRACT

EFFECTS OF CHARGED INTERACTIONS AND STERIC EFFECTS ON PROTEIN DYNAMICS

Gözde GEZİCİ

Master of Science Thesis, Department of Biophysics

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin KAYA

September 2015, 55 Pages

In this dissertation study, by using coarse-grained protein models with explicit chain representation and molecular dynamics simulation technique, the effects of charge interactions on protein dynamics have been investigated. For this purpose, 11 different proteins belonging 3 different protein families were taken into consideration. It has been observed that the charged interactions may have completely opposite effects on the stability of protein native structures, the distribution of transition states ensemble, free energy barrier heights, and protein folding rates on different proteins.

Key words: Gō-model, Molecular dynamics, Protein folding, Free energy, Charged interactions

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Canlıların yaşamsal fonksiyonlarının neredeyse tamamının yerine getirilmesinden sorumlu olan proteinlerin, bu işlevleri nasıl ve/veya hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiklerinin anlaşılması modern tıp ve biyolojinin en temel problemleri arasındadır. Hücre içerisinde sentezlenen her protein kendine has bir 3-boyutlu katlanmış yapıya sahiptir ve bu katlı yapılar biyolojik olarak aktif yapılardır. Parkinson, Alzheimer, deli dana ve birçok kanser türünün proteinlerin yanlış katlanması veya yanlış bir araya toplanmasından kaynaklandığı bilinmektedir. Hücrelerde protein sentezi sonrasında, proteinlerin katlanmış yapılarına ulaşırken geçirdikleri konformasyonel geçişleri belirleyen faktörlerin neler olduğunun anlaşılması; hem proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına hem de dolayısıyla birçok hastalığın teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Proteinler yapılarında barındırdıkları değişik fiziko-kimyasal özelliklere sahip 20 farklı amino asit ve içinde buldukları hücrelerin ihtiva ettikleri binlerce farklı biyomolekül (DNA, RNA, diğer farklı proteinler) dolayısıyla yüksek etkileşim çeşitliliği içerirler. Ayrıca sıcaklık, çözücü miktarı, ortamın asidik ve baziklik derecesi gibi farklı fizyolojik şartların değişimine karşı gösterdiği hassasiyet; proteinlerin davranışlarının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Diğer taraftan, sadece bir insanda 50.000'den fazla protein çeşidinin var olması ve her bir proteinin yapısı, fonksiyonu ve kararlılığının belirlenmesi için ihtiyaç duyulan deneysel çalışmaların maliyeti ve alacağı süre düşünüldüğünde; yeni araştırma yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, bilgisayar teknolojilerinde ki; işlemci hızlarının artışı, aynı anda binlerce işlemcinin aynı bir hesaplama için kullanılmasını sağlayan paralel hesaplama algoritmaları ile biyolojik sistemlerin uzun zaman ölçekli davranışlarını incelemek mümkün olmaktadır. Artık bilgisayara dayalı modelleme ve simülasyon yöntemleri, deneysel ve teorik araştırma yöntemlerinin dışında üçüncü bir yöntem olarak kabul görmektedir.

Proteinler sentezlendikten sonra kararlı oldukları katlı yapılara çok hızlı (pico saniye) ulaşabilmektedirler. Maalesef proteinlerin gerçekleştirdikleri konformasyonel geçişleri takip edebilecek deneysel teknolojiler hala mevcut değildir. Bilgisayara dayalı simülasyon yöntemlerle; hem gerçekleşen konformasyonel değişimler adım adım takip

edilebilmekte hem de uzun zaman ölçekli davranışlar incelenebilmektedir. Ayrıca yine bilgisayara dayalı yöntemler yardımıyla deneylerden elde edilen inanılmaz büyüklükteki (tera- ve/veya peta-byte seviyesinde) biyolojik veriler analiz edilebilmektedir.

Biyolojik sistemlerin modellenmesinde en büyük sorun; atomlar ve/veya amino asitler arası etkileşmelerin tam olarak doğru tasvir edilememesidir. Diğer bir deyişle, hala sadece bir proteinin zincir bilgisi (amino asit sıralaması) verildiğinde, o proteinin katlanma dinamiğini deneylerle uyumlu şekilde verecek ve doğru katlı yapıya ulaştıracak kuvvet alanları geliştirilememiştir. Şu ana kadar ki en başarılı sonuçlar Shaw ve grubu tarafından elde edilen ve Science dergisinde 2010 yılında yayınlanan çalışmadır [1]. Bu çalışmada çok küçük 10 tane proteinin katlanma süreleri deneyler ile örtüşür şekilde elde edilebilmiştir. Daha büyük proteinlere gidildiğinde istenen başarı hala yakalanamamıştır. Bu nedenle biyolojik sistemlerde hasıl olan etkileşmelerin detaylı şekilde incelenip anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

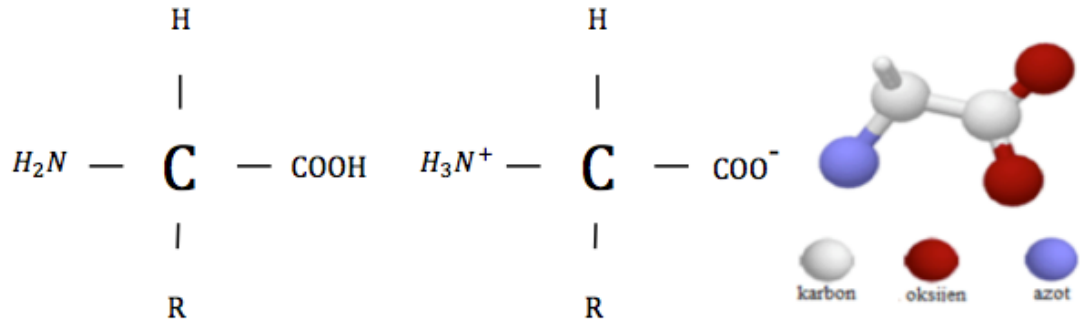
Bu tez çalışmasında yüklü etkileşmelerin protein kinetiğine ve termodinamiğine olan katkıları; proteinlerin basitleştirilmiş zincir temsili ile tasvir edildiği moleküler dinamik simülasyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amino Asitler

Amino asitler atomlardan oluşur. Bu atomlardan biri hidrojen (H) atomu olmak üzere diğerleri 3 ayrı grup halinde bulunurlar; amino grubu (NH_2), karboksil grubu ($COOH$) ve yan zincir grubu (R grubu) [2]. Karboksil grubunun hemen yanındaki karbona α -karbon denir. Bu α -karbon atomuna bir karboksil grubu ve bir de amino grubu kovalent bağlıdır. Bu α -karbon atomuna bağlı olan 3. bağ ve 4. bağ ise sırasıyla hidrojen atomu ve değişebilen yan zincir grubudur. Bütün amino asitlerin amino grubu ve karboksil grubu aynıdır [2].

Amino asitlerin amino ve karboksil grupları ortamın pH'ına göre negatif, pozitif ya da hem negatif hem de pozitif yüklü molekül oluşturabilirler. Fizyolojik pH'da karboksil grubu proton kaybederek COO^- şeklinde, amino grupları ise bir proton kazanarak NH_3^+ şeklinde iyonize olur [2]. Yani nötrallığe yakın fizyolojik pH'da amino grubu proton taşır, karboksil grubundan ise proton ayrılmıştır.



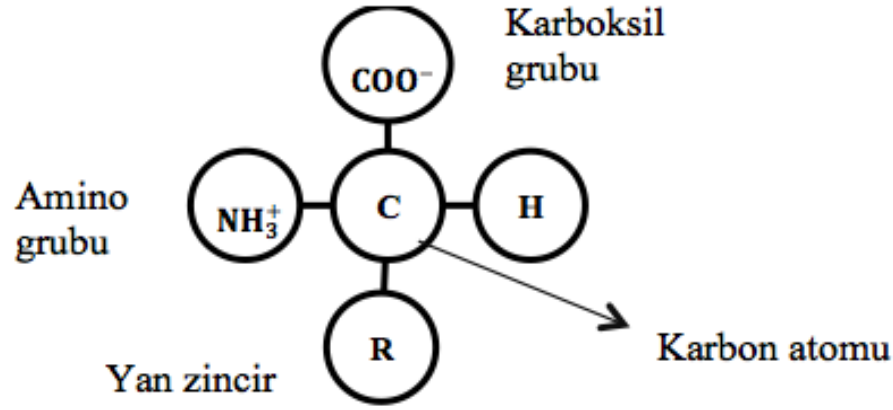
Şekil 2.1 Amino asitlerin farklı pH'larda kimyasal bağlarının gösterimi

Bir amino asidi bir diğer amino asitten ayıran tek özellik, yan zincir grubudur. Yan zincirin her amino asitte farklı olması, amino asitleri birbirinden ayırarak farklı özelliklere sahip olmasını sağlar [2]. Her bir yan zincirin farklı olmasından dolayı doğada 300 farklı amino asit olmasına rağmen proteinlerin yapısında sadece 20 temel amino asit yaygın olarak bulunur [3]. Bu amino asitler standart amino asitler olarak bilinirler ve DNA tarafından kodlanırlar.

Tablo 2.1 Standart amino asitler [2]

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

Tablo 2.1’de proteinleri oluşturan standart amino asitlerin adları, üç harfli kısaltmaları ve tek harfli sembolleri gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Amino asitlerin genel yapısı

Şekil 2.2’de gösterilen yan zincir (*R*) grubunun özelliklerine göre; amino asitler farklı sınıflara ayrılırlar. Mesela, yan zincir (*R*) gruplarının iyonizasyon ve polaritelerine göre amino asitler sınıflandırılmaktadırlar. Amino asitler fiziko-kimyasal özelliklerine göre 4 farklı sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar;

1. Polar olmayan (hidrofobik) ve alifatik yan zincirli amino asitler
2. Yüksüz (hidrofilik) polar yan zincirli amino asitler
3. Negatif yüklü (asidik) polar yan zincirli amino asitler
4. Pozitif yüklü (bazik) polar yan zincirli amino asitler

Amino asitlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin anlaşılması, protein kararlılığı ve biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında kritik rol oynamaktadır.

Polar olmayan (hidrofobik) amino asitlerin yan zincirleri protein molekülünün su ile temas etmeyen iç kısmında bulunurlar. Yüksüz (hidrofilik) polar yan zincirler, protein molekülünün hem dış yüzeyinde hem de iç yüzeyinde bulunurlar [2]. Yüklü, hidrofilik polar yan zincirleri olan amino asitlerin çoğu, protein molekülünün dış yüzeyinde bulunurlar ve bu amino asitler su ile etkileşerek proteinlerin suda çözünmelerine yardımcı olurlar [2].

2.1.1. Polar olmayan (hidrofobik) ve alifatik yan zincirli amino asitler

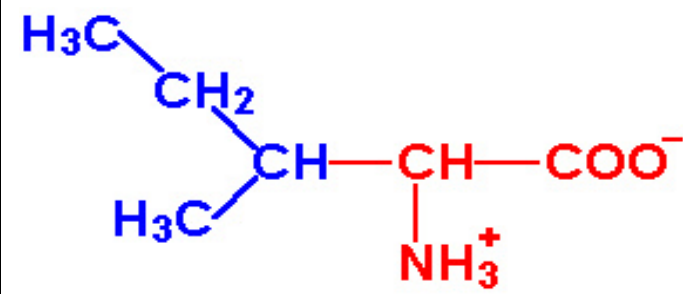
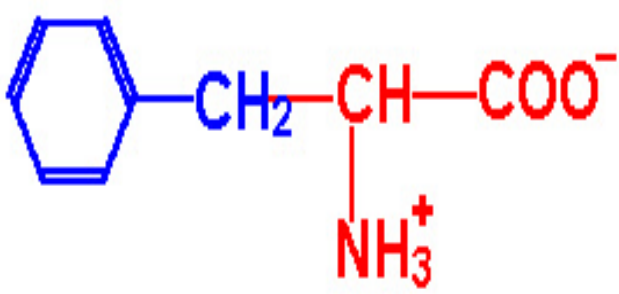
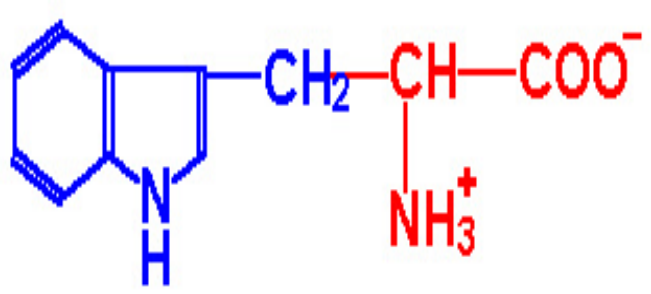
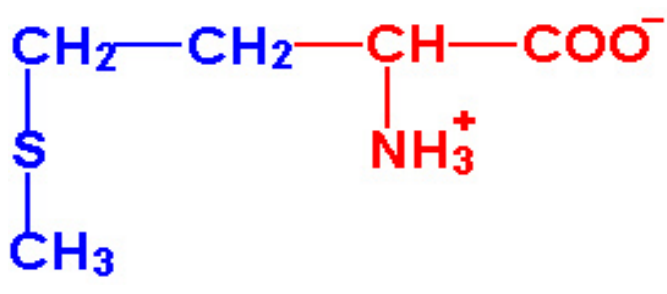
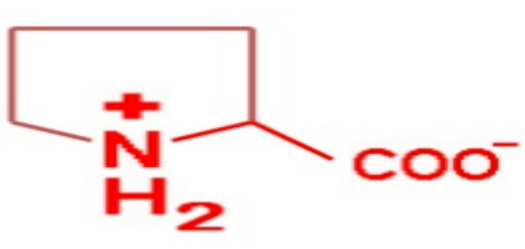
Bu gruptaki amino asitler, polar olmayan yan zincir taşırlar, yani hidrofobik olup suda zayıf çözünürler. Polar olmayan yan zincir büyüdükçe, amino asitler daha da

hidrofobikleşirler (suda daha az erirler). Yan zincirlerinde genellikle oksijen ve azot bulunmaz [2]. Bundan dolayı proton alıp vermezler, iyonik veya hidrojen bağı oluşturamazlar. Polar olmayan amino asitler: glisin, alanin, valin, lösin, izölösin, fenilalanin, triptofan, metiyonin ve prolin [2].

Tablo 2.2 Polar olmayan (hidrofobik) yan zincirli amino asitler [2]

Amino Asit Adı	Kısaltması	Kimyasal Yapısı
Gilisin	Gly G	$\begin{array}{c} \text{H} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanin	Ala A	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Valin	Val V	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Lösin	Leu L	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^- \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

Tablo 2.2 (devam) Polar olmayan (hidrofobik) yan zincirli amino asitler [2]

Izolösin	Ile I	
Fenilalanin	Phe F	
Triptofan	Trp W	
Metiyonin	Met M	
Prolin	Pro P	

2.1.2. Yüksüz (hidrofilik) polar yan zincirli amino asitler

Bu gruptaki amino asitlerin yan zincirleri zayıf asit ve zayıf bazlardan oluşur. Fizyolojik pH'da tamamen yüklü değildirler, ancak kısmen artı ve eksi yükler içerirler [2]. Bundan dolayı diğer moleküllerle ve su ile *H* bağı yapabilen fonksiyonel grupları vardır.

Yüksüz polar amino asitler: asparajin, glutamin, sistein, serin, treonin ve tirozin [2].

Tablo 2.3 Yüksüz polar (hidrofilik) yan zincirli amino asitler

Amino Asit Adı	Kısaltması	Kimyasal Yapısı
Asparajin	Asn N	
Glutamin	Gln Q	
Sistein	Cys C	
Serin	Ser S	
Treonin	Thr T	
Tirozin	Tyr Y	

2.1.3. Negatif yüklü (asidik) yan zincirli amino asitler

Bu amino asitlerin yan zincirinde bir karboksil ($COOH$) grubu bulunur ve bu karboksil grubundan dolayı fizyolojik pH'da negatif yüklüdürler ve asidik özellik gösterirler [2]. Bu amino asitler yan zincirlerinde proton verici amino asitlerdir.

Asidik yan zincirli amino asitler: aspartik asit ve glutamik asit [2].

Tablo 2.4 Negatif yüklü amino asitler

Amino Asit Adı	Kısaltması	Kimyasal Yapısı
Aspartik asit	Asp D	${}^{-}OOC-CH_2-CH-COO^{-}$ NH_3^{+}
Glutamik asit	Glu E	${}^{-}OOC-CH_2-CH-COO^{-}$ NH_3^{+}

2.1.4. Pozitif yüklü (bazik) yan zincirli amino asitler

Bu amino asitlerin yan zincirinde bir amino (NH_2) grubu bulunur ve amino grubundan dolayı fizyolojik pH'da pozitif yüklüdür ve bazik özellik gösterirler. Bu amino asitler, yan zincirlerinde proton alıcı moleküller taşırlar [2]. Fakat bu amino asitlerden histidin diğerlerine göre biraz farklılık gösterir. Histidin fizyolojik pH'da zayıf bazik olup, büyük oranda yüksüzdür. Eğer histidin bir proteine katılırsa protein tarafından sağlanan iyonik çevreye göre histidin ya pozitif yüklü olur ya da nötral olur.

Bazık yan zincirli amino asitler: lizin, arjinin ve histidin [2].

Tablo 2.5 Pozitif yüklü amino asitler

Amino asit adı	Kısaltması	Kimyasal yapısı
Lizin	Lys L	
Arjinin	Arg R	
Histidin	His H	

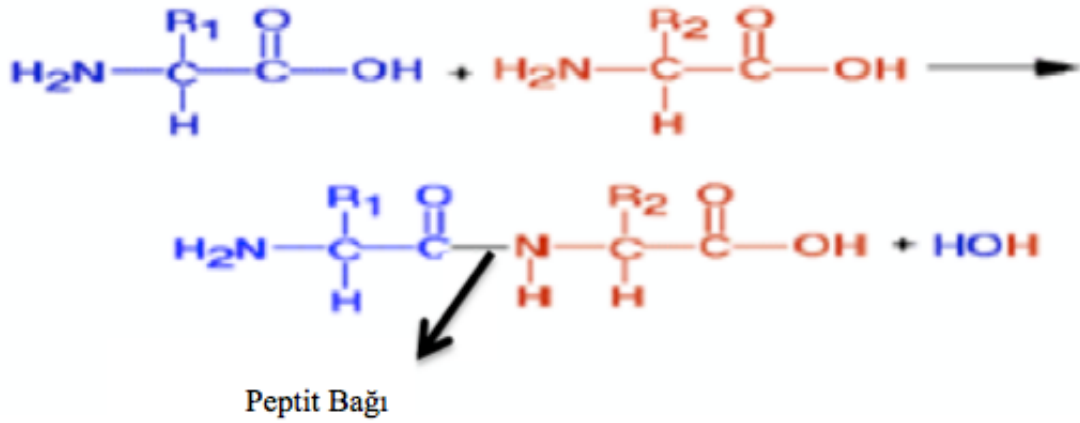
2.2. Peptitler

İki amino asit molekülünden birinin karboksil grubundaki karbon atomunun diğer amino asidin amino grubundaki nitrojen atomuyla, bir molekül su kaybı ile oluşan elektron paylaşımına peptitleşme denir [3]. Böylece iki amino asit molekülü aralarında

peptit bağı (amit bağı) ile bağlanırlar ve sonuçta dipeptit oluşur [4]. Birleşme üç amino asit molekülü arasında ise tripeptit, dört amino asit molekülü arasında ise tetrapeptit, beş amino asit molekülü arasında ise pentapeptit olarak adlandırılır [4].

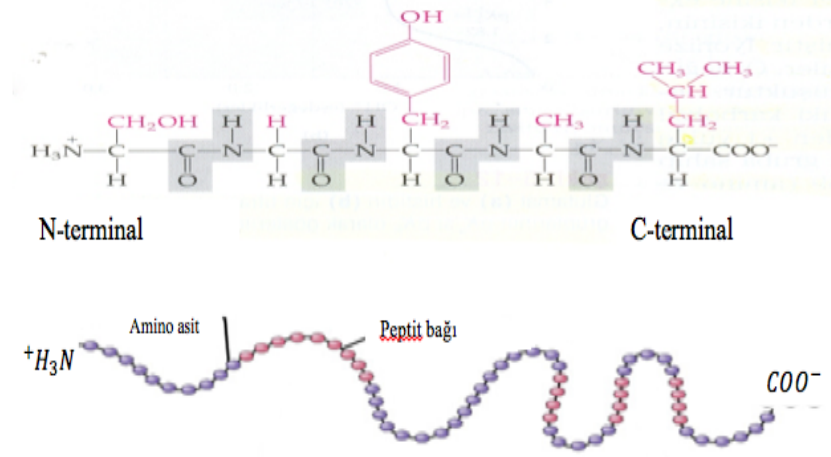
Tablo 2.6 Proteinlerin yapı derecelerine göre amino asit sayıları

Proteinlerin Yapı Dereceleri	Amino Asit Sayısı
Dipeptitler	2
Tripeptitler	3
Tetrapeptitler	4
Pentapeptitler	5



Şekil 2.3 Peptit bağının oluşumu

Peptit bağıyla bağlanmış amino asitler bazen kalıntı (rezidü) olarak da adlandırılmaktadırlar. Peptit zincirinin başındaki serbest (bağlı olmayan) α -amino grubuna sahip amino asit kalıntısına N-terminal (amino-terminal uç veya N-ucu), diğer uçtaki serbest $-\text{COOH}$ grubu olan kalıntıya C-terminal (karboksil-terminal uç veya C-ucu) denir [3].



Şekil 2.4 Proteinlerin birincil yapılarının gösterimi

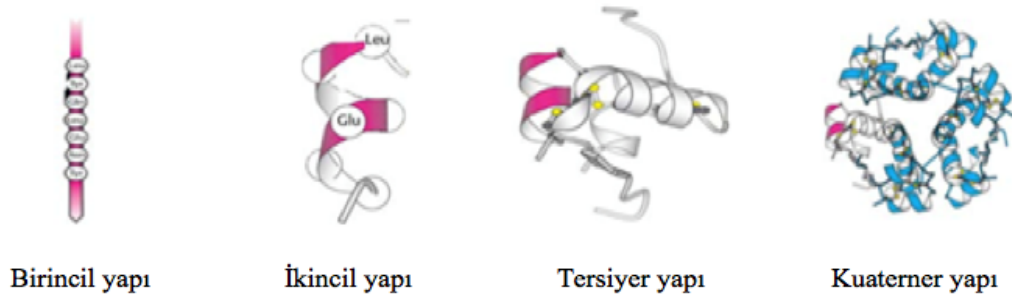
2.3. Proteinler

Protein, kelime olarak “en önemli” anlamına gelir. Gerçekten de canlının ve canlı hücrelerin en önemli yapıtaşdır. Proteinler canlıların yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştiren makromoleküllerdir. Diğer önemli makromoleküller ise; DNA ve RNA’dır. DNA ve RNA birer nükleik asittirler [2]. Nükleik asitler, hayvan, bitki, insan gibi canlı hücrede ve virüslerde olan birçok nükleotitlerden oluşmuş polimerlerdir [3]. Proteinler amino asitlerin polimerleri olduğu gibi DNA ve RNA polimerlerinin küçük yapı taşları yani monomerleri nükleotitlerdir. Kısaca DNA kalıtım molekülüdür, insan kromozomlarını oluşturur ve nükleotitlerden oluşur. Nükleik asitlerin en temel görevi kalıtsal bilgileri depolar ve aktarır, RNA ise DNA’nın emri ile üretilir [3]. Bütün canlıların hücreleri protein içerir. Hücre sitoplazmasında proteinler çözülmüş haldedir [3]. Karaciğer, kas gibi organ ve dokuların yaklaşık yüzde 80-90’ını proteinler oluşturur. Her organizmanın ve organın kendine özel proteini vardır [3]. Proteinler vücudumuzda her hücrenin önemli bir parçasını oluşturdukları için büyüme, gelişme, sağlıklı yaşama ve dokuların onarımı gibi birçok biyolojik olayı düzenlemede rol oynayan kompleks öğelerdir.

2.3.1. Proteinlerin üç boyutlu yapısı ve sınıflandırılması

Proteinlerin katlı üç boyutlu yapısının bilinmesi, onların kararlılık ve biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasını veya tahmin edilmesini sağlamaktadır. Proteinlerin katlı yapılarını belirleyen temel öğeler; içerdikleri amino asit miktarları ve bunların protein

zinciri üzerindeki dizilimleridir. Katlı yapıları X-ışını kristalografi ve NMR yöntemleri ile elde edilmiş proteinler incelendiğinde; birbirine benzer ve olabildiğince spesifik yapılar (mesela sarmallar ve beta plakaları) ve bunların tekrarları gözlemlenmektedir [3]. Bu nedenle protein yapıları farklı seviyelerde sınıflandırılmaktadır ve bunlar sırasıyla: (i) birincil (primer) yapı, (ii) ikincil (sekonder) yapı, (iii) üçüncül (tersiyer) yapı ve (iv) dördüncül (kuaterner) yapıdır [3]. Birincil (primer) yapı proteindeki amino asit dizilim bilgisini verirken, ikincil (sekonder) yapı protein zinciri üzerinde birbirini takip eden amino asitlerin oluşturdukları spesifik yapılardır (yani, sarmallar, beta-plakaları ve dönüşler gibi). Diğer taraftan üçüncül (tersiyer) yapılar, ikincil yapıların bir araya gelerek oluşturdukları motifler veya yapılardır. İki veya daha fazla polipeptit zincirleri olan protein komplekslerinde her protein zincirinin oluşturduğu yapı dördüncül (kuaterner) yapıları olarak adlandırılır.



Şekil 2.5 Farklı seviyelerdeki protein yapılarının gösterimi

Diğer taraftan, proteinlerin birincil yapılarının oluşturdukları peptit zinciri boyunca amino asitlerin dizilimleri arasındaki benzerliklere, farklılıklara ve ortak evrimsel kökene dayanarak proteinler sınıflandırılabilirler. Evrimsel köken ile kasıt proteinlerin ortak atadan yani benzer olduklarıdır. Ayrıca farklı türlerde, proteinler ve genler arasındaki ortak atanın olmasına homoloji denir.

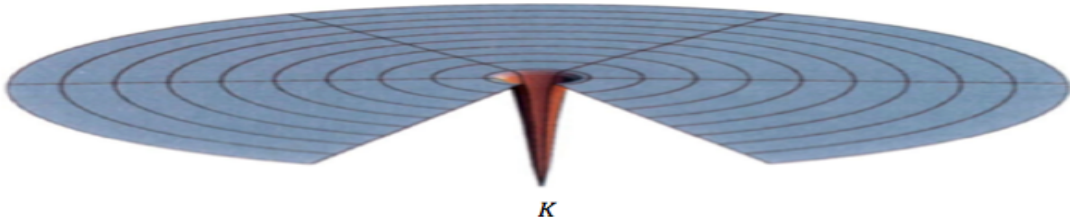
Proteinler sahip oldukları katlı yapıları göre ailelere ayrılmışlardır. Bu bağlamda, SCOP (Structural Classification of Proteins) proteinlerin yapısal sınıflandırılması için kullanılan bir veri tabanıdır [5]. Bu veri tabanında proteinin üç boyutlu katlı yapılarına ve amino asit dizilimlerine göre protein yapısal bölgelerinin (domain) bir sınıflandırılması sunulmaktadır [5]. Proteinlerin içerdikleri ikincil yapı muhtevisiyatına göre sınıflandırılmaları aşağıda verilmiştir:

1. Tamamıyla alfa (α) sarmal ailesi
2. Tamamıyla beta (β) tabaka ailesi
3. Hem alfa hem beta ($\alpha + \beta$ ve α/β) ailesi [6]

2.3.2. Protein katlanması

Önceki bölümlerde ifade edildiği gibi, içerdikleri 20 farklı amino asitten dolayı proteinler biyolojik hetero-polimerlerdir. Burada protein katlanmasından kasıt hücre içerisinde sentezlenen bir proteinin biyolojik olarak aktif olduğu 3-boyutlu ve düşük enerjili (yani, kararlı) yapıya ulaşma sürecidir. Bir proteinin katlı yapıya ulaşması birbirinden farklı yollarla (trajektörü) gerçekleşmesi mümkündür. Her yolağın katlı yapıya ulaşma süresi ve/veya takip edeceği konformasyonel değişimler birbirinden farklı olabilmektedir.

İstatistiksel olarak protein bir homopolimer olarak düşünüldüğünde ve tüm mümkün olan konformasyonlar arasında geçiş yapma ihtimalinin eşit olduğu kabul edildiğinde (Şekil 2.6'da ki gibi); hedeflenen bir konformasyona (mesela, katlı yapıya) ulaşmak inanılmaz uzun süreler alabilmektedir. Bu bağlamda Levinthal tarafından ortaya atılan paradoks ilginçtir [7]. Levinthal paradoksu; bir proteinin doğru katlanmış yapısına gelişigüzel bir şekilde ulaşabilmesi için geçen sürenin, evrenin şimdiki yaşından daha fazla olduğunu göstermiştir [7].

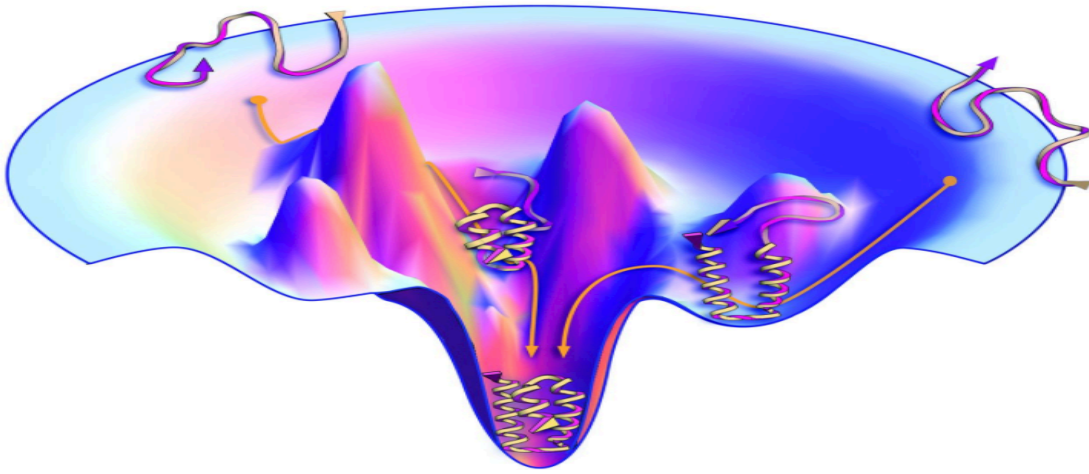


Şekil 2.6 Levinthal paradoksu ve golf sahası ile gösterimi

Ama gerçekte, proteinler pico saniye ile saniye mertebesinde çok hızlı bir şekilde katlanmaktadır [8]. Dolayısıyla katlanmanın hızla gerçekleşmesini sağlayan eğilimler (bias) ve etkileşimler mevcuttur. Bunu da belirleyen hem fizyolojik şartlar hem de proteinlerdeki amino asit içeriğidir.

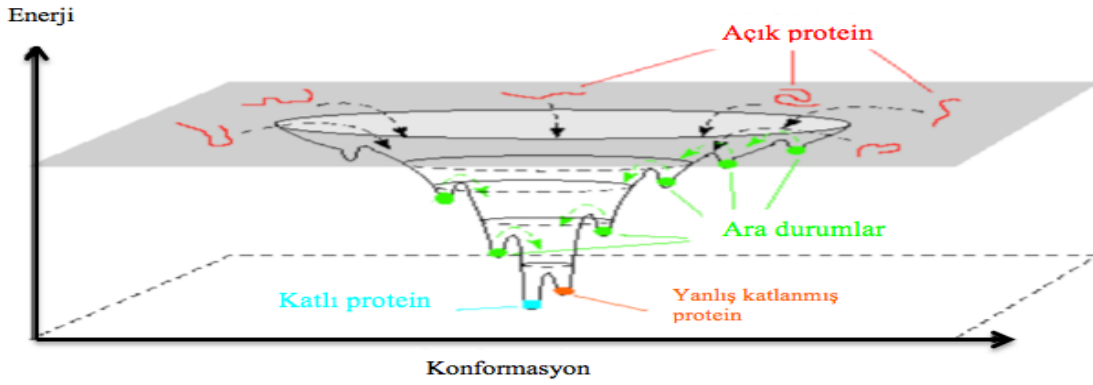
2.3.2.1. Protein katlanması termodinamiği ve enerji yüzeyleri

Proteinlerin açık konformasyonlardan, katlı konformasyona geçişlerinde takip ettikleri yollar ve buna bağlı olarak gerçekleşen yapısal ve enerjetik değişimler Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Huni şeklindeki yüzey çok boyutlu enerji yüzeyi olup takip edilen yol ise yolaktır. Enerji yüzeyinin topolojisi proteinin katlanırken, farklı sıcaklıklarda elde edilen konformasyon örneklerinin kullanılmasına bağlı olarak çok daha efektif oluşturulabilir. Enerji yüzeyi topolojisi katlanmanın ne kadar zor veya kolay gerçekleştiğini gösterebilmektedir. Ayrıca proteinin katlanma kinetiği, proteinin katlanma yolağı ile karakterize edilebilir. Proteinin en kararlı konformasyonu, minimum serbest enerjiye sahip olduğu konformasyondur ki; bu da katlı yapı olarak adlandırdığımız yapıdır. Serbest enerji, sistemin davranışını belirleyen potansiyel enerji yüzeyi ve proteinlerin katlanma sürecine etkisi olan entropik etkilere bağlı olarak belirlenir. Şekil 2.7’deki üç boyutlu serbest enerji yüzeyi, sıcaklık ve konformasyonel parametrelere bağlı olarak elde edilmiştir [9].



Şekil 2.7 Protein katlanma yollarının ve enerji yüzeyi gösterimi

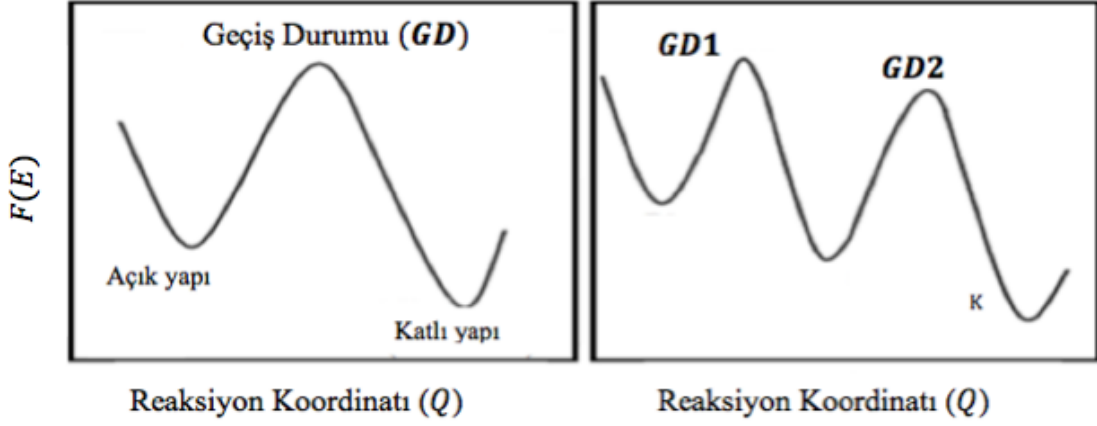
Proteinlerin termodinamik davranışları serbest enerji yüzeyleri incelenerek anlaşılabilir. Her proteinin enerji yüzeyi birbirinden farklılaşan huniler ile tasvir edilir. Protein katlanma hunisinde yani serbest enerji hunisinde açık protein konformasyonları yüksek enerji ve yüksek entropiye sahip olduğu için huninin üst kısmında yer alır (bakınız Şekil 2.7). Protein daha fazla etkileşmelerin gerçekleştiği ve enerjisinin daha düştüğü tıknaz yapıya ulaştıkça, huninin alt kısımlarına doğru ilerler. En sonunda protein katlandığında yani en düşük enerjili ve en düşük entropili yapıya ulaştığında huninin en dibine ulaşmış olur (Şekil 2.7) [10].



Şekil 2.8 Protein katlanma yolağı gösterimi

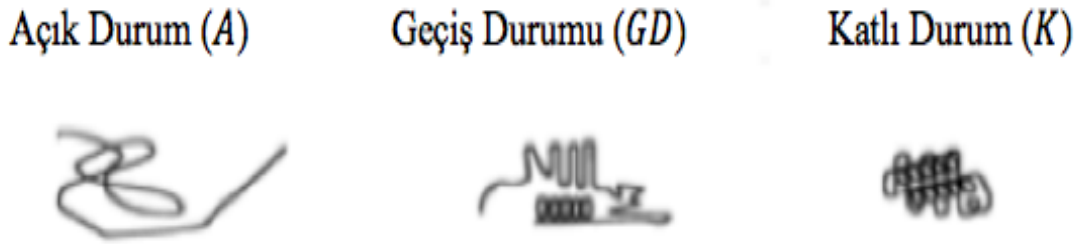
Proteinlerin termodinamik davranışları; sıcaklık, ortamın pH'ı, denatürant miktarı gibi farklı fizyolojik şartlara bağlı olarak değişmekte ve hatta açılıp tekrar katlanabilmektedir [11]. Her proteinin sahip olabileceği inanılmaz sayıda konformasyon bulunduğu için, bu konformasyonlar katlı, açık, ara durum, geçiş durum, ve tuzak konformasyonlar toplulukları olarak sınıflandırılabilirler. Katlı durum konformasyonları düşük enerjili yani daha kararlı oldukları için bunları deneysel olarak ayırt etmek mümkündür. Fakat diğer konformasyon topluluğu üyeleri kararsız oldukları için bunların ayırt edilmesinde (mesela kristal yapılarının elde edilmesi gibi) zorluklar yaşanmaktadır. Bu tez çalışmasında, proteinin katlı durumu “K” ile gösterilecek, proteinin açık durumu “A” ile gösterilecektir. Katlanma ve açılma süreçleri boyunca proteinin zincir uzunluğu, amino asit dizilimi ve katlı yapı topolojisine bağlı olarak tamamıyla farklı termodinamik davranışlar gözlemlenebilir. Bunlar; (i) kooperatif olmayan bariyersiz (downhill) davranış, (ii) kooperatif iki-durum davranışı ve (iii) üç-durum veya çoklu-durum (multi-state) davranışdır.

Kooperatif olmayan bariyersiz termodinamik davranış; katlı ve açık yapı toplulukları arasında geçişler gerçekleşirken aşılması gereken herhangi bir bariyerin olmadığı davranıştır. Neredeyse katlanma/açılma yolları boyunca ziyaret edilen tüm konformasyon popülasyonları birbirine yakındır. Diğer bir deyişle, katlanma ve açılma olabildiğince kolaydır. İki-durum termodinamik davranışında, aşılması gereken bir bariyer söz konusudur. Mevzu bahis bu bariyerin yüksekliği, geçiş durum ve/veya ara durum konformasyonlarının popülasyonuna bağlı olarak artmakta veya azalmaktadır. Yani popülasyon yüksek ise bariyer düşük, popülasyon düşük ise bariyer yüksektir. Bariyerin oluştuğu bölgedeki konformasyonlar “Geçiş Durum (GD)” konformasyonları olarak adlandırılmaktadır.

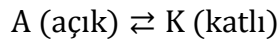


Şekil 2.9 Proteinlerin iki durumlu ve çok durumlu geçişleri

Şekil 2.9'da reaksiyon koordinatı ile serbest enerji profili değişimi gösterilmektedir. Burada seçilen reaksiyon koordinatı katlı yapıya benzerlik parametresi Q 'dur. Bu benzerlik parametresi; bir konformasyonun sahip olduğu toplam katlı kontak sayısı N_{kontak} ile katlı yapıdaki toplam kontak sayısının $N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$ oranı ($Q = N_{\text{kontak}}/N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$) olarak tanımlanmaktadır [12]. Bu parametre 0 ve 1 arasında değerler alabilmektedir. Eğer $Q = 1$ ise katlı yapıdaki tüm kontakların oluştuğu, $Q = 0$ ise katlı yapıdaki kontakların hiçbirisinin oluşmadığını ifade eder [12]. Diğer taraftan, protein katlanması çalışmalarının reaksiyon koordinatı olarak konformasyon enerjisi de seçilmektedir.



Şekil 2.10 Farklı protein durumlarının görsel gösterimi



Bu açılma/katlanma reaksiyonunu gösterir. İki durum geçişleri K katlı ve A açık ile temsil edilebilir. Proteinin açılma hızı;

$$v_a = k_a[A]$$

eşitliği ile ifade edilir. Bu ifadede ki k_a açılma oranı ve $[A]$ ise açık durum konsantrasyonudur. Aynı şekilde katlanma hızı;

$$v_k = k_k[K]$$

eşitliği ile ifade edilir. Bu ifadede ki k_k katlanma oranı ve $[K]$ ise katlı durum konsantrasyonudur. Açılma ve katlanma hızları eşit olduğu zaman yani kimyasal dengede iken denge durumu;

$$k_a[A] = k_k[K]$$

ifadesine eşit olur. Sistemin denge sabiti;

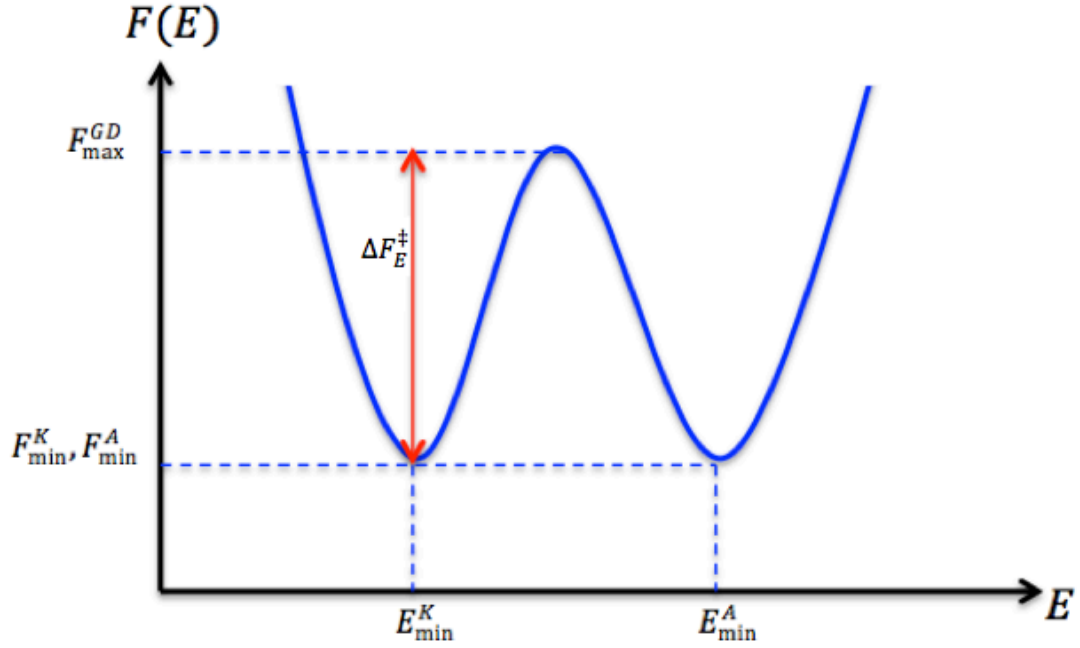
$$K_d = \frac{[A]}{[K]} = \frac{k_k}{k_a}$$

ifadesindeki gibidir. Denge sabiti, katlı ve açık yapı konsantrasyonuna ya da katlanma ve açılma oranına bağlıdır. $K_d = 1$ ise sistem dengededir. Proteinin katlı durum serbest enerjisi G_K olarak, açık durum serbest enerjisi G_A olarak gösterilir. Bu katlı ve açık durumların yani farklı iki durumun serbest enerjileri arasındaki fark ne kadar büyük olursa protein kooperativitesi o kadar yüksek olur. Bu farka da açılma serbest enerjisi denir ve ΔG_A ile gösterilir.

$$\Delta F_A = F_A - F_K$$

Diğer taraftan, seçilen reaksiyon koordinatına bağlı olarak serbest enerji profili aşağıdaki eşitlikteki gibi hesaplanmaktadır. Yani, reaksiyon koordinatının (E veya Q) değerine karşılık gelen konformasyon popülasyonunun negatif logaritması, o reaksiyon koordinat değerindeki serbest enerji değerini vermektedir.

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



Şekil 2.11 İki durum davranışı gösteren proteinler için geçiş sıcaklığında serbest enerji profil tasviri

Şekil 2.11’de iki durum davranışı gösteren proteinlerin, açık ve katlı yapı konformasyon popülasyonları arasındaki geçişleri ve serbest enerji profili gösterilmiştir. Bu grafikte reaksiyon koordinatı olarak konformasyon enerjisi ele alınmış ve geçiş sıcaklığındaki serbest enerji profili gösterilmiştir. E_{\min}^K ve E_{\min}^A sırasıyla katlı yapı ve açık yapı toplulukları minimumlarını göstermektedir. F_{\min}^K ve F_{\min}^A ise sırasıyla katlı yapı ve açık yapı topluluğu minimumlarına karşılık gelen serbest enerji değerlerini belirtmektedir. F_{\min}^{GD} ise katlı yapı ile açık yapı topluluklarını ayıran bariyerin (geçiş durum bölgesinin) maksimum olduğu serbest enerji değerini belirtmektedir. ΔF_E^\ddagger ’de katlanma/açılma geçişleri sırasında aşılması gereken bariyer yüksekliğini betimlemektedir. Geçiş sıcaklığında açık ve katlı yapı popülasyonları eşit olduğu için

$$\Delta F_E^\ddagger = F_{\max}^{GD}(E) - F_{\min}^K(E) = F_{\max}^{GD}(E) - F_{\min}^A(E)$$

olacaktır.

Proteinlerin katlanma/açılma geçişlerinin ne kadar kooperatif olduğu; katlı ve açık yapı toplulukları minimumları arasındaki fark ($E_{\min}^A - E_{\min}^K$) ve serbest enerji bariyer yüksekliği (ΔF_E^\ddagger) ile kolayca anlaşılabilir.

Kooperatif davranış, genel olarak ya hep ya da hiç (all-or-none) şeklinde bir davranış olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir deyişle, bir anda açılma veya bir anda katlanma olarak da düşünülebilir. Detaylı açıklamak gerekirse; örneğin, açık yapıdaki bir protein diğer açık yapı topluluğundaki konformasyonlara geçişler gerçekleştirirken, bir takım kritik kontaklara sahip konformasyonlara ulaştığında (ki bunlar geçiş durum konformasyonları olarak tanımlanabilir) bir anda katlanabilmektedir. Geçiş durum konformasyonları olabildiğince kararsız konformasyonlardır. Bu konformasyonlardan çok hızlı bir şekilde ya tekrar daha açık konformasyonlara geçiş ya da yine çok hızlı bir şekilde katlı yapıya geçiş sağlanır. Bu hızı belirleyen katlanma yolağı boyunca ziyaret edilmesi gereken konformasyonların popülasyonudur. Dolayısıyla, proteinlerde kooperatif davranışın dereceleri de söz konusudur. Kooperatif katlanma/açılma geçişleri sigmoidal dağılım gösterirler [13].

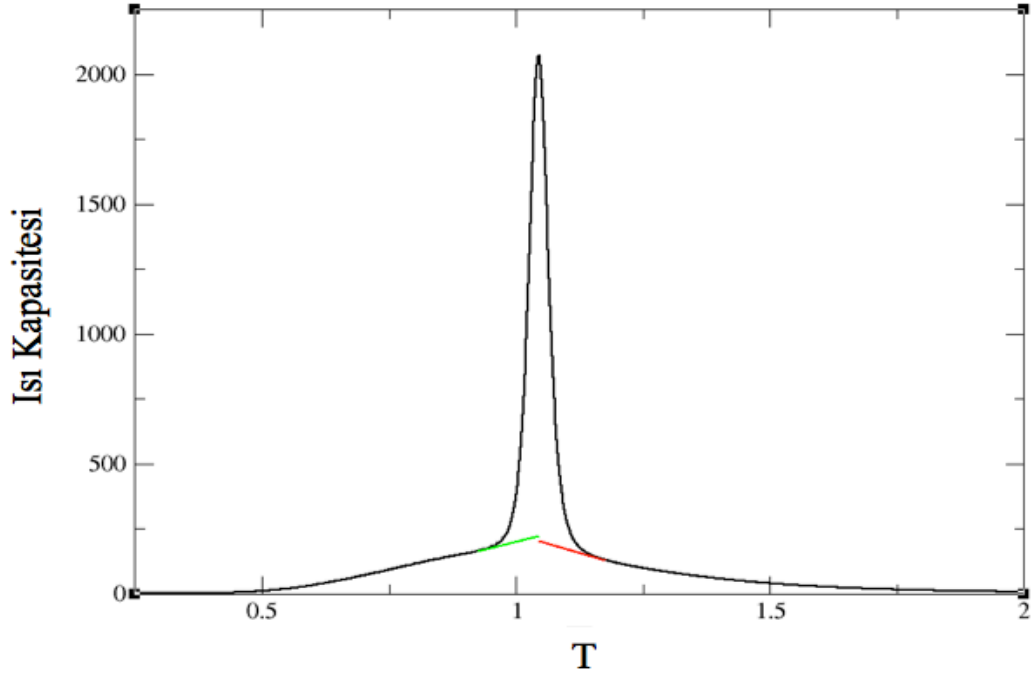
Proteinlerde kooperatif davranış sabit pH'da fakat farklı sıcaklıklarda proteinin emdiği veya serbest bıraktığı ısı miktarı değişimi incelenerek belirlenmektedir. Bunun için diferansiyel taramalı kalorimetrik ölçümler gerçekleştirilmektedir. İlginç bir şekilde küçük tek-bölgeli proteinler (genelde kooperatif iki-durum davranışı gösteren proteinler) için; ısı kapasitesi eğrisi altındaki alan olarak tanımlanan kalorimetrik entalpi ΔH_{cal} ile geçiş sıcaklığı etrafında tanımlanan van't Hoff entalpi ΔH_{vH} oranları 1'e yakın çıkmaktadır [13,15].

$$\kappa_s = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} \cong 1$$

Bu değer elde edilirken katlanma/açılma geçişleri ile ilgili olmayan katkılar çıkarılmıştır [16,17].

Şekil 2.12'de farklı sıcaklıklarda katlanma/açılma geçişlerinden elde edilen ısı kapasitesi değişimi gösterilmektedir. Isı kapasitesinin maksimum olduğu değere karşılık gelen sıcaklık T_{max} , geçiş sıcaklığı olarak adlandırılmaktadır. Kırmızı ve yeşil çizgilerin ve devamındaki kuyruk kısımların altında kalan alanlar katlanma/açılma geçişlerine katkısı olmadığı için; van't Hoff ve kalorimetrik entalpi hesaplamalarında ihmal edilmiştir. Burada ısı kapasitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmaktadır [13].

$$C_p = \frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} = \frac{\langle H^2(T) \rangle - \langle H(T) \rangle^2}{k_B T^2}$$



Şekil 2.12 Isı kapasitesine karşılık sıcaklık değişimi eğrisi

Benzer şekilde kalorimetrik entalpi ΔH_{cal} ve van't Hoff entalpi ΔH_{vH} aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır

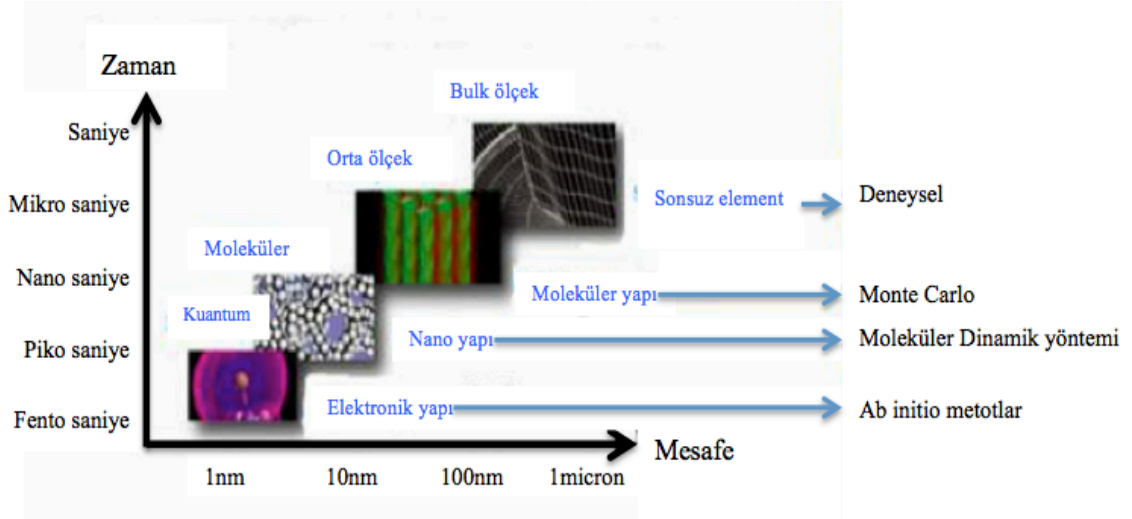
$$\Delta H_{cal} = \int_{T_1}^{T_2} C_P(T) dT = \int_{T_1}^{T_2} \left(\frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} \right) dT$$

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

Burada T_{max} geçiş sıcaklığı, $C_{P,max}$ ısı kapasitesinin maksimum değeri ve k_B Boltzmann sabitidir [14].

2.4. Bilgisayara Dayalı Hesaplama ve Simülasyon Yöntemleri

Simülasyon diğer adıyla benzetim; fiziksel, kimyasal, biyolojik vd. sistemlerin davranışlarını ve özelliklerini bilgisayar teknolojileri yardımıyla anlamamızı kolaylaştıran tekniklerdir. Simülasyon teknikleri ve istatistik mekanik yardımı ile sistemlerin farklı ölçeklerdeki (atomik ve/veya makroskopik) özellikleri belirlenebilir.



Şekil 2.13 Simülasyon ölçekleri ve kullanılması önerilen simülasyon teknikleri

Şekil 2.13'te farklı sistem büyüklüklerinde, hangi ölçeklerde hangi simülasyon tekniğinin kullanılması gerektiği ve ihtiyaç duyulan süreler gösterilmektedir [18].

Bilgisayar simülasyonları özellikle analitik yöntemlerle çözülmesi çok zor olan kompleks sistemlerin ya da deney ortamında gözlenebilmesi oldukça zor olan olayları daha iyi anlaşılabilmesini sağlamak açısından kritik öneme sahiptir. Örneğin, çok yüksek sıcaklık, basınç, enerjilerde deneyler gerçekleştirmek veya nano ölçekte gerçekleşen olayları takip edebilmek zor hatta imkansız olmasına rağmen bilgisayar simülasyonlarında bunların gerçekleştirilmesi daha kolaydır. İncelenen sistemin özelliklerine göre farklı modelleme yaklaşımları ve simülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Geliştirilen modellerden elde edilen sonuçlar, gerçek deney sonuç ve gözlemleri kıyaslanarak test edilirler. Başarılı model ve simülasyon teknikleri ayrıca farklı sistemlerin anlaşılması ve problemlerin çözümü için kullanılabilirlerdir.

Proteinler oldukça yüksek serbestlik derecesine sahip olabildikince spesifik ve kompleks yapılara sahiptirler. Diğer taraftan, farklı fizyolojik şartlara karşı gösterdikleri hassaslık proteinlerin modellenmesini zorlaştırmaktadır. Özellikle proteinlerin katlanma sürelerinin çok kısa oluşu karşılaşılan diğer bir zorluktur [19]. Günümüzde proteinler için çok farklı komplekslik seviyesi içeren model yaklaşımları ve simülasyon teknikleri kullanılmaktadır.

Şu ana kadar geliştirilen simülasyon yöntemleri genel olarak iki sınıfa ayrılabilirler, bunlar: tüm olayların rastlantısal (stokastik) olarak gerçekleşmesine dayanan Monte Carlo simülasyon yöntemi ile yine tüm olayların hareket denklemleri ile ifade edildiği

ve bu hareket denklemlerinin çözümüne bağlı olarak bir sonraki zaman adımında gerçekleşecek hareketleri ve etkileşimleri belirleyen (deterministik) simülasyon yöntemi olan moleküler dinamik simülasyon yöntemidir. Bu iki simülasyon yönteminin birbirine göre hem avantajı hem de dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin bir sistemin termodinamik davranışlarının belirlenmesinde Monte Carlo simülasyon yöntemi daha başarılı (faz uzayını daha iyi örneklemesinden dolayı) iken, kinetik davranışlar için moleküler dinamik simülasyon yöntemi (gerçek zaman ile kıyaslanabilir zaman ölçeğine sahip olmasından dolayı) daha başarılı sonuçlar vermektedir.

2.4.1. Moleküler Dinamik (MD) Yöntemi

Moleküler dinamik simülasyon yöntemi 1950'li yılların sonunda ilk kez Alder ve Wainwright tarafından sert küre yaklaşımındaki etkileşimleri incelemek amacıyla kullanılmıştır [19]. Bu yöntemin biyolojik sistemlerde ilk kullanımı 1977 yılında BBTI'nın (bovine pancreatic tyripsin inhibitor) modellenmesi ve davranışlarının incelenmesi ile başlamıştır [19]. Geçmişten günümüze birçok alanda moleküler dinamik yöntemi kullanılmıştır. Mesela ilaç dizaynı, farklı biyomolekülün dinamiği, konformasyonel değişimlerin analizi, faz geçişleri vd.

Moleküler dinamik simülasyon yöntemi klasik mekanik yaklaşım içeren Newton hareket kanunlarına dayanmaktadır. Klasik mekanik, hareket eden nesnelerin konumlarının zaman içerisinde nasıl değiştiklerini ve nesnelerin nasıl hareket ettiğini betimler. N parçacıklı bir sistem için hareket denklemi

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{dv_i}{dt}$$

şeklinde ifade edilmektedir. Burada F_i , a_i ve t sırasıyla i 'inci atoma etki eden kuvvet, i 'inci atomun ivmesi ve zamanı göstermektedir. Her parçacığa etkiyen kuvvet ise etkileşim potansiyelinin negatif gradyenti olarak hesaplanmaktadır.

$$F_i = -\vec{\nabla} U = -\frac{\partial U}{\partial r_i}$$

Bu iki denklem birbirine eşitlenirse;

$$F_i = m_i \frac{dv_i}{dt} = - \frac{\partial U}{\partial r_i}$$

$$\frac{dv_i}{dt} = - \frac{1}{m_i} \frac{\partial U}{\partial r_i}$$

Sistem kapalı bir sistem (dışarıdan ısı ve parçacık alışverişi yok) ise sistemin toplam enerjisi E değişmez. Yani parçacık sayısı N , hacim V ve toplam enerji E 'nin sabit olduğu durumlarda sistem mikrokanonik topluluğa uygun şekilde formalize edilir. Ayrıca dengede olan sistemlerin atomlarının hızları ve enerjileri Maxwell-Boltzmann dağılımına uyarlar. Eş bölüşüm teorisi kullanıldığında

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

$$\langle v_i^2 \rangle = \frac{k_B T}{m_i}$$

olduğu görülecektir [20]. Yani N tane parçacıktan oluşan $3N$ serbestlik derecesine sahip sistemin kinetik enerjisi $\frac{3}{2} N k_B T$ 'ye eşittir. Dolayısıyla her bir serbestlik derecesine karşılık $1/2 k_B T$ 'lik bir kinetik enerji gelmektedir.

Diğer taraftan, moleküler dinamik simülasyonlarında sistemi dengeye daha hızlı getirmek için simülasyon sıcaklığı T 'ye ve Boltzmann dağılımına uygun olacak şekilde, atomların her doğrultudaki hız bileşenlerine değerler tayin edilmelidir.

Yukarıdaki hareket denklemleri ile t zamanında parçacıkların konum ve hız bilgileri bilindiğinde; $(t + \Delta t)$ zamanındaki konum ve hız değerleri bulunabilir. Bu bağlamda, Taylor seri açılımı kullanarak, bu denklemler numerik olarak integre edilir [21]. Δt zaman sonraki konum vektörünün Taylor açılımı aşağıda verilmiştir [22].

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \frac{dr_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 r_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + \dots$$

Bu denklemde $\frac{dr_i}{dt} = v_i$ eşitliğini yerine yazacak olursak

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t) \Delta t + \frac{1}{2} a_i(t) \Delta t^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 r_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + \dots$$

elde edilir [22]. Benzer şekilde Δt zaman önceki konum vektörünün Taylor açılımı

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - v_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}a_i(t)\Delta t^2 - \frac{1}{6}\frac{d^3r_i(t)}{dt^3}\Delta t^3 + \dots$$

olacaktır [22]. $r_i(t + \Delta t)$ ve $r_i(t - \Delta t)$ ifadeleri taraf tarafa toplanırlarsa

$$r_i(t + \Delta t) + r_i(t - \Delta t) = 2r_i(t) + a_i(t)\Delta t^2$$

veya

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + a_i(t)\Delta t^2$$

ifadesi elde edilir. İvme son eşitlikte yerine konulduğunda

$$r_i(t + \Delta t) \cong 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{F_i(t)}{m_i}\Delta t^2$$

bulunur. Bu algoritma Verlet algoritması olarak bilinir [23]. Verlet hız algoritması bu tez çalışmasında nümerik integrasyon almak için kullanılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Katlı Yapı Bilgisine Dayalı Gō-Modeli

Proteinler hem amino asitlerin birbirine kovalent bağlar ile bağlı olmasından hem de her amino asidin farklı kenar zincirleri olması sebebiyle; farklı serbestlik ve gerçeklik derecelerine sahip model yaklaşımları geliştirilmiştir. Analitik yaklaşımlar ve zincir temsili içermeyen modelleme çalışmalarının yeterince başarılı sonuçlar vermemesi üzerine; zincir temsili içeren modeller geliştirilmeye başlanmıştır. 2000 yılına kadar sürekli ve süreksiz ortam Monte Carlo latis modelleri (örneğin, 2-harf modeli, 3-harf modeli, 20-harf modeli, HP modeli) daha sonraki yıllarda moleküler dinamik modeller daha revaçta hale gelmiştir [14]. Latis modelleri arasında en çok kabul gören HP modeli olmuştur. Bu modelde her amino asit sadece bir atom ile temsil edilmiş ve amino asitler hidrofobik ve polar amino asitler olarak ele alınmıştır. Fakat daha sonra gerçek proteinler kadar kooperatif olmadığı gösterilmiştir.

Şu ana kadar geliştirilen modeller arasında en ilginç olanı; 1983 yılında Nobuhiro Gō tarafından geliştirilen modeldir [24]. Gō model yaklaşımında proteinlerin katlı yapısındaki etkileşmelerin diğer etkileşmelerden daha dominant veya belirleyici olduğu kabulü yapılmaktadır. Katlı yapıdaki kontaklar protein dinamiğini belirlediğinden dolayı, proteinden proteine etkileşim haritaları değişmektedir. Diğer bir deyişle, Gō-modeli protein spesifik modeldir. Aslında önerildiği ilk yıllarda fiziksel olmayan ve pek kabul görmeyen bu model, 1998 yılında yapılan bir çalışma da katlanma oranları ile protein katlı yapı topolojisi arasında yüksek korelasyon bulunması ile daha çok kabul görmeye başlamıştır [25].

Hakikaten gerek protein katlanması kooperativitesi gerekse katlanma oranlarının gösterdiği farklılaşmayı en iyi açıklayan model Gō-modelidir [12]. Gō-modelinin sağladığı en önemli avantaj: (i) en düşük enerjili yapının gerçek katlı yapı olması, (ii) tuzak konformasyonlar veya enerji bunalımının olmamasıdır.

Bu tez çalışmasında kullanılan protein modelinde; her amino asit, o amino asidin α -karbon atomuyla temsil edilmiştir. Yani diğer omurga atomları ve kenar zincir atomları

göz önüne alınmamıştır. Diğer atomlar (hidrojen atomları hariç) sadece katlı yapıda hangi amino asitlerin birbirleriyle etkileştiğini belirlemek için kullanılmıştır.

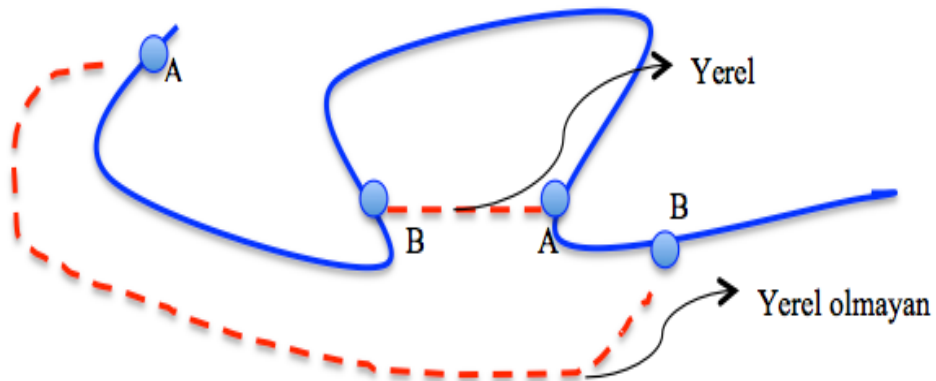
3.2. Protein Gō-Modelinde Etkileşim Tasvirleri (Kuvvet Alanları)

Moleküler dinamik simülasyonlarında, bir sonraki zaman adımında atomların konum ve hızlarının belirlenebilmesi için her bir parçacığa etki eden kuvvetlerin bilinmesine ihtiyaç duyulur ve bu kuvvet, potansiyel enerjinin negatif gradyenti olarak hesaplanır [26].

$$F_i = -\vec{\nabla}U = -\frac{\partial U}{\partial r_i}$$

Proteinlerde amino asitlerin bir zincir olarak birbirine bağlı olması ve sarmal, plaka gibi çok spesifik ikincil yapılar oluşturmaları dolayısıyla; protein içinde etkileşen amino asitlerin, protein zinciri üzerinde birbirine olan mesafelerine bağlı olarak farklı etkileşim türleri tanımlanmaktadır. Bunlar; yerel ve yerel olmayan etkileşimlerdir. Yerel etkileşimler, zincir üzerinde birbirine yakın olan amino asitler arasındaki (mesela, i 'inci amino asitten $i + 4$ 'üncü amino aside kadar ki) etkileşimler olup spesifik ikincil yapıların oluşmasına katkı sağlarlar. Yerel etkileşimlere açılal terimlerde denilmektedir. Bunlar gerilme, eğilme ve bükülme enerji terimleridir.

$$V_{\text{yerel}} = V_{\text{gerilme}} + V_{\text{eğilme}} + V_{\text{bükülme}}$$



Şekil 3.1 Yerel ve yerel olmayan etkileşimlerin gösterimi

Yerel olmayan etkileşmeler ise zincir üzerinde birbirine yakın olmayan ($j > i + 4$) amino asitler arasındaki etkileşmeler olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir adı ise bağımsız etkileşmelerdir [27].

$$V_{\text{yerel olmayan}} = V_{\text{bağımsız}} = V_{\text{LJ}} + V_{\text{sterik}}$$

Dolayısıyla, bir konformasyonun toplam etkileşme enerjisi her iki terimin toplamı olacaktır.

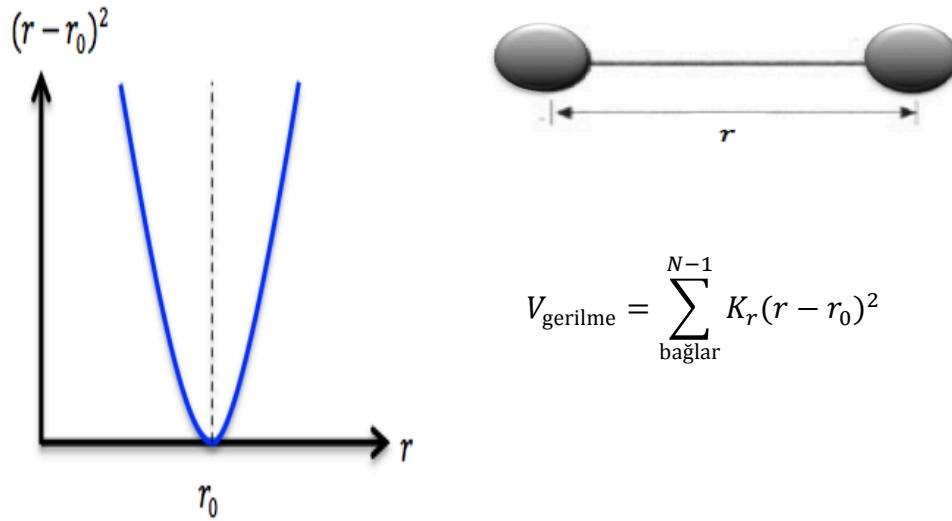
$$V = V_{\text{yerel}} + V_{\text{yerel olmayan}}$$

$$V = V_{\text{gerilme}} + V_{\text{eğilme}} + V_{\text{bükülme}} + V_{\text{LJ}} + V_{\text{sterik}}$$

Gö-model yaklaşımında kullandığımız; gerilme, eğilme, bükülme ve diğer bağımsız etkileşim potansiyellerini daha ayrıntılı inceleyelim.

3.2.1. Gerilme etkileşim potansiyeli

Birbirine komşu olan iki amino asit, birbirlerine aralarında bir yay varmış gibi bağlı olduğu düşünülür. Böylece harmonik salıncı gibi davranırlar [28].



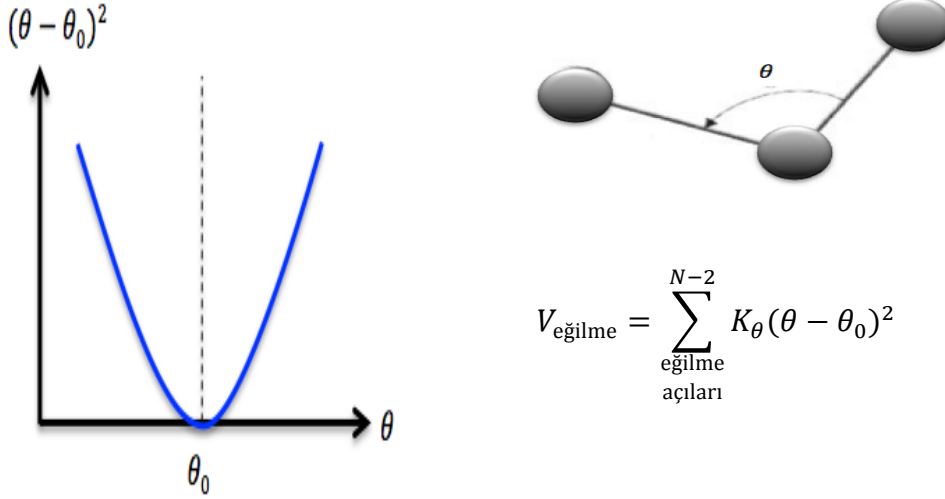
$$V_{\text{gerilme}} = \sum_{\text{bağlar}}^{N-1} K_r (r - r_0)^2$$

Şekil 3.2 Gerilme etkileşim potansiyelinin mesafeye göre değişimi

Bu denklemdeki V_{gerilme} gerilme etkileşim potansiyeli, K_r etkileşim katsayısı, r iki amino asit arasındaki mesafe, r_0 ise katlı yapıdaki mesafe (denge gerilme mesafesi) ve N ise toplam amino asit ya da parçacık sayısıdır.

3.2.2. Eğilme etkileşim potansiyeli

Protein zinciri üzerinde ardışık komşu olan üç amino asidin kovalent bağları arasında bir yay varmış gibi düşünülür (Şekil 3.3) [28].

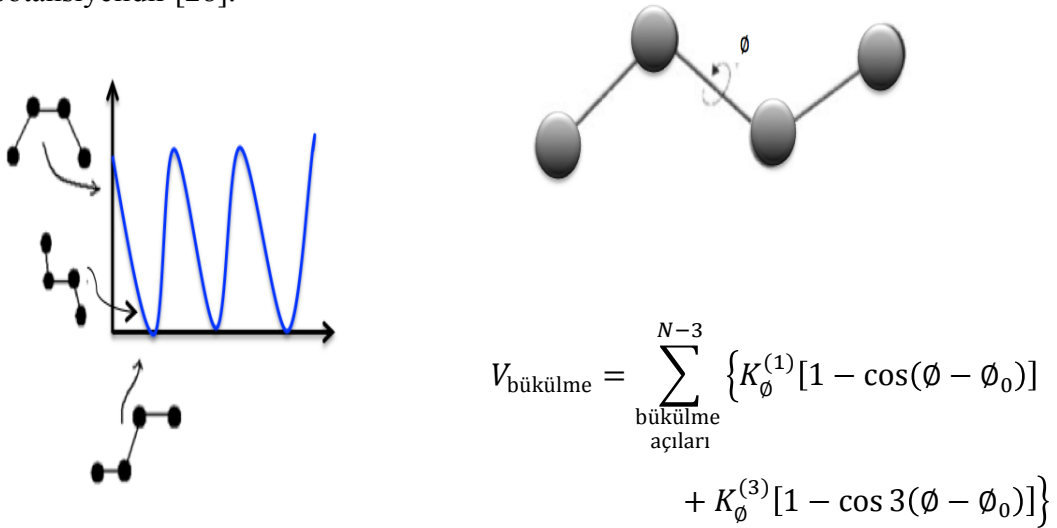


Şekil 3.3 Eğilme etkileşim potansiyelinin eğilme açısına bağlı değişimi

Bu denklemdeki $V_{\text{eğilme}}$ eğilme etkileşim potansiyeli, K_{θ} etkileşim katsayısı, θ üç amino asit arasındaki eğilme açısı, θ_0 ise proteinin katlı yapısındaki açı değeri (denge eğilme açısı) ve N ise toplam amino asit ya da parçacık sayısıdır.

3.2.3. Bükülme etkileşim potansiyeli

Birbirine ardışık komşu olan dört amino asit arasında tanımlanan etkileşim potansiyelidir [28].



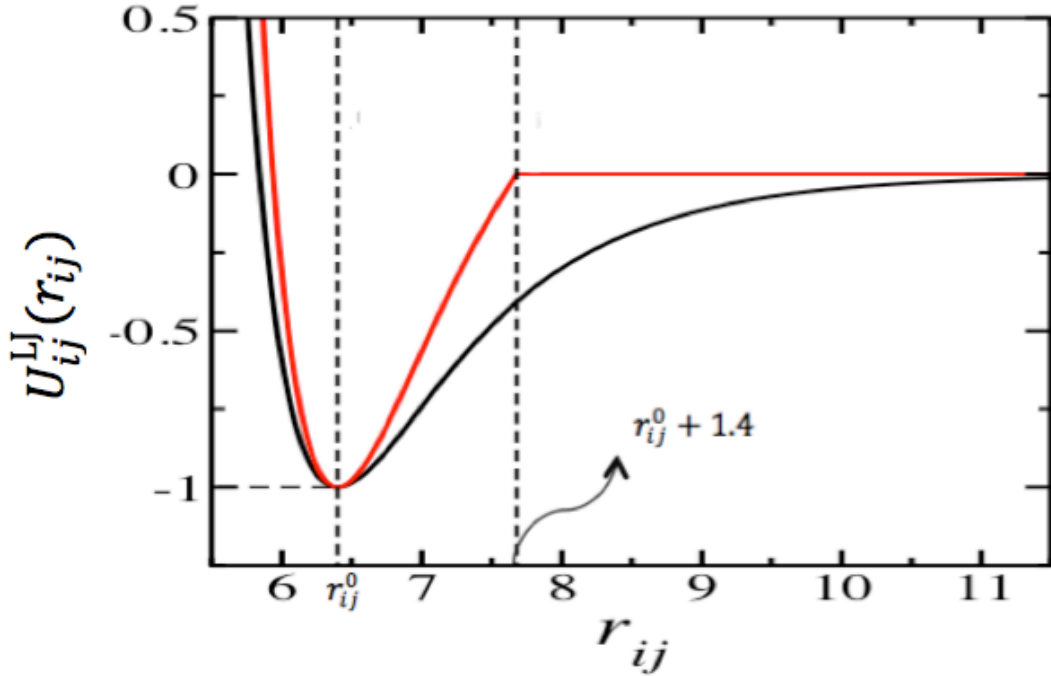
Şekil 3.4 Bükülme etkileşim potansiyelinin bükülme açısına bağlı değişimi

Bu denklemdeki $V_{\text{bükülme}}$ bükülme etkileşim potansiyeli, $K_{\emptyset}^{(1)}$ ve $K_{\emptyset}^{(3)}$ etkileşim katsayısı, \emptyset bükülme açısı, \emptyset_0 ise katlı yapıdaki bükülme açısı (denge bükülme açısı) ve N ise toplam amino asit ya da parçacık sayısıdır.

3.2.4. Bağımsız etkileşme potansiyelleri

3.2.4.1. Lennard-Jones etkileşme potansiyelleri

Elektrostatik bir doğaya sahip bağımsız etkileşimler için 10-12 Lennard-Jones matematiksel formu kullanılmıştır.



Şekil 3.5 Kısa ve uzun erişimli Lennard-Jones etkileşimlerin gösterimi

Şekil 3.5'te siyah düz çizgi ile gösterilen eğri, katlı yapıda etkileşen iki amino asit arasındaki uzun erişimli Lennard-Jones etkileşim enerjisinin mesafeye göre değişimini göstermektedir. Bu eğri aşağıdaki eşitlik

$$U_{ij}^{LJ}(r_{ij}) = \varepsilon \left[5 \left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 6 \left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{10} \right]$$

kullanılarak hesaplanmıştır [29]. Burada r_{ij}^0 katlı yapıdaki i ve j 'inci amino asitler arasındaki mesafeyi (yani, denge mesafesini) ve ε etkileşme büyüklüğünü temsil etmekte olup, $\varepsilon = 1$ 'dir [29]. Dolayısıyla, bir konformasyondaki uzun erişimli toplam

bağımsız etkileşme enerjisi

$$V_{LJ}^{\text{uzun}} = \sum_{i < j-3}^{\text{katlı}} U_{ij}^{\text{LJ}}(r_{ij})$$

olacaktır [29]. Bununla birlikte, uzun erişimli Lennard-Jones bağımsız etkileşme potansiyeli aşağıdaki gibi modifiye edilerek etkileşimler kısa erişimli

$$V_{LJ}^{\text{kısa}} = \begin{cases} \sum_{i < j-3}^{\text{katlı}} \frac{(U_{ij}^{\text{LJ}} + \varepsilon \cdot \omega)}{(1 - \omega)}, & r_{ij} \leq r_{ij}^0 + 1.4 \\ 0, & r_{ij} > r_{ij}^0 + 1.4 \end{cases}$$

hale dönüştürülebilmektedir (Şekil 3.5'te kırmızı renkli düz çizgi). Bu eşitlikte $\omega = -U_{ij}^{\text{LJ}}(r_{ij} = r_{ij}^0 + 1.4)$ şeklinde tanımlanmıştır [29]. Kullandığımız etkileşme potansiyelinde açılal terimler olduğundan ve de protein zinciri üzerinde birbirine yakın olan amino asitler arasındaki etkileşmelerin dinamiğe katkısını yüksek tutmamak için; sadece zincir üzerinde birbirine en az 4 amino asitlik mesafede ($j > i + 4$) olan amino asitler arasında göz önüne alınmıştır [29].

Gö-model yaklaşımında katlı yapıda birbirleriyle etkileşmeyen amino asitlerin konformasyonel değişimler altında birbirlerine olabildiğince yaklaşmaları (hatta birbirleri ile üst üste binmeleri) mümkündür. Bu da istenmeyen bir durumdur. Bunu engellemek için aşağıda matematiksel formu verilen yapısal kısıtlama (sterik) terim kullanılmaktadır.

$$V_{\text{sterik}} = \sum_{i < j-3}^{\text{katlı olmayan}} \varepsilon_{\text{katlı olmayan}} \left(\frac{r_{\text{itici}}}{r_{ij}} \right)^{12}$$

Bu terim sadece katlı yapıda etkileşmeyen amino asitler için kullanılmaktadır [11].

$\varepsilon_{\text{katlı olmayan}}$ etkileşim büyüklüğünü ve r_{itici} ise amino asitlerin birbirine en fazla ne kadar yaklaşabileceğini tanımlayan mesafedir ve 4 Angstrom olarak alınmıştır.

Dolayısıyla, bağımsız ve yüklü etkileşmeleri içermeyen toplam konformasyonel etkileşim potansiyeli V_0 aşağıdaki matematiksel forma sahip olacaktır.

$$\begin{aligned}
V_0 = & \sum_{\text{bağlar}}^{N-1} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{eğilme açıları}}^{N-2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\text{bükülme açıları}}^{N-3} \left\{ K_\emptyset^{(1)} [1 - \cos(\emptyset - \emptyset_0)] + K_\emptyset^{(3)} [1 - \cos 3(\emptyset - \emptyset_0)] \right\} \\
& + \sum_{i < j - 3}^{\text{kathı olmayan}} \varepsilon^{\text{kathı olmayan}} \left(\frac{r_{\text{itici}}}{r_{ij}} \right)^{12}
\end{aligned}$$

Bu denklemde etkileşim büyüklüklerini tasvir eden K_r , K_θ , $K_\emptyset^{(1)}$ ve $K_\emptyset^{(3)}$ parametrelerinin değerleri sırasıyla 100ε , 20ε , ε ve 0.5ε 'dir [12,27]. Tüm modellerde $\varepsilon = 1$ ve $\varepsilon^{\text{kathı olmayan}} = 1$ 'dir. [12, 13]

3.2.4.2. Yüklü etkileşme potansiyelleri

Bu tez çalışmasında yüklü etkileşmelerin protein dinamiğine etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir. Bu tez çalışmasında ele aldığımız 4 farklı model için toplam etkileşme potansiyelleri aşağıdaki gibi ifade edilecektir [11].

$$V_{\text{toplam}}^{(1)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{uzun}}$$

$$V_{\text{toplam}}^{(2)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{uzun}} + V_{\text{yüklü}}$$

$$V_{\text{toplam}}^{(3)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{kısa}}$$

$$V_{\text{toplam}}^{(4)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{kısa}} + V_{\text{yüklü}}$$

Burada yüklü amino asitler arasındaki etkileşme potansiyeli $V_{\text{yüklü}}$ aşağıdaki matematiksel forma sahip olarak ele alınmıştır [11].

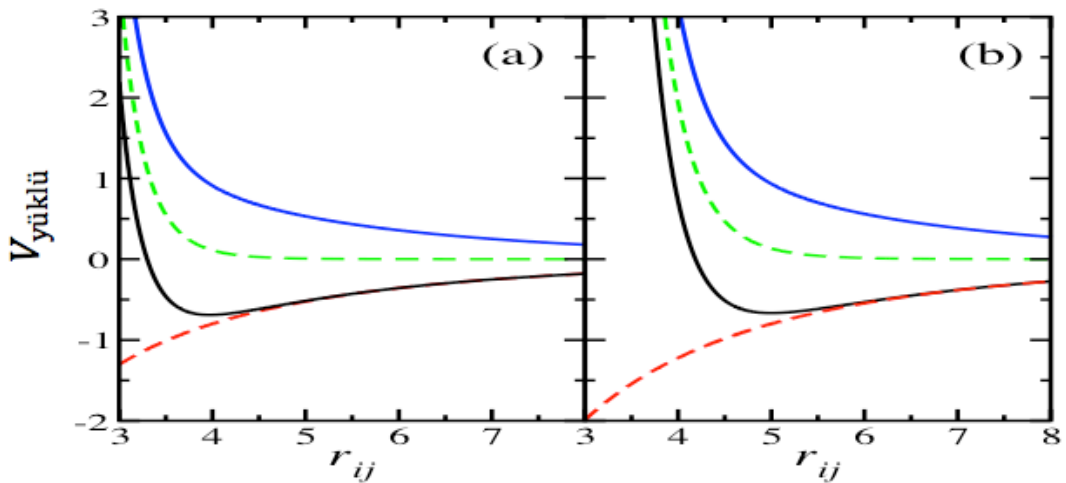
$$V_{\text{yüklü}} = \sum_i \sum_j K_{ij} \left[\left(\frac{a_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} + q_i q_j b_{ij} \frac{e^{-\kappa r_{ij}}}{r_{ij}} \right]$$

Bu denklemde q_i ve q_j sırasıyla i ve j 'inci amino asitlerin elektrik yükleridir [11]. $V_{\text{yükli}}$ denklemindeki ilk terim dışarlanmış hacim (veya sterik) terimi olup yüklü amino asitlerin birbirine çok yaklaşmasını engellemek için kullanılmaktadır. Aynı denklemdeki ikinci terim ise perdelenmiş Coulomb etkileşmesini betimlemektedir [11]. Bu terimdeki κ parametresi Debye-Hückel perdeleme uzunluğunun tersini ifade eder ve

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi I e^2}{\epsilon_r k_B T}}$$

denklemi ile hesaplanır [11]. Burada e^2 elektronik yükün karesini, I iyonik şiddeti ve ϵ_r solventin dielektrik sabitini temsil etmektedir. Bu çalışmada $\kappa = 0.2 \text{ Angstrom}^{-1}$ olarak alınmıştır [11].

Yukarıdaki $V_{\text{yükli}}$ denkleminde; K_{ij} etkileşim katsayısını ve r_{ij}^0 katlı yapıda etkileşen yüklü amino asitler arasındaki mesafeleri (denge mesafelerini) temsil etmektedir [11]. Çekici ve itici olabilecek yüklü etkileşmelerin aşırı güçlü olmasını engellemek için; K_{ij} etkileşme katsayısının minimum değerini çekici etkileşmeler için -0.8ϵ ve itici etkileşmeler için 0.8ϵ olacak şekilde düzenlenmiştir [11]. Bunu sağlamak için; katlı yapıda etkileşen her i ve j 'inci yüklü amino asit çifti için $a_{ij} = r_{ij}^0(0.002r_{ij}^0 + 0.968)$ ve $b_{ij} = 14.88 \exp(0.293r_{ij}^0)$ olarak alınmıştır [11]. Katlı yapıda olmayan yüklü etkileşmelerin tümü için $r_{ij}^0 = 5 \text{ Angstrom}$ alınarak; $a_{ij} = 4.8$ ve $b_{ij} = 50$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6 (a) Katlı yapıda olan, (b) katlı yapıda olmayan yüklü etkileşmelerin gösterimi

Şekil 3.6 (a)'da düz siyah renkli eğri $r_{ij}^0 = 4$ için elde edilen zıt yüklü amino asitler arasındaki çekici etkileşim potansiyelinin mesafeye göre değişimi ve mavi düz çizgi ise aynı yüklü amino asitler arasındaki itici etkileşim potansiyelinin mesafeye göre değişimi verilmiştir. Şekil 3.6 (b)'de ise katlı yapıda olmayan yüklü etkileşmelerin ($r_{ij}^0 = 5$) gösterimi mevcuttur.

Yüklü etkileşmeler için dikkat edilmesi gereken bir husus; diğer bağımsız etkileşmelerin aksine ($i, i + 3$) etkileşmeleri denge mesafeleri ne olursa olsun etkileştikleri kabul edilmektedir. Katlı yapıdaki etkileşen diğer yüklü amino asit çiftleri; çifti oluşturan amino asidin herhangi bir ağır atomunun, diğer amino asidin herhangi bir ağır atomu ile 6 Angstrom'den mesafeden daha yakın olup olmamasına bağlı olarak tayin edilmektedir.

Yüklü etkileşimlerden dolayı amino asitlere etkiyen kuvvetler aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır.

$$F_{\text{yüklü}} = -\nabla V_{\text{yüklü}}$$

$$F_{\text{yüklü}} = -\left(\frac{\partial}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial y} + \frac{\partial}{\partial z}\right) V_{\text{yüklü}}$$

İki yüklü amino asit arasındaki etkileşmeden dolayı i 'inci amino asite farklı doğrultularda uygulanan kuvvet bileşenleri

$$F_{x,\text{yüklü}}^i = x_{ij} \frac{1}{r_{ij}^2} K_{ij} \left[12 \left(\frac{a_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} + q_i q_j b_{ij} e^{-\kappa r_{ij}} \left(\kappa + \frac{1}{r_{ij}}\right) \right]$$

$$F_{y,\text{yüklü}}^i = y_{ij} \frac{1}{r_{ij}^2} K_{ij} \left[12 \left(\frac{a_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} + q_i q_j b_{ij} e^{-\kappa r_{ij}} \left(\kappa + \frac{1}{r_{ij}}\right) \right]$$

$$F_{z,\text{yüklü}}^i = z_{ij} \frac{1}{r_{ij}^2} K_{ij} \left[12 \left(\frac{a_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} + q_i q_j b_{ij} e^{-\kappa r_{ij}} \left(\kappa + \frac{1}{r_{ij}}\right) \right]$$

dir. Benzer şekilde j 'inci amino aside etkiyen kuvvet bileşenleri $F_{\alpha,\text{yüklü}}^j = -F_{\alpha,\text{yüklü}}^i$ olacaktır. Burada $\alpha = x, y, z$ bileşenlerini (doğrultularını) temsil etmektedir.

3.3. Langevin Dinamiği

Kullanacağımız Gō-modelinde; amino asitlere her doğrultuda etkiyecek kuvvetler, toplam konformasyon enerjisi V_{toplam} gradyenti alınarak hesaplanmaktadır.

$$F_{\text{konf}} = -\nabla(V_{\text{gerilme}} + V_{\text{eğilme}} + V_{\text{bükülme}} + V_{\text{LJ}} + V_{\text{sterik}} + V_{\text{yükü}})$$

Dolayısıyla, sistemde sadece proteini oluşturan amino asitler arasında etkileşme olduğundan; her amino asit için yazılacak hareket denklemi

$$m_i \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = F_{\text{konf}}(t)$$

formunda olacaktır. Fakat kullandığımız model yaklaşımına sistemin bir ısı rezervuarı ile çok hafif bir etkileşme içinde olduğunu (yani, dengeden uzaklaşmadan sistem çok hafif bir şekilde pertürbe ediliyor) farz ettiğimizde; yukarıdaki hareket denklemi aşağıdaki matematiksel forma sahip olur.

$$m_i \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = F_{\text{konf}}(t) - m_i \gamma_i \frac{dx_i}{dt} + \eta_i(t)$$

veya

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

Bu eşitliklerde m , \dot{v} , F_{konf} , γ , v ve η terimleri sırasıyla; kütle, ivme, konformasyonel kuvvet, sürtünme katsayısı, hız ve rastgele kuvveti ifade ederler. Sürtünme katsayısı γ , $0.05\tau^{-1}$ 'e eşit olacak şekilde alınmıştır. Rastgele kuvvet η ,

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

oto-korelasyon şartını sağlamaktadır. Ayrıca her zaman adımında her amino aside her doğrultuda etkiyen rastgele kuvvet aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır.

$$\eta_i = \left(\frac{2m\gamma k_B T}{\Delta t} \right)^{1/2} \xi_i$$

Bu eşitlikte ξ_i teriminin değerleri; ortalaması sıfır olan ve $[-1,1]$ aralığında normal dağılımına uygun şekilde gelişigüzel sayı üreten bir fonksiyondan çağırılmaktadır.

Bu hareket denklemlerine bağılı olarak amino asit koordinatlarında ve hızlarındaki değişim yine Verlet algoritması yardımıyla aşağıdaki eşitliklerle hesaplanmaktadır [30].

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

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

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

Her bir farklı koordinata göre $F_{x,konf}^{\text{önceki}}$, $F_{y,konf}^{\text{önceki}}$ ve $F_{z,konf}^{\text{önceki}}$ terimleri bir önceki yani eski konformasyonel kuvvetlerdir. $F_{x,rastgele}^{\text{önceki}}$, $F_{y,rastgele}^{\text{önceki}}$ ve $F_{z,rastgele}^{\text{önceki}}$ terimleri ise her bir farklı koordinatlara göre eski rastgele kuvvetlerdir.

Parçacıkların hızlarındaki değişim ise;

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

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

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

denklemleri elde edilir. Bu denklemlerdeki c_0 , c_1 ve c_2 terimleri aşağıdaki gibi tanımlanmış sabitlerdir. Bu sabitler;

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

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

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

şeklinde hesaplanmaktadır. Sistemin zaman ölçeği ise

$$\tau = \sqrt{\frac{ma^2}{\epsilon_0}}$$

ile ifade edilmektedir. Burada a ve ϵ_0 terimleri sırası ile parçacıkların yaklaşabileceği

minimum mesafe değeri ($a = 4$) ve sistemin enerji ölçeği ($\epsilon_0 = 1$)'dir.

Sistemin zaman ölçeği τ , ne kadar küçük ise proteinleri meydana getiren atomlar arası etkileşmeler o derece güçlüdür. Simülasyonda proteinlerin dinamiklerini ve enerji değişimlerini inceleyebilmek amacıyla 400 adımda bir konformasyon bilgisi kaydedilmiştir. Buradaki amaç ele alınan konformasyonların birbirinden bağımsız olmasını sağlamaktır.

4. BULGULAR

Yüklü etkileşmelerin protein dinamiğine etkilerini incelemek için kullandığımız Gö-modellerinin detayları önceki bölümlerde verilmişti. Bu modellerin etkileşim potansiyelleri

$$V_{\text{toplam}}^{(1)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{uzun}}$$

$$V_{\text{toplam}}^{(2)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{uzun}} + V_{\text{yüklü}}$$

$$V_{\text{toplam}}^{(3)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{kısa}}$$

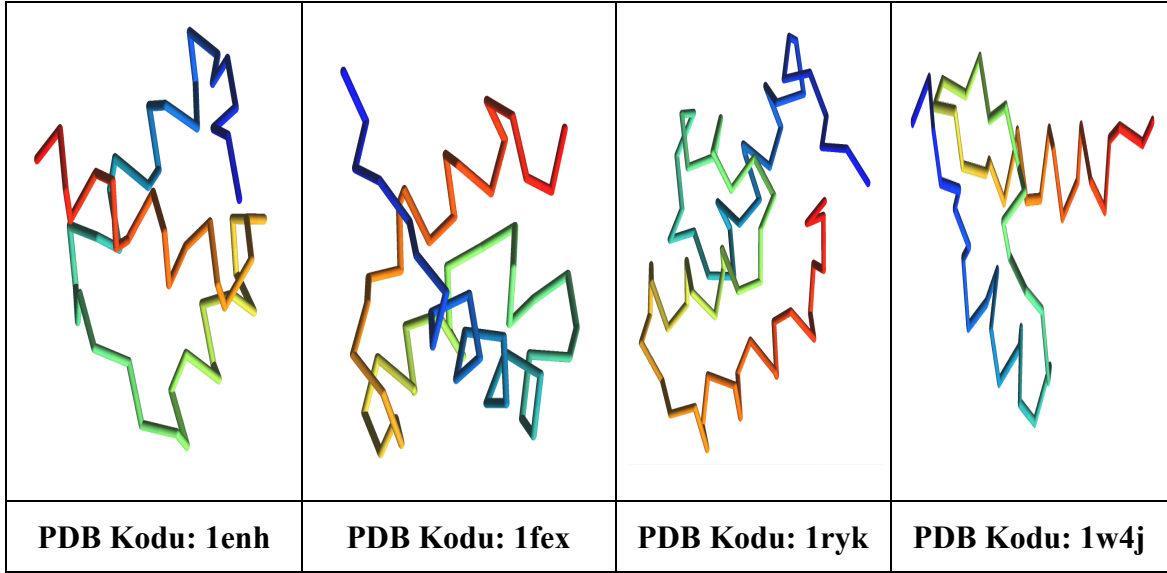
$$V_{\text{toplam}}^{(4)} = V_0 + V_{LJ}^{\text{kısa}} + V_{\text{yüklü}}$$

idi. Yerel etkileşme terimleri ($V_{\text{yerel}} = V_{\text{gerilme}} + V_{\text{eğilme}} + V_{\text{bükülme}}$) ve katlı yapıda etkileşmeyen amino asitlerin birbirlerine aşırı yaklaşmasını engellemek için kullanılan sterik terimi (V_{sterik}); geliştirilen tüm modellerde $V_0 = V_{\text{yerel}} + V_{\text{sterik}}$ terimi olarak kullanılmaktadır ve değişmemektedir. Dolayısıyla, modelleri birbirinden farklılaştıran katlı yapıdaki bağımsız etkileşmelerin uzun veya kısa erişimli olması ve yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilip edilmediğidir. Kullandığımız modelleri kolay ifade edebilmek için $M^{(i)}$ parametresi kullanılacaktır. Burada i indisi 1,2,3,4 değerlerini almakta olup, yukarıda verilen etkileşim potansiyellerindeki üst-indise karşılık gelmektedir. $M^{(1)}$ ve $M^{(3)}$ modellerinde yüklü etkileşmeler protein dinamiğine dahil edilmemiştir. $M^{(1)}$ modelinde katlı yapıdaki bağımsız etkileşmeler uzun erişimli ve $M^{(3)}$ modelinde ise kısa erişimlidir. $M^{(2)}$ ve $M^{(4)}$ modelleri ise; sırasıyla $M^{(1)}$ ve $M^{(3)}$ modellerine yüklü etkileşmelerin dahil edildiği modellerdir.

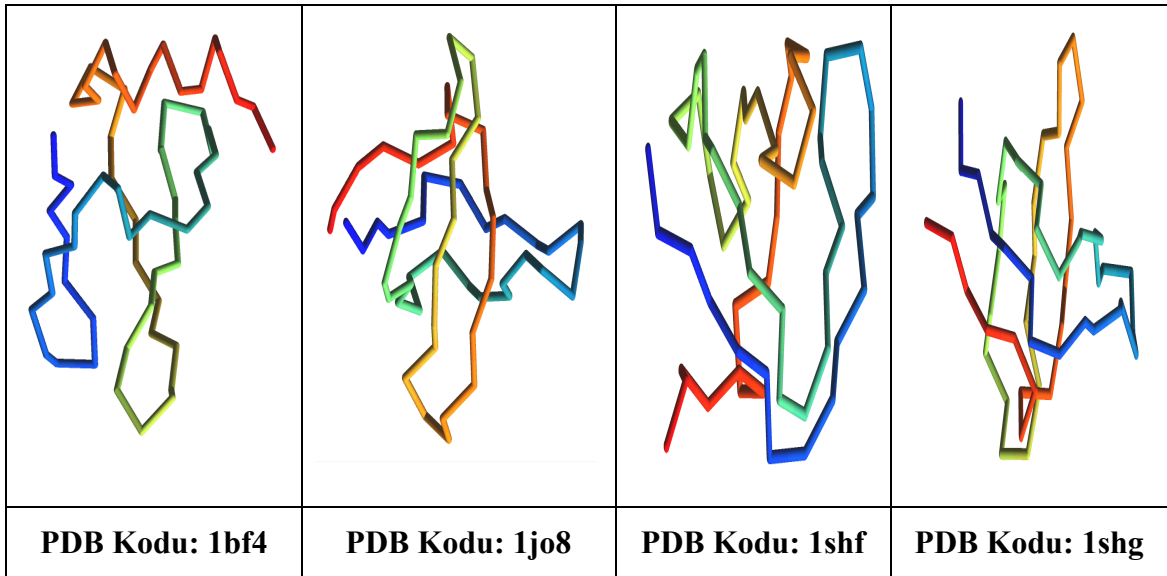
Bu araştırmada yapısal olarak birbirinden farklı üç protein ailesinden, deneysel olarak iki-durum davranışı gösteren 11 tane protein ele alınmıştır. Bu proteinlerden 4 tanesi tamamıyla α - yapılı protein ailesinden, 4 tanesi tamamıyla β - yapılı protein ailesinden, 3 tanesi ise $\alpha + \beta$ - yapılı (karışık yapılı) protein ailesinden seçilmiştir. Bu protein seti oluşturulurken; seçilecek proteinlerin farklı miktarlarda yüklü amino asit içermeleri ve

farklı pozitif ve negatif yüklü amino asit kombinasyonlarına sahip olmasına dikkat edilmiştir.

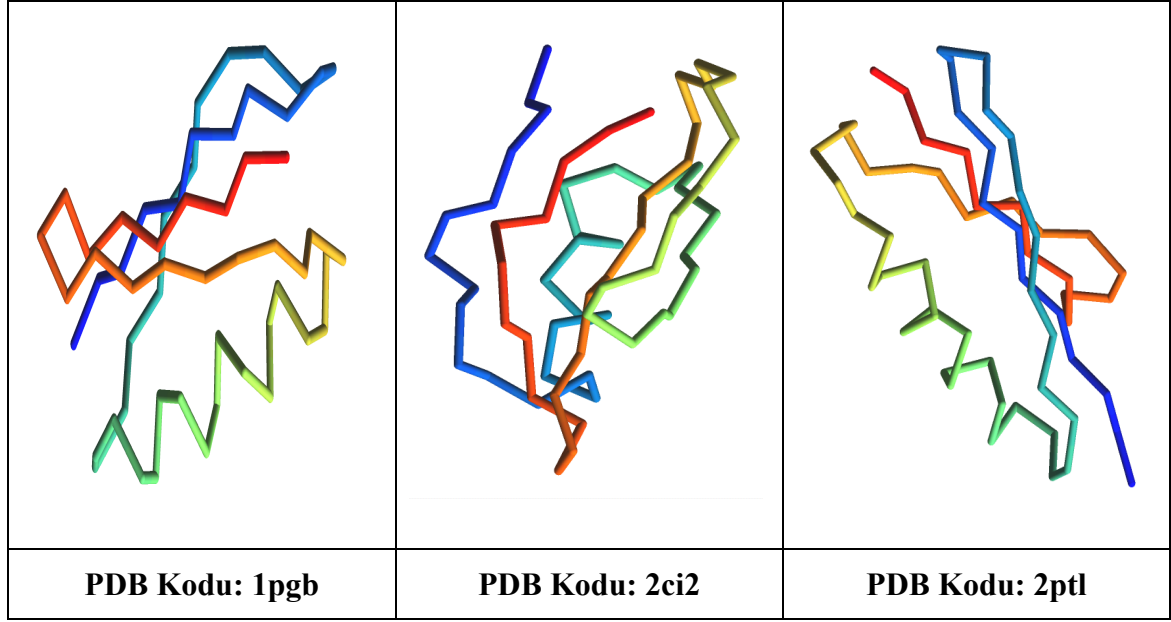
Protein setini oluşturan proteinlerin X-ışını kristalografi deneylerinden elde edilmiş 3-boyutlu katlı yapıları ve Protein Veri Bankası (PDB) kodları Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Tamamıyla α -yapılı protein ailesinden seçilen proteinlerin katlı yapıları ve PDB kodları



Şekil 4.2 Tamamıyla β -yapılı protein ailesinden seçilen proteinlerin katlı yapıları ve PDB kodları



Şekil 4.3 $\alpha + \beta$ - yapılı protein ailesinden seçilen proteinlerin katlı yapıları ve PDB kodları

Bu çalışma da kullandığımız modellerin tamamı Gō-modeli yani protein spesifik oldukları için; katlı yapıda etkileşen amino asitlerin belirlenmesi ve her protein için etkileşim kontak haritalarının oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda proteinlerin katlı yapısında etkileşen amino asitleri belirlemek için mesafe kriteri kullanılmıştır. Bu kritere göre; eğer bir amino asidin ağır atomlarından (yani, hidrojen atomu hariç) en az bir tanesi, diğer amino asidin ağır atomlarından birisi ile 4.5 Angstrom'den daha yakın mesafede bulunuyorsa bu iki amino asidin etkileştiği kabul edilmektedir. Proteinlerin katlı yapısındaki toplam bağımsız kontak sayısı ($N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$); proteinlerin amino asit sayısı (L), tıklılığı ve amino asit içeriğine göre değişebilmektedir. İncelediğimiz proteinlerin katlı yapıları ile ilgili bilgiler aşağıdaki tablolarda (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3) detaylı verilmiştir

Diğer taraftan, katlı yapıdaki yüklü etkileşimleri belirlerken dikkate alınan kriterler şunlardır: (a) protein zinciri üzerinde birbirleri ile $i, i + 3$ mesafesinde bulunan yüklü amino asitler mesafelerine bakılmaksızın etkileştikleri, (b) $j > i + 3$ koşulunu sağlayan yüklü amino asit çiftlerinin ağır atomlarının birbirine 6 Angstrom'den daha yakın olduğu durumda etkileştikleri kabul edilmektedir. Dikkat edilmesi gereken diğer husus: katlı yapıda etkileşmeyen yüklü amino asitlerin birbirleriyle etkileşmesin müsaade ediliyor olmasıdır. Proteinlerde aspartik asit (ASP veya D) ve glutamik asit (GLU veya

E) negatif yüklü iken, arjinin (ARG veya R) ve lizin (LYS veya K) ise bazik yani pozitif yüklü amino asitlerdir. Yüksek pH'da pozitif yüklü davranan histidin (HIS veya H) amino asidi, yüksüz olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'te gösterilen parametreler şöyle tanımlanmaktadır: $L_{yüklü}^+$ ve $L_{yüklü}^-$ sırasıyla proteindeki pozitif ve negatif yüklü amino asit sayıları; $L_{yüklü}^{+,-}$ pozitif ve negatif yüklü amino asit sayılarının toplamı; $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{çekici}}$ farklı yüklere sahip olan ve katlı yapıda etkileşen amino asitler arası toplam çekici etkileşme sayısı; $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{itici}}$ aynı yüklere sahip olan ve katlı yapıda etkileşen amino asitler arası toplam itici etkileşme sayısı; $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$ katlı yapıdaki yüklü itici ve çekici etkileşme sayısı toplamı (yani, $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}} = \tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{çekici}} + \tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{itici}}$); $L_{yüklü}^{+,-}/L$ proteindeki yüklü amino asit yüzdesi; $N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}/L$ proteindeki amino asit başına düşen ortalama kontak sayısıdır.

Tablo 4.1 Tamamıyla α -yapılı protein ailesinden seçilmiş proteinlerin amino asit içerikleri ve katlı yapıdaki bağımsız ve yüklü etkileşme bilgileri

	L	$L_{yüklü}^{+,-}$	$\frac{L_{yüklü}^{+,-}}{L}$	$L_{yüklü}^+$	$L_{yüklü}^-$	$N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$	$\frac{N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}}{L}$	$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$	$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{çekici}}$	$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{itici}}$
1enh	54	19	0.35	13	6	99	1.83	22	11	11
1fex	59	15	0.25	9	6	87	1.47	14	6	8
1ryk	69	29	0.42	14	15	127	1.84	45	24	21
1w4j	51	16	0.31	9	7	69	1.35	17	14	3

Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3 dikkatli incelendiğinde; amino asit başına düşen ortalama bağımsız etkileşme sayısının $N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}/L$ tamamıyla α -yapılı protein ailesi mensupları için çok daha düşük olduğu gözlemlenecektir. Yüklü etkileşmeler protein dinamiğine dahil edildiğinde, katlı yapı enerjisi ($E_{\text{katlı}}$)'ne net katkısı analiz edildiğinde; 1enh ve 1pgb proteinleri katlı yapısında eşit miktarlarda çekici ve itici yüklü etkileşme olduğu için $E_{\text{katlı}}$ değeri değişmezken, 1fex ve 1shf proteinleri katlı yapısında itici etkileşme miktarı daha fazla olduğu için $E_{\text{katlı}}$ değeri artarken, diğer tüm proteinlerde çekici etkileşme miktarı daha fazla olduğu için $E_{\text{katlı}}$ değeri düşmektedir (Bakınız Tablo 4.4).

Tablo 4.2 Tamamıyla β -yapılı protein ailesinden seçilmiş proteinlerin amino asit içerikleri ve katlı yapıdaki bağısız ve yüklü etkileşme bilgileri

	L	$L_{yüklü}^{+,-}$	$\frac{L_{yüklü}^{+,-}}{L}$	$L_{yüklü}^+$	$L_{yüklü}^-$	$N_{\text{katlı kontak}}$	$\frac{N_{\text{katlı kontak}}}{L}$	$\tilde{N}_{\text{katlı kontak}}$	$\tilde{N}_{\text{çekici kontak}}$	$\tilde{N}_{\text{itici kontak}}$
1bf4	63	26	0.41	16	10	136	2.16	32	18	14
1jo8	58	18	0.31	3	15	137	2.36	17	9	8
1shf	59	15	0.25	4	11	129	2.19	11	4	7
1shg	57	19	0.33	10	9	131	2.30	16	11	5

Diğer taraftan katlı yapıdaki etkileşmelerin uzun erişimli olduğu $M^{(1)}$ ve $M^{(2)}$ modellerinden elde edilen geçiş sıcaklıkları (sırasıyla $T_{\text{max}}^{(1)}$ ve $T_{\text{max}}^{(2)}$); kısa erişimli $M^{(3)}$ ve $M^{(4)}$ modellerinin geçiş sıcaklıklarından (sırasıyla $T_{\text{max}}^{(3)}$ ve $T_{\text{max}}^{(4)}$) daha yüksek olarak elde edilmektedir. Bunun sebebi; amino asitlerin birbirini daha uzak mesafelerde hissetmeleri dolayısıyla etkileşmelerin iyice zayıfladığı uzak mesafelere gitmek için daha yüksek kinetik enerjiye (dolayısıyla, sıcaklığa) ihtiyaç duymalarıdır. Bununla birlikte; katlı yapıdaki bağısız etkileşimleri aynı erişim mesafesine sahip model çiftlerindeki (yani, $M^{(1)}$ - $M^{(2)}$ ve $M^{(3)}$ - $M^{(4)}$ model çiftleri) farklılık; yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilip edilmemesidir. İşte, katlı yapıdaki bağısız etkileşmelerin uzun erişimli olduğu $M^{(1)}$ - $M^{(2)}$ model çifti ile kısa erişimli olduğu $M^{(3)}$ - $M^{(4)}$ model çiftinin geçiş sıcaklıklarındaki değişim kıyaslandığında; erişim mesafesi farklılığından kaynaklanan geçiş sıcaklığı değişimi ($T_{\text{max}}^{(1)} - T_{\text{max}}^{(3)}$), yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilip edilmemesinden kaynaklanan geçiş sıcaklığı değişimlerinden ($T_{\text{max}}^{(1)} - T_{\text{max}}^{(2)}$ veya $T_{\text{max}}^{(3)} - T_{\text{max}}^{(4)}$) elde edilen farklılıktan daha yüksektir. 2ci2 proteinini örnek olarak ele alırsak; yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilmediği, sadece erişim mesafeleri farklı $M^{(1)}$ ve $M^{(3)}$ modellerinin geçiş sıcaklıkları $T_{\text{max}}^{(1)}$ ve $T_{\text{max}}^{(3)}$ kıyaslandığında $T_{\text{max}}^{(1)} - T_{\text{max}}^{(3)} = 0.980 - 0.882 = 0.098$ 'lik bir fark elde edilmektedir. Benzer şekilde $T_{\text{max}}^{(1)} - T_{\text{max}}^{(2)} = 0.980 - 0.990 = -0.010$ ve $T_{\text{max}}^{(3)} - T_{\text{max}}^{(4)} = 0.882 - 0.890 = -0.008$ farkları incelendiğinde (Tablo 4.4); yüklü etkileşmelerin geçiş sıcaklık değişimleri katkısının daha minimal olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 4.3 $\alpha + \beta$ -yapılı protein ailesinden seçilmiş proteinlerin amino asit içerikleri ve katlı yapıdaki bağırsız ve yüklü etkileşme bilgileri

	L	$L_{yüklü}^{+,-}$	$\frac{L_{yüklü}^{+,-}}{L}$	$L_{yüklü}^+$	$L_{yüklü}^-$	$N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$	$\frac{N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}}{L}$	$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$	$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{çekici}}$	$\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{itici}}$
1pgb	56	16	0.29	6	10	112	2.00	14	7	7
2ci2	64	21	0.33	10	11	131	2.04	28	17	11
2ptl	62	16	0.26	7	9	120	1.94	12	8	4

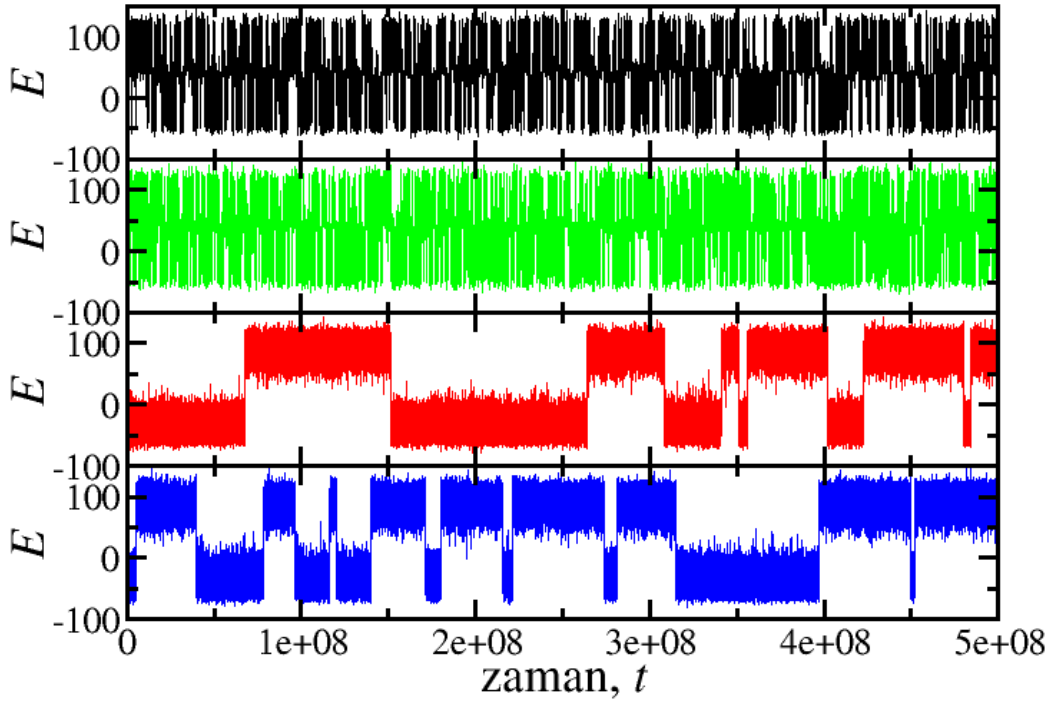
Diğer taraftan, geçiş sıcaklığını etkileyen diğer bir unsur; katlı yapıda amino asit başına düşen ortalama katlı yapı enerjisi $E_{\text{katlı}}/L$ 'dir. İncelediğimiz Gō-modellerinde katlı yapıda etkileşen amino asitlerin bağırsız etkileşim büyüklükleri eşittir (yani, $\varepsilon^{\text{katlı}} = 1$). Dolayısıyla yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilmediği $M^{(1)}$ ve $M^{(3)}$ modellerinde; $E_{\text{katlı}} = -N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}$ 'dir. Fakat yüklü etkileşmeler protein dinamiğine dahil edildiği $M^{(2)}$ ve $M^{(4)}$ modellerinde katlı yapı enerjisi $E_{\text{katlı}} = -N_{\text{kontak}}^{\text{katlı}} + 0.8(\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{itici}} - \tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{çekici}})$ olmaktadır. Tablo 4.4'de görüleceği gibi amino asit başına düşen ortalama katlı yapı enerjisi $E_{\text{katlı}}/L$ artıyorsa geçiş sıcaklığı azalmakta, $E_{\text{katlı}}/L$ azalıyorsa geçiş sıcaklığı artmaktadır.

Protein setindeki proteinlerin içerdikleri yüklü amino asit oranları ile katlı yapıdaki yüklü etkileşim miktarları incelendiğinde yüksek değişkenlik gözlemlenmektedir (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3). Mesela, katlı yapıda yüklü amino asit başına düşen ortalama yüklü etkileşim sayısı $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}}/L_{yüklü}^{+,-}$; 1ryk proteini için 1.55 iken 1shf proteini için 0.73'tür. Ayrıca 1ryk ve 1shf proteinlerindeki yüklü amino asit sayısının $L_{yüklü}^{+,-}$, toplam amino asit sayısı L oranına ($L_{yüklü}^{+,-}/L$) baktığımızda; 1ryk ve 1shf için sırasıyla 0.42 ve 0.25 olarak bulunmaktadır (Tablo 4.1 ve 4.2). Bununla birlikte; proteinlerdeki pozitif ve negatif yüklü amino asit sayıları (sırasıyla $L_{yüklü}^+$ ve $L_{yüklü}^-$) ne kadar farklılık gösterirlerse gösterebilirler; katlı yapıda çekici etkileşmeleri maksimum yapacak şekilde organize olmaya çalışırlar. Örneğin 1jo8 proteininde, pozitif ve negatif yüklü amino asit sayıları çok farklı ($L_{yüklü}^+ = 3$ ve $L_{yüklü}^- = 15$) olmasına rağmen; katlı yapısındaki toplam yüklü etkileşme sayısı $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{katlı}} = 17$ iken çekici yüklü etkileşme sayısı $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{çekici}} = 9$ ve itici etkileşme sayısı $\tilde{N}_{\text{kontak}}^{\text{itici}} = 8$ 'dir (Tablo 4.2).

Tablo 4.4 İncelediğimiz proteinlerin 4 farklı modelden elde edilmiş termodinamik ve kinetik verileri

	Protein	Model	E_{kath}	T_{sim}	T_{max}	κ_S	ΔF_E^\ddagger	ΔF_Q^\ddagger	$\log_{10} k_k^{sim}$
Tamamıyla α -yapılı protein ailesi	1enh	$M^{(1)}$	-99.0	0.983	0.980	0.51	0.27	0.43	-5.28
		$M^{(2)}$	-99.0	0.981	0.980	0.47	0.27	0.50	-5.31
		$M^{(3)}$	-99.0	0.871	0.870	0.98	1.45	2.27	-5.66
		$M^{(4)}$	-99.0	0.861	0.861	0.80	1.19	2.13	-5.61
	1fex	$M^{(1)}$	-87.0	0.827	0.830	0.41	0.02	0.23	-5.16
		$M^{(2)}$	-85.4	0.848	0.850	0.42	0.02	0.18	-5.21
		$M^{(3)}$	-87.0	0.747	0.746	0.54	0.55	1.38	-5.36
		$M^{(4)}$	-85.4	0.766	0.763	0.55	0.63	1.40	-5.39
	1ryk	$M^{(1)}$	-127.0	0.943	0.940	0.46	0.13	0.39	-5.47
		$M^{(2)}$	-129.4	0.989	0.990	0.42	0.02	0.19	-5.99
		$M^{(3)}$	-127.0	0.850	0.850	0.67	0.92	1.42	-5.62
		$M^{(4)}$	-129.4	0.886	0.884	0.52	0.33	0.67	-5.50
1w4j	$M^{(1)}$	-69.0	0.855	0.850	0.45	0.21	0.60	-5.13	
	$M^{(2)}$	-77.8	0.868	0.870	0.43	0.12	0.55	-5.11	
	$M^{(3)}$	-69.0	0.791	0.788	0.59	0.82	2.20	-5.38	
	$M^{(4)}$	-77.8	0.803	0.802	0.54	0.59	2.03	-5.29	
Tamamıyla β -yapılı protein ailesi	1bf4	$M^{(1)}$	-136.0	1.016	1.020	0.46	0.14	0.31	-5.32
		$M^{(2)}$	-139.2	1.035	1.030	0.43	0.04	0.24	-5.29
		$M^{(3)}$	-136.0	0.932	0.928	0.79	0.88	1.92	-5.73
		$M^{(4)}$	-139.2	0.939	0.941	0.49	0.27	1.04	-5.48
	1jo8	$M^{(1)}$	-137.0	1.055	1.050	0.98	1.99	2.39	-5.87
		$M^{(2)}$	-137.8	1.079	1.080	0.94	1.29	1.58	-5.71
		$M^{(3)}$	-137.0	0.961	0.962	1.01	5.07	6.64	-7.22
		$M^{(4)}$	-137.8	0.982	0.979	0.99	3.56	5.02	-6.67
	1shf	$M^{(1)}$	-129.0	1.046	1.050	0.98	1.85	2.30	-5.87
		$M^{(2)}$	-126.6	1.040	1.040	0.99	2.15	2.69	-5.98
		$M^{(3)}$	-129.0	0.945	0.946	1.01	4.80	6.60	-7.21
		$M^{(4)}$	-126.6	0.934	0.936	1.01	5.11	6.84	-7.32
1shg	$M^{(1)}$	-131.0	1.063	1.060	1.00	2.80	3.33	-6.12	
	$M^{(2)}$	-135.8	1.092	1.090	0.99	2.28	2.74	-5.91	
	$M^{(3)}$	-131.0	0.961	0.960	1.01	6.61	8.86	-7.74	
	$M^{(4)}$	-135.8	0.991	0.987	1.01	6.02	7.73	-7.29	
α + β yapılı protein ailesi	1pgb	$M^{(1)}$	-112.0	0.970	0.970	0.60	0.68	1.16	-5.53
		$M^{(2)}$	-112.0	0.968	0.970	0.59	0.71	1.23	-5.48
		$M^{(3)}$	-112.0	0.886	0.882	1.00	3.10	5.18	-6.46
		$M^{(4)}$	-112.0	0.886	0.884	1.00	2.97	5.15	-6.47
	2ci2	$M^{(1)}$	-131.0	0.974	0.980	0.98	2.02	2.42	-5.97
		$M^{(2)}$	-135.8	0.985	0.990	0.99	2.36	2.97	-6.00
		$M^{(3)}$	-131.0	0.881	0.882	1.01	4.60	6.45	-6.86
		$M^{(4)}$	-135.8	0.890	0.890	1.01	5.76	7.18	-7.39
	2ptl	$M^{(1)}$	-120.0	0.940	0.940	0.86	1.14	1.69	-5.68
$M^{(2)}$		-123.2	0.960	0.960	0.72	1.11	1.62	-5.70	
$M^{(3)}$		-120.0	0.856	0.854	1.01	4.09	6.22	-6.94	
$M^{(4)}$		-123.2	0.875	0.872	1.02	3.72	5.75	-6.84	

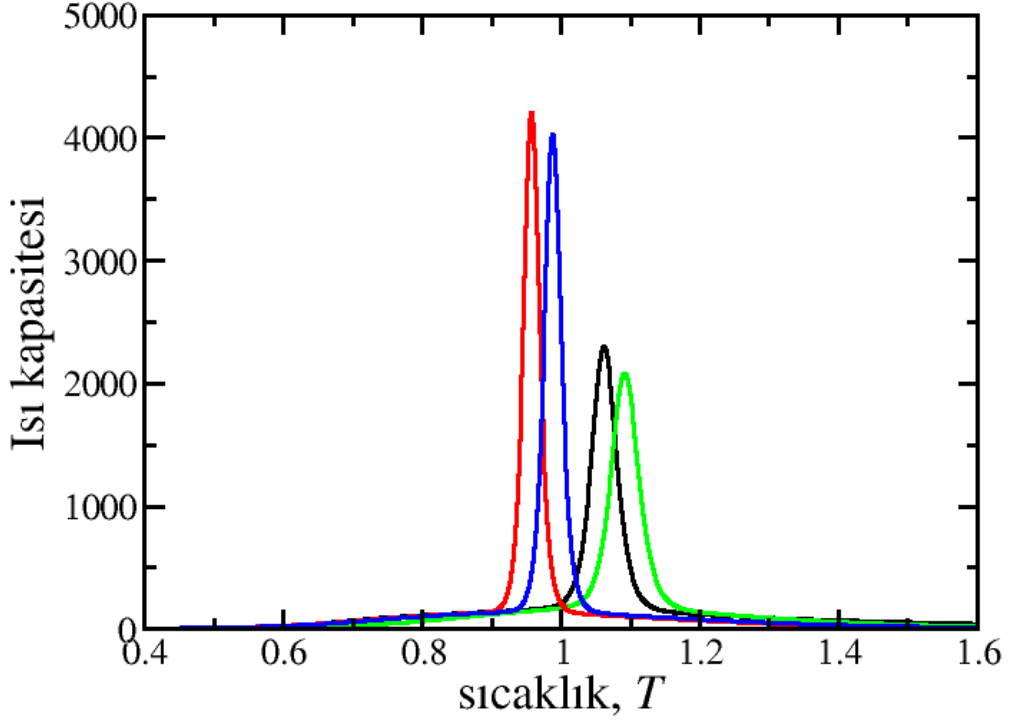
Anlatım kolaylığı olması bakımından; bu bölümde verilecek tüm şekillerde her model için elde edilen sonuç farklı bir renk ile gösterilecek ve bu renk formatı tüm şekillerde korunacaktır. Modeller için yaptığımız renk tanımlaması: $M^{(1)}$ modeli siyah renk, $M^{(2)}$ modeli yeşil renk, $M^{(3)}$ modeli kırmızı renk ve $M^{(4)}$ modeli mavi renk ile gösterilecektir. Tablo 4.4'te aynı model ve renk uygulaması kullanılmıştır.



Şekil 4.4 Model geçiş sıcaklıklarında elde edilmiş 1shg proteini yolakları.

İncelediğimiz proteinlerin termodinamik davranışlarını ortaya çıkarmak için farklı sıcaklıklarda protein yolakları elde edilmiştir. Konformasyon uzayının yeterince iyi örneklenmesini sağlamak için her modelin geçiş sıcaklığı ayrı ayrı bulunmuştur. Geçiş sıcaklığı T_{\max} bulunurken katlı ve açık yapı topluluğu popülasyonlarının eşit olması ve ısı kapasitesi maksimumu şartları kullanılmıştır.

Şekil 4.4'te 1shg proteini için dört farklı modelden elde ettiğimiz yolaklar verilmektedir. 1shg proteini için model geçiş sıcaklıkları $T_{\max}^{(1)} = 1.060$ (siyah), $T_{\max}^{(2)} = 1.090$ (yeşil), $T_{\max}^{(3)} = 0.960$ (kırmızı) ve $T_{\max}^{(4)} = 0.987$ (mavi) olarak bulunmuştur (Tablo 4.4 ve Şekil 4.5).

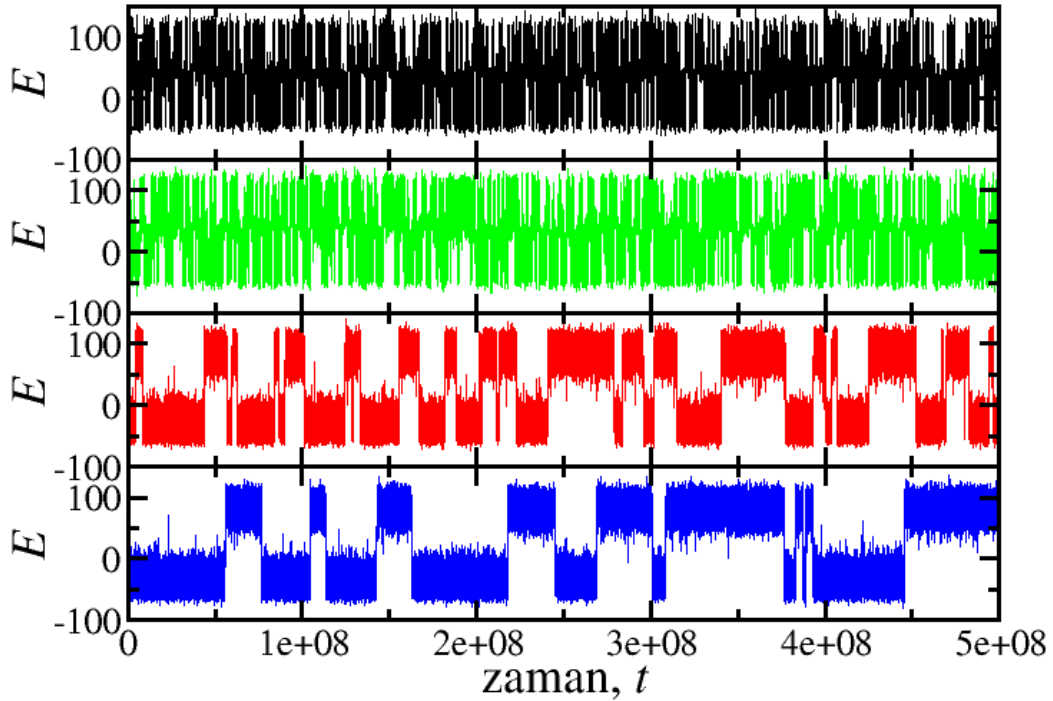


Şekil 4.5 1shg proteini için ısı kapasitesinin sıcaklığa göre değişimi.

Şekil 4.4'te görülebileceği gibi uzun erişimli etkileşimli model yaklaşımlarında ($M^{(1)}$ ve $M^{(2)}$), hem geçiş sıcaklığının yüksek olması hem de amino asitler birbirlerini uzak mesafelerde hissedebildikleri için, katlanma ve açılma geçişleri çok kolay (hızlı) gerçekleşmektedir. Kısa erişimli model yaklaşımlarında ($M^{(3)}$ ve $M^{(4)}$) ise; amino asitlerin birbirini hissetmeye (çekmeye) başlaması için yeterince yakın mesafeye ($r_{ij} \leq r_{ij}^0 + 1.4$) gelmeleri gerektiği için konformasyonel geçişler sırasında geçiş durum konformasyonu olarak adlandırılan konformasyonlara ulaşmak daha uzun süreler alabilmektedir. Aynı zamanda katlanma/açılma yolları sayısı daha da azalmaktadır. Bu nedenle katlanma açılma süreleri artmaktadır.

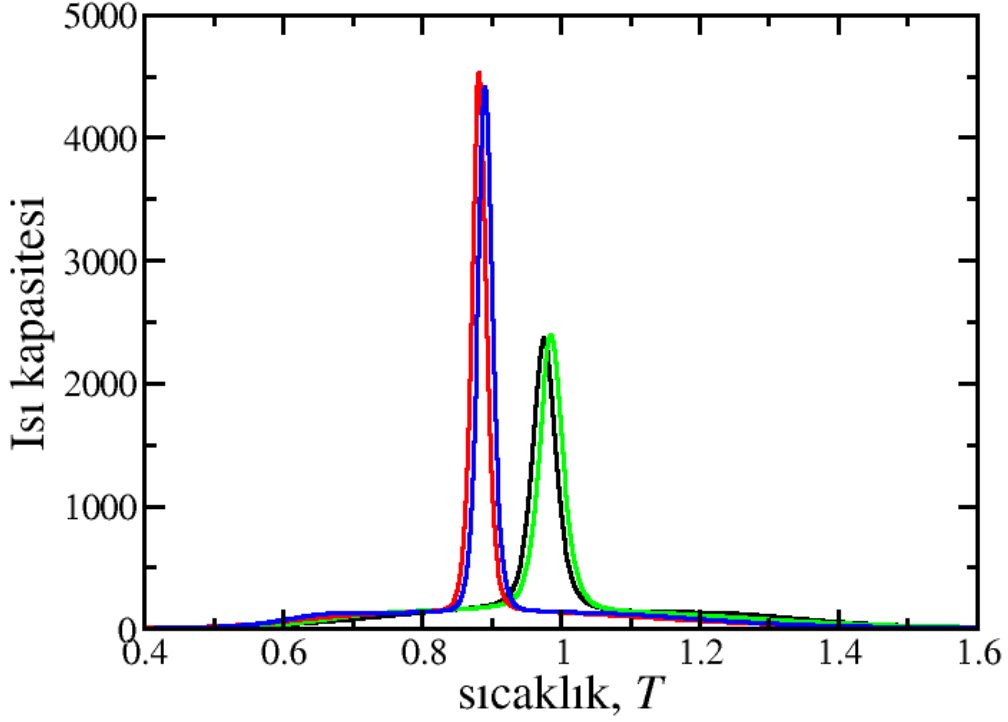
Yüklü etkileşimler dinamiğe dahil edildiğinde; katlı yapıda olmayan yüklü etkileşimler de protein dinamiğine katkı sağladığı için, bu yüklü etkileşimlerin termodinamik kararlılık, kooperativite ve kinetiğe katkısı farklı olabilmektedir. Örneğin 1shg proteini için katlı yapı enerjileri $E_{\text{katlı}}^{(1)} = E_{\text{katlı}}^{(3)} = -131.0 > E_{\text{katlı}}^{(2)} = E_{\text{katlı}}^{(4)} = -135.8$ olarak elde

edilmiştir. Yani, yüklü etkileşimler dinamiğe dahil edildiğinde katlı yapılar daha kararlı (daha düşük enerjili) hale gelmektedir. Fakat serbest enerji bariyer yükseklikleri (Tablo 4.4 ve Şekil 4.8, 4.9) incelendiğinde; 1shg proteini için $\Delta F_E^{\ddagger(1)} = 2.80$, $\Delta F_E^{\ddagger(2)} = 2.28$, $\Delta F_E^{\ddagger(3)} = 6.61$ ve $\Delta F_E^{\ddagger(4)} = 6.02$ olarak gözlemlenmektedir. Diğer bir deyişle; yüklü etkileşimler 1shg proteininde katlanma ve açılma geçişlerini hızlandırmaktadır.



Şekil 4.6 Model geçiş sıcaklıklarında elde edilmiş 2ci2 proteini yolları.

Tüm modeller için katlı yapı enerjileri 1shg proteini ile aynı olan 2ci2 proteinini kıyaslamalı olarak inceleyelim: (i) her iki proteinin tüm modellerinin katlı yapı enerjileri birbirine eşit (yani, $E_{\text{katlı}}^{(1)} = E_{\text{katlı}}^{(3)} = -131.0 > E_{\text{katlı}}^{(2)} = E_{\text{katlı}}^{(4)} = -135.8$); (ii) 2ci2 proteininin amino asit sayısı $L = 64$ olup, 1shg proteininin amino asit sayısından $L = 57$ daha büyüktür. Dolayısıyla, tüm modellerde amino asit başına düşen enerji miktarı ($E_{\text{katlı}}^{(i)}/L$), 2ci2 proteini için daha düşük olacağından elde edilen model geçiş sıcaklıkları daha düşüktür. 2ci2 proteini için elde edilen model geçiş sıcaklıkları; $T_{\text{max}}^{(1)} = 0.980$, $T_{\text{max}}^{(2)} = 0.990$, $T_{\text{max}}^{(3)} = 0.882$ ve $T_{\text{max}}^{(4)} = 0.890$ (Bakınız Tablo 4.4 ve Şekil 4.7)'dir.

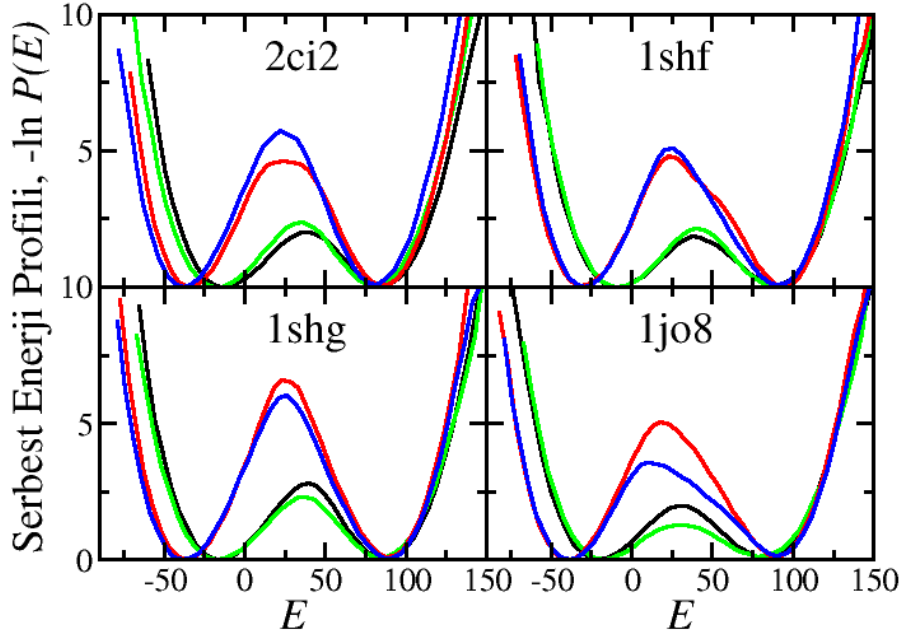


Şekil 4.7 2ci2 proteini için ısı kapasitesinin sıcaklığa göre değişimi.

2ci2 proteininin katlanma yolları (Şekil 4.6) ve serbest enerji profilleri (Şekil 4.8 ve 4.9) analiz edildiğinde; 1shg proteinin aksine yüklü etkileşmelerin serbest enerji bariyerini arttırdığı gözlemlenmektedir. Her model için elde edilen serbest enerji bariyeri yükseklikleri: $\Delta F_E^{\ddagger(1)} = 2.02$, $\Delta F_E^{\ddagger(2)} = 2.36$, $\Delta F_E^{\ddagger(3)} = 4.60$ ve $\Delta F_E^{\ddagger(4)} = 5.76$ 'dir. Yani yüklü etkileşmeler protein dinamiğine eklendiğinde; 1shg proteininin aksine 2ci2 proteinin katlanma hızını yavaşlatmaktadır.

Şekil 4.8'de reaksiyon koordinatı konformasyonel enerji E ile serbest enerji profili değişimi gösterilmektedir. Bu analiz sistemin enerjetik olarak nasıl değiştiği hususunda bilgi vermektedir. Katlı yapıdaki bağımsız etkileşimlerin erişim mesafelerinin değişmesi; açık yapı topluluğu dağılımında önemli bir değişiklik yapmazken, katlı yapı topluluğu ve geçiş durum (bariyer) bölgesi dağılımını etkilemektedir. Detaylı izah etmek gerekirse; katlı yapı topluluğu minimumu ve geçiş durum bölgesi tepesi, uzun erişimli modellerden kısa erişimli modellere geçildiğinde kaymaktadır. Yani, katlı yapı topluluğu minimumu ve geçiş bölgesi tepesi daha düşük enerjili konformasyonlara

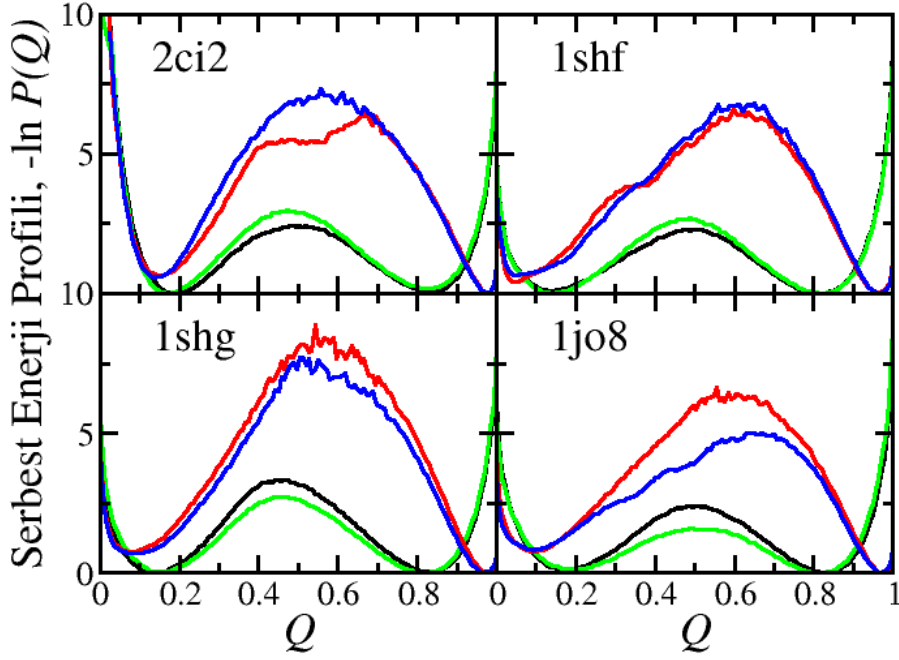
doğru kaymaktadır. Bu kayma; katlı yapı ve açık yapı topluluk minimumlarını daha ayırıştırđı için kısa erişimli modellerin kooperativitesini arttırmaktadır.



Şekil 4.8 Konformasyonel enerji E reaksiyon koordinatı olarak seçildiğinde elde edilen serbest enerji profilleri.

Yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilmesi; katlı ve açık yapı topluluğu dağılımlarını değiştirmese de, geçiş durum bölgesi olarak tanımlanan ve serbest enerji profilinde bariyerin tepe bölgesi civarı olarak tanımlanan bölgede ki dağılımı etkilemektedir. Diğer bir deyişle; serbest enerji bariyeri yüksekliğini değiştirmektedir. Önceki kısımda bahsettiğimiz gibi; yüklü etkileşmelerin bariyer yüksekliğine etkisi proteinden proteine değişmektedir. Mesela Şekil 4.8 ve 4.9'da görülebileceği gibi; 2ci2 ve 1shf proteinlerinde bariyeri yükseltirken, 1shg ve 1jo8 proteinlerinde bariyeri düşürmektedir.

Şekil 4.9'da reaksiyon koordinatı olarak katlı yapıya benzerlik parametresi Q seçildiğinde; reaksiyon koordinatı ve serbest enerji profili değişimi gösterilmektedir. Katlı yapıya benzerlik parametresi Q konformasyonların ne kadar açık veya tıkız olduğu hakkında (yani, yapısal bilgi) verir. Bu analize göre; yüklü etkileşmelerin dinamiğe dahil edilmesi sadece bariyer yüksekliğini etkilemektedir. Reaksiyon koordinatının konformasyonel enerji seçildiği durumla tamamen benzer değişimler gözlemlenmektedir.



Şekil 4.9 Katlı yapıya benzerlik parametresi Q reaksiyon koordinatı olarak seçildiğinde elde edilen serbest enerji profilleri.

Katlı yapıdaki bağımsız etkileşimlerin erişim mesafesi farklı olduğunda yapısal olarak; katlı, açık ve geçiş bölgesi dağılımları değişmektedir. Bu farklılıklar şu şekilde özetlenebilir: (i) uzun erişimli modellerde katlı yapı topluluğu minimumuna karşılık gelen konformasyonlar daha açık yapılı ($Q \cong 0.80$ civarında) iken kısa erişimli modellerde daha tıktır ($Q \cong 0.98$ civarında); (ii) uzun erişimli modellerde açık yapı topluluğu minimumuna karşılık gelen konformasyonlar daha tıktır yapılı ($Q \cong 0.15$ civarında) iken kısa erişimli modellerde daha açıktır ($Q \cong 0.05$ civarında); (iii) uzun erişimli modellerde geçiş bölgesi topluluğu maksimumuna karşılık gelen konformasyonlar daha açık yapılı ($Q \cong 0.5$ civarında) iken kısa erişimli modellerde daha tıktır yapılıdır ($Q \cong 0.6$ civarında). Diğer bir deyişle, uzun erişimli modellerden kısa erişimli modellere giderken yapısal ayrışma artmaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında moleküler dinamik simülasyon yöntemi kullanılarak; üç farklı protein ailesine mensup 11 proteinin 4 farklı model yaklaşımı altında, yüklü etkileşmeleri protein dinamiğine etkileri incelenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar yüklü etkileşmelerin protein dinamiğine katkısının çok farklı olabileceğini göstermiştir. Özellikle yüklü etkileşmelerin geçiş durum bölgesine olan etkileri kritik önem taşımaktadır. Deneysel olarak düşük kararlılıklı ara durum ve geçiş durum konformasyonlarının elde edilmesi günümüz teknolojileri ile neredeyse imkansız olmasından dolayı; ara durum konformasyon analizleri en sıcak araştırma konularından olmuştur.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bilimsel olarak hem olabildiğince özgün hem de ilginçtir. Fakat elde edilen sonuçların katlı yapıdaki yüklü etkileşmelerden mi, yoksa katlı yapıda birbirleriyle etkileşmeyen ama konformasyonel değişimler sırasında birbirleriyle etkileşen yüklü amino asitlerden mi kaynaklandığının detaylı olarak irdelenmesi gerekmektedir.

Bu çalışma yukarıdaki analizler gerçekleştirilerek yakın gelecekte bilimsel araştırma makalesi olarak yayınlanma potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

1. Shaw ED, Maragakis P, Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror OR, Eastwood MP, Bank JA, Jumper JM, Salmon JK, Shan Y and Wrighers W. Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science*. 2010; 330: 341-346.
2. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. *Moleküler Hücre Biyolojisi*. 6. Baskı, Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011: 11-95.
3. Gürdöl F, Ademoğlu E. *Biyokimya*. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Yayınevleri; 2014: 90-96.
4. Yılmaz T, Canlıda Organik Yapı. 1. Baskı. Ankara: İlke Yayınevi; 2007: 329.
5. Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T and Chothia C. SCOP: A Structural Classification of Proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 1995; 247, 536-540.
6. Anfinsen CB. Principles that Govern the folding of protein chains. *Science*. 1973; 181 (4096), 223-230.
7. Zwanzig R, Szabo A and Bagchi B. Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89, 20-22.
8. Dill KA and Chan HS. From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology* 1997; 4, 10-19.
9. Dill KA and MacCallum JL. The protein-folding problem, 50 years on *Science*. 2012; 338: 1042-1046.
10. Schultz CP. Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Biol.* 2000; 7, 7-10.
11. Zarrine-Afsar A, Zhang Z, Schweiker KL, Makhatadze GI, Davidson AR and Chan HS. Kinetic consequences of native state optimization of surface-exposed electrostatic interactions in the Fyn SH3 domain. *Proteins* 2012; 80; 858-870.
12. Kaya H, Chan HS. Solvation Effects and Driving Forces for Protein Thermodynamic and Kinetic Cooperativity: How Adequate is Native-centric Topological Modeling? *Journal of Molecular Biology*. 2003; 326: 911–931.
13. Kaya H, Chan HS. Simple two-state protein folding kinetics requires near-levinthal thermodynamic cooperativity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2003; 52: 510–523.

14. Kaya H and Chan HS. Polymer Principles of Protein Calorimetric Two-State Cooperativity. *Proteins: Structure, Functions and Genetics*. 2000; 40, 637-661.
15. Zhou Y, Hall CK, and Karplus M. The calorimetric criterion for a two-state Process revisited. *Protein Science*. 1999; 8, 1064-1074.
16. Chan HS, Shimizu S, Kaya H. Cooperativity principles in protein folding. *Methods in enzymology*. 2004; 380: 350–379.
17. Jackson SE. How do small single-domain proteins fold? *Folding & Design*. 1998; 3(4), 81-91.
18. Simülasyon yöntemleri, https://prezi.com/q_vrmv90fykv/untitled-prezi/, Erişim Tarihi: 10 Nisan 2015
19. Alder BJ and Wainwright TE. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. *The Journal of Chemical Physics*. 1959; 31, 459.
20. Equipartition theorem, https://en.wikipedia.org/wiki/Equipartition_theorem, Erişim Tarihi: 12 Haziran 2015
21. Ozer O, Koklu H and Resitoglu S. Application of the asymptotic Taylor expansion method to bistable potentials. *Research Article*. 2013; 2.
22. Sholl SD and Steckel JA. Density Functional Theory: A Practical Introduction. *Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi: Pratik Bir Giriş*. Aydın S, Körözlü N, Nobel Akademik Yayıncılık, 2012;193-197.
23. Young P. The leapfrog method and other “symplectic” algorithms for integrating Newton’s laws of motion. *Pyhsics*. 2014; 115/242
24. Gō N. Theoretical Studies of Protein Folding. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1983; 12, 183-210.
25. Plaxco KW, Simons KT and Baker D. Contact Order, Transition State Placement and the Refolding Rates of Single Domain Proteins. *JMB*, 1998; 227, 985-994.
26. Pande V. *Protein Folding: Detailed Models*. Springer. 2005; 320p, Netherlands.
27. Kaya H, Liu ZR and Chan HS. Chevron Behavior and isostable enthalpic barriers in protein folding: Successes and limitations of simple Gō-like modeling. *Biophys. J*. 2005; 89, 520-535.
28. Koga N and Takada S. Roles of native topology and chain-length scaling in protein folding: a simulation study with a Gō-like model. *J. Mol. Biol*. 2001; 313,171-180.

29. Kaya H, Uzunoğlu and Chan HS. Spatial ranges of driving forces are a key determinant of protein folding cooperativity and rate diversity. *Physical Review E*. 2013; 88. doi:10.1103/PhysRevE.88.044701
30. Veitshans T, Klimov D and Thirumalai D. Protein folding kinetics: timescales, pathways and energy landscapes in terms of sequence-dependent properties. 1996; 2, 1-22.

ÖZGEÇMİŞ

Gözde Gezici 1989 yılında Gaziantep’te doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini doğduğu şehirde tamamladı. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik bölümünden mezun oldu. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Biyofizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programını sürdürmektedir.