

**METAL İÇEREN HEKZAHİSTİDİN ZİNCİRLERİNİN MODELLENMESİ
VE METALİN AMİNO ASİT ETKİLEŞİMLERİNDEKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alparslan Numan YILDIZ

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

OCAK 2024

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**METAL İÇEREN HEKZAHİSTİDİN ZİNCİRLERİNİN MODELLENMESİ
VE METALİN AMİNO ASİT ETKİLEŞİMLERİNDEKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Alparslan Numan YILDIZ
(509201201)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mine YURTSEVER

OCAK 2024

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY ★ GRADUATE SCHOOL

**MODELING OF METAL-CONTAINING HEXAHISTIDINE CHAINS AND
EXAMINING THE ROLE OF METAL IN AMINO ACID INTERACTIONS**

M.Sc. THESIS

**Alparslan Numan YILDIZ
(509201201)**

Department of Chemistry

Chemistry Programme

Thesis Advisor: Prof. Dr. Mine YURTSEVER

JANUARY 2024

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509201201 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Alparslan Numan YILDIZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “METAL İÇEREN HEKZAHİSTİDİN ZİNCİRLERİNİN MODELLENMESİ VE METALİN AMİNO ASİT ETKİLEŞİMLERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mine YURTSEVER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. E. Esra KASAPBAŞI**
Haliç Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Berkay SÜTAY
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 5 Ocak 2024
Savunma Tarihi : 31 Ocak 2024



*Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini
esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.*



ÖNSÖZ

Tez çalışma sürecim boyunca bana desteklerini esirgemeyen ve eksik olduğum tüm konularda bana yardımcı olan başta Prof. Dr. Mine YURTSEVER ve Prof. Dr. E. Esra KASAPBAŞI hocalarıma ve tez çalışmam sırasında kenetlenme çalışmalarında bana yardımcı olan Dr. Soykan AĞAR hocama sonsuz teşekkür ederim.

2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs programı kapsamında 2020/2 bursiyeri olarak TUBİTAK BİDEB'e, Haliç Üniversitesi BAP birimine ve çalışmalarım sırasında sunucu desteği sunan İTÜ UHEM birimine yüksek lisans tez çalışmam boyunca verdikleri desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Ocak 2024

Alparslan Numan YILDIZ
(Bilgisayar Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Amino Asitler	1
1.2 Histidin	2
1.2.1 Histidin ve geçiş metalleri.....	3
1.2.2 Histidin ve metal koordinasyonu.....	4
1.2.3 Histidin Oligomerleri ve protein saflaştırmadaki rolleri	5
1.3 Metalli Reçineler ve NTA (Nitrilotriasetik asit) Şelatları	6
1.4 IMAC (Hareketsizleştirilmiş metal iyon afinite kromatografisi) ve Rekombinant Proteinler.....	7
1.5 Literatürdeki Deneyler ve Modeller	8
1.6 Kuantum Mekanik Çalışmaları	9
1.7 Moleküler Kenetlenme Çalışmaları.....	9
1.7.1 Yeniden kenetlenme çalışması	10
1.7.2 1BNA	10
1.7.3 Genetik algoritma.....	11
1.7.4 Lamarckian genetik algoritması	11
1.8 Moleküler Dinamik Çalışmaları.....	12
1.8.1 Kuvvet alanları	13
1.8.2 İstatistiksel topluluklar (Ensembles)	14
1.8.2.1 NVE	14
1.8.2.2 NPT.....	14
1.8.2.3 NVT	15
2. YÖNTEM.....	17
2.1 Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (YFT)	17
2.1.1 Baz fonksiyonları	19
2.1.1.1 Yöntemler	19
2.1.1.2 Metaller için baz setleri	19
2.1.2 YFT çalışmaları.....	20
2.1.2.1 Metalsiz YFT çalışmaları	20
2.1.2.2 Metalli YFT çalışmaları.....	21
2.1.2.3 Amino asitli YFT çalışmaları	22
2.1.2.4 Optimize yapılarda frekans çalışmaları	23

2.1.2.5	Optimize yapıların NBO (Doğal Bağ Orbitali) yüklerinin hesaplanması	23
2.1.2.6	Tekli Nokta (SP) çalışmaları ile ESP (Elektrostatik Potansiyel) yüklerinin hesaplanması.....	23
2.1.2.7	BSSE (Temel Set Süperpozisyon Hatası) hesaplamaları.....	24
2.1.2.8	Rezin – Metal yapılarının optimizasyonu	24
2.1.2.9	Yapılarda çokluk (Multiplicity) hesaplamaları	25
2.2	Moleküler Kenetlenme	26
2.2.1	Hedef makromolekül seçimi ve hazırlanması	26
2.2.2	Ligand molekülünün seçimi ve hazırlanması	26
2.2.3	Yerleştirme çalışmaları.....	27
2.2.3.1	Yerleştirme alanı seçimi (Grid Box).....	27
2.2.3.2	Poz sayısı ve algoritma seçimi	28
2.3	Moleküler Dinamik	28
2.3.1	Moleküler dinamik koşulları	28
2.3.1.1	Protein hazırlık aşaması	28
2.3.1.2	Sistem oluşturma aşaması	29
2.3.1.3	Simülasyonu başlatma	29
3.	HESAPLAMALAR	31
3.1	Yapı Optimizasyonları.....	31
3.1.1	Metal içermeyen yapı optimizasyonları	31
3.1.2	Nikel içeren His-tag yapı optimizasyonları.....	32
3.1.3	Çinko içeren His-tag yapı optimizasyonları.....	33
3.1.4	Bakır içeren His-tag yapı optimizasyonları.....	34
3.1.5	İmidazol halkası – Rezin molekülü optimizasyonu	35
3.1.6	Rezin molekül – Metal optimizasyonu.....	35
3.1.7	His ₆ M ₃ Yapılarının amino asit ile olan optimizasyonları.....	36
3.1.7.1	His ₆ Ni ₃ - AA optimizasyonları	36
3.1.7.2	His ₆ Zn ₃ - AA optimizasyonları	37
3.1.7.3	His ₆ Cu ₃ - AA optimizasyonları.....	38
3.1.8	BSSE (Temel Set Süperpozisyon Hatası) optimizasyonları.....	40
3.1.8.1	His ₆ Ni ₃ için BSSE hesaplamaları.....	41
3.1.8.2	His ₆ Zn ₃ için BSSE hesaplamaları	41
3.1.8.3	His ₆ Cu ₃ için BSSE hesaplamaları.....	41
3.1.9	Çokluk hesapları.....	42
3.1.10	Frekans hesaplamaları.....	43
3.1.11	Metaller için baz seti karşılaştırması.....	43
3.1.12	Metal – Atom mesafeleri	44
3.1.13	NBO, ESP yük ve HOMO – LUMO çalışmaları	45
3.1.13.1	NBO ve ESP yük tespiti çalışmaları	46
3.1.13.2	HOMO – LUMO çalışmaları	47
3.2	Moleküler Kenetlenme Çalışmaları.....	49
3.2.1	Ligand hazırlama	49
3.2.2	Protein hazırlama.....	50
3.2.3	Kenetlenme prosedürü.....	50
3.3	Moleküler Dinamik Çalışmaları	52
3.3.1	Metal içermeyen kompleksin moleküler dinamik çalışması	52
3.3.2	Çinko içeren kompleksin moleküler dinamik çalışması.....	53
3.3.3	Nikel içeren kompleksin moleküler dinamik çalışması	54

3.3.4 Bakır içeren kompleksin moleküler dinamik çalışması	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
5. SONUÇLAR	59
KAYNAKLAR	61
EKLER.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	67





KISALTMALAR

His₆Ni₃	: 6 Histidin 3 Nikel metali içeren yapı
His₆Zn₃	: 6 Histidin 3 Çinko metali içeren yapı
His₆Cu₃	: 6 Histidin 3 Bakır metali içeren yapı
His₆	: 6 Histidin aminoasiti içeren yapı
His₆M₃ – AA	: 6 Histidin 3 metal içeren yapıya bağlı aminoasit
His₆SS	: 6 Histidin içeren aminoasitli yapı
A	: Aspartik Asit
G	: Glutamik Asit
AG	: Aspartik Asit + Glutamik Asit
GA	: Glutamik Asit + Aspartik Asit
NBO	: Doğal Bağ Orbitali (Natural Bond Orbital)
ESP	: Elektrostatik Potansiyel (Electrostatic Potential)
HOMO	: En Yüksek Dolu Moleküler Orbital (High Occupied Molecular Orbital)
LUMO	: En Düşük Boş Moleküler Orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
BSSE	: Temel Set Süperpozisyon Hatası (Basis Set Superposition Error)
Au	: Atomik Birim
YFT	: Yoğunluk Fonksiyonu Teorisi
DFT	: Density Functional Theory
RMSD	: Ortalama Kare Sapma Kökü (Root Mean Square Deviation)
SP	: Tekli Nokta (Single Point)
LDA	: Lityum Diizopropil Amid
HF	: Hartree Fock
MD	: Moleküler Dinamik (Molecular Dynamic)
IMAC	: İmmobilize Metal İyon Kromatografisi (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
IDA	: İminodiasetik asit (Iminodiacetic Acid)
NTA	: Nitrilotriasetik asit (Nitrilotriacetic acid)
Esu	: Elektrostatik yük birimi



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Tabloda metal ve rezin yapısının optimizasyon enerjisi gösterilmektedir.....	36
Tablo 3.2: YFT çalışmaları sonucunda elde edilen Metalsiz - Metalli aminoasit bağlı yapıların optimize enerji değerleri.	39
Tablo 3.3: Denk.1,2 ve 3 kullanılarak hesaplanan YFT çalışmaları metal etkisini, metal varken amino asit etkisini ve amino asit varken metal etkisini gösterir.....	39
Tablo 3.4: YFT hesaplamalarına göre amino asidin histidin oligomerine bağlanma enerjisi.....	40
Tablo 3.5: Tabloda His ₆ M ₃ ve His ₆ M ₃ – AA yapısının BSSE enerjileri gösterilmektedir.....	42
Tablo 3.6: Eşitlik 3.5 ve 3.6’ da verilen eşitliklere göre oluşan ΔH_1 ve ΔH_2 enerjileri.	42
Tablo 3.7: Nikel ve Bakır atomu için farklı çokluk değerleri.	42
Tablo 3.8: Baz seti karşılaştırmaları.....	43
Tablo 3.9: Metalsiz ve 3 farklı metal için metallerin imidazol halkalarında bulunan azot (N) atomlarına olan uzaklık.	45
Tablo 3.10: Metalsiz ve 3 farklı metal için metallerin imidazol halkalarında bulunan azot (N) atomları üzerindeki yük dağılımı.	46
Tablo 3.11: Alıcı(Acceptor) ve verici(Donor) olarak metallerin etkileşim enerjileri (Kcal/mol).....	46
Tablo 3.12: His ₆ M yapısına sahip 3 farklı metal için oksijen atomlarına ait NBO ve ESP Yükleri.	47
Tablo 3.13: 2, 4 ve 6 histidinli yapıların HOMO - LUMO gösterimi.....	47
Tablo 3.14: 4 farklı yapının 1BNA dodokomer yapısına bağlanma enerjileri verilmiştir.	52



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Alfa, Beta ve Gama aminoasit yapıları.	2
Şekil 1.2: HID (Sol), HIE (orta) VE HIP (sağ) yapısı.	2
Şekil 1.3: İki histidin imidazolü arasına koordine olmuş metal iyonu.	4
Şekil 1.4: Altılı histidin etiketi.	5
Şekil 1.5: NTA yapısı.	6
Şekil 1.6: Metal – Rezin gösterimi [38].....	7
Şekil 1.7: 12 baz çiftine sahip dodokomer DNA yapısı.	10
Şekil 1.8: Genetik algoritma akış şeması.....	11
Şekil 2.1: Tekli, ikili ve altılı susuz metalsiz yapılar.....	20
Şekil 2.2: Sol tek histidin, ortadaki ikili histidin ve sağdaki 6'lı histidin optimizasyonları göstermektedir.	21
Şekil 2.3: 2 histidin - 1 metal yaspısının sırasıyla Cu, Ni, Zn optimizasyonları.	22
Şekil 2.4: Glutamik asit (sol üst), aspartik asit (sağ üst) ve glutamik asit-aspartik (alt) asit yapısı.	22
Şekil 2.5: His ₆ M ₃ – AA yapısı için BSSE hesabı parça gösterimi.	24
Şekil 2.6: Rezin – Nikel (sol üst), Rezin – Çinko (sağ üst) ve Rezin – Bakır (alt) yapı optimizasyonları.	25
Şekil 2.7: Çokluk hesabının orbitaller üzerinde gösterimi.	25
Şekil 2.8: His ₆ Cu ₃ (sol üst), His ₆ Ni ₃ (sağ üst) ve His ₆ Zn ₃ (alt) yapı optimizasyonları.	26
Şekil 2.9: Kör (blind) yerleştirme için ızgara kutusu (Grid box) gösterimi.	27
Şekil 2.10: İyon ve çözücü eklenmiş kompleks yapı.....	29
Şekil 3.1: Şekilde gösterilen numaralar a) Monomer b) Dimer c) Trimer d) Tetramer e) Pentamer f) Hekzamer hisitidinlerin metalsiz optimizasyonlarıdır.....	32
Şekil 3.2: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₂ Ni ₁ b) His ₄ Ni ₂ c) His ₆ Ni ₃ yapılarının optimizasyonlarıdır.....	33
Şekil 3.3: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₂ Zn ₁ b) His ₄ Zn ₂ c) His ₆ Zn ₃ yapılarının optimizasyonlarıdır.....	34
Şekil 3.4: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₂ Cu ₁ b) His ₄ Cu ₂ c) His ₆ Cu ₃ yapılarının optimizasyonlarıdır.....	35
Şekil 3.5: Şekilde a) Nikel b) Çinko c) Bakır atomlarının imidazol halkası ve rezin molekülü ile olan optimizasyonu gösterilmektedir.	35
Şekil 3.6: Şekilde a) Nikel b) Çinko c) Bakır atomlarının rezin molekülüne olan yük transferi gösterilmektedir.	36
Şekil 3.7: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₆ Ni ₃ – Aspartik asit b) His ₆ Ni ₃ – Glutamik asit c) His ₆ Ni ₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) d) His ₆ Ni ₃ – (Glutamik asit + Aspartik asit) hisitidinlerin optimizasyonlarıdır.	37

Şekil 3.8: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₆ Zn ₃ – Aspartik asit b) His ₆ Zn ₃ – Glutamik asit c) His ₆ Zn ₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) d) His ₆ Zn ₃ – (Glutamik asit + Aspartik asit) hisitidinlerin optimizasyonlarıdır.....	38
Şekil 3.9: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₆ Cu ₃ – Aspartik asit b) His ₆ Cu ₃ – Glutamik asit c) His ₆ Cu ₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) d) His ₆ Cu ₃ – (Glutamik asit + Aspartik asit) hisitidinlerin optimizasyonlarıdır.....	38
Şekil 3.10: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₆ Ni ₃ b) His ₆ Ni ₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) yapılarının BSSE optimizasyonlarıdır.....	41
Şekil 3.11: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₆ Zn ₃ b) His ₆ Zn ₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) yapılarının BSSE optimizasyonlarıdır.....	41
Şekil 3.12: Şekilde gösterilen numaralar a) His ₆ Cu ₃ b) His ₆ Cu ₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) yapılarının BSSE optimizasyonlarıdır.....	41
Şekil 3.13: Gaussian 6.0 [14] programı frekans hesabı program çıktısı.....	43
Şekil 3.14: Hekza histidin yapısında bulunan atom mesafeleri ve numaralandırmaları.....	44
Şekil 3.15: Tablo 3.9 kullanılarak oluşturulan 3 farklı metal için olan mesafe grafiği.....	44
Şekil 3.16: Metal – Rezin sisteminin model yapısı, a) yan görünüm b) üstten görünümü.....	45
Şekil 3.17: Temsili kenetlenme yapısı.....	50
Şekil 3.18: Metal bulundurmeyen His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.....	50
Şekil 3.19: Bakır metali içeren His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.....	51
Şekil 3.20: Çinko metali içeren His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.....	51
Şekil 3.21: Nikel metali içeren His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.....	52
Şekil 3.22: Herhangi bir metalokompleks içermeyen Oligo-Histidin, ana oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanır, birden fazla Adenin nükleotidini bölge seçici olarak seçer.....	53
Şekil 3.23: Çinko metalokompleksli Oligo-Histidin, küçük oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanıyor ve bölge seçici olarak Guanin nükleotidini seçer.....	53
Şekil 3.24: Nikel metalokompleksli Oligo-Histidin, küçük oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanır ve bölge seçici olarak Guanin nükleotidini seçer.....	54
Şekil 3.25: Bakır metalokompleksli Oligo-Histidin, küçük oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanır ve bölgesel seçici olarak birden fazla Guanin nükleotidini seçer.....	54

METAL İÇEREN HEKZAHİSTİDİN ZİNCİRLERİNİN MODELLENMESİ VE METALİN AMİNO ASİT ETKİLEŞİMLERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

ÖZET

Histidin oligomerleri, protein ve DNA saflaştırma adımlarında kullanılan çok yaygın bir etiketleme yöntemidir. Bu amaçla kullanılan histidin oligomerleri literatürde His-tag olarak adlandırılmaktadır. Çoklu histidin etiketleri veya misina doğada bulunan bir oligomer olduğu için deneysel moleküler biyoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Histidin etiketleri, insan vücudunda kolayca bulunan bakır (Cu^{+2}), çinko (Zn^{+2}), nikel (Ni^{+2}) ve kobalt (Co^{+2}) gibi iki değerlikte metal iyonlarını koordine ederek protein veya DNA bağlama kapasitelerini artırabilir. Metalin neden bağlanmayı arttırdığı, kompleks yapılarının metale göre nasıl ve neden değiştiği, metal tipinin bağlanma verimini arttırmada neden önemli olduğu vb. hala açık değildir. Bazı soruları cevaplamaya çalışan birkaç teorik çalışma olmasına rağmen, ayrıntılı mekanik problemler hala çözüme ulaşamamıştır. Bu çalışmada, YFT yöntemleri kullanılarak, bağlanma enerjisini kantitatif olarak açıklamak için histidin etiketleri taşıyan metalin kimyasal yapısı gerçekçi bir şekilde modellenmiştir. Modeller, imidazol halkalarının nitrojen atomları aracılığıyla Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarına koordineli hekza histidin oligomerlerinden oluşturulmuştur. Modeller daha sonra N-terminalleri yoluyla amino asit dimerlerine (proteini temsil eden en küçük birimler) bağlanmıştır. Tüm model yapıları öncelikle B3LYP/6-31G(d,p) seviyesinde oksijen atomları tarafından metal katyonlarının eksik değerliklerinin tamamlanması ile optimize edilmiştir. Metal atomları için Stevens ve grubu tarafından geliştirilen yöntem olan gen anahtar kelimesi ile 6-31G(d,p) seviyesinde baz seti kullanılmıştır. Tüm hesaplamalar, IEFPCM çözücü modeli kullanılarak örtülü su ortamında gerçekleştirilmiştir. Yapılan kuantum mekanik çalışmalarda hangi geçiş metalinin histidin etiketi yapısında daha kararlı bir yapı oluşumuna katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuç literatürdeki sonuçlarla yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu çalışmaların ardından ise optimize edilen histidin etiketleri kullanılarak protein – ligand yerleştirme (docking) çalışması yapılmıştır. Bu yerleştirme çalışmalarında insan DNA'sına en çok benzeyen 1BNA doküomer yapısı olan 12 dizilik bir yapı hedef makromolekül olarak kullanılmıştır. Kenetlenme sonucunda optimize edilen histidin etiket yapımızın DNA'ya daha çok küçük oluktan bağlandığı ve daha çok guanin bazı ile etkileşime girdiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçları desteklemek adına bir simülasyon gerçekleştirilmiştir. Bu simülasyonda ise protein ve ligandımızın gerçek bir çözücü ortamında nasıl davrandığı simüle edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kuantum mekanik ve protein yerleştirme sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.



MODELING OF METAL-CONTAINING HEXAHISTIDES CHAINS AND INVESTIGATION OF METAL'S ROLE IN AMINO ACID INTERACTIONS

SUMMARY

Amino acids (aa) are called substances containing amino and acid groups. Proteins are formed by combining basic units of amino acids. Therefore, during amino acid deficiency, errors occur in protein synthesis and diseases occur due to protein deficiency. In this regard, amino acids also play an important role in gene expression. Amino acids are used to assist in the translation of messenger RNAs called mRNAs. The amino acid histidine, which means tissue in Greek, is an amino acid that was first isolated from protamine by Albrecht Kossel in 1896. Histidine, a basic amino acid, has an imidazole ring in its structure and its pK value is 6.0. The amino acid histidine can exist in both neutral form and protonated form. There are three different histidine structures depending on the presence of hydrogen on the nitrogen atoms in the imidazole ring. The HID structure is the presence of hydrogen at the delta nitrogen atom in the imidazole ring. The HIE structure is the presence of hydrogen at the epsilon nitrogen atom found in imidazole. The HIP structure is the presence of a hydrogen atom in both nitrogen atoms. As time progressed and research increased, efforts were made to understand the role of metals in our lives. It has begun to be used in medicine and pharmaceutical treatments, especially thanks to many fields and technologies that allow the use of metal cations as central components. For this reason, metals will be used widely in the future with these aspects. Metals have such positive aspects as well as negative aspects. Storage problems arise with metals that are used very frequently. Since a regular storage area cannot be created for metals, their leakage into running water poses a danger. With this leakage, the amount of metal found in plants and animals increases. This increase indirectly affects humans as well, as humans need both animals and plants to survive. Metal ions that pass into humans in this way can enter the bloodstream and potentially cause cell damage, neurological diseases, oncogenesis and other diseases. In addition to these effects, once metals enter the bloodstream, they can bind to amino acids in proteins in the blood, thanks to the amine and carboxyl ends they have, as well as the reactive potential of their R groups. This binding may lead to the inhibition of ongoing cellular processes, the increase of free radicals due to the increase in redox reactions, or structural deterioration. Metal atoms can coordinate with the oxygen atoms of the water molecules around them in order to complete the six-way coordination. Or coordination around the metal atom can be achieved with resins, one of the newly developed methods. Although resins are a commercially developed product, they have different combinations. With these combinations, metal binding affinities were tried to be increased.

Quadruple coordination occurs between the oxygen atoms in its structure and the metal. The remaining two coordinations occur with the nitrogen atoms in the histidine molecule. NTA chelates are a common method used in chromatography. Histidine oligomers are a very common labeling method used in protein and DNA purification steps. Histidine oligomers used for this purpose are called His-tags in the literature. Multiple histidine tags, or fishhooks, are frequently used in experimental molecular biology studies because they are a naturally occurring oligomer. IMAC chromatography method is an important method used in the protein purification stage. The working principle of this chromatographic method and the main event that provides adsorption is the coordination between immobilized metal ions and a donor. IMAC method is divided into two: normal and reverse. In the normal method, metal ions are chelated on a support. The protein given for purification binds to metal ions. In the reverse IMAC method, the metal ion immobilized on the protein surface is bonded to the donor group attached to the support via a coordination bond. The reverse IMAC method is generally limited to metalloproteins. In addition, this method is not only used in the purification process. Enzyme reactors can be created by adsorbing enzymes to metal chelate supports. Recombinant proteins are protein sequences cloned into an expression vector that support gene expression and can be encoded by recombinant DNA. Histidine tags consist of six histidine amino acids. After these histidine residues are transferred to a vector by genetic engineering methods, a recombinant protein is obtained. This recombinant protein is subjected to the IMAC method and purified with the help of chelators and transition metals. Histidine tags can be purified under natural or denaturing conditions. Histidine tags can enhance protein or DNA binding capacities by coordinating divalent metal ions such as copper (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), nickel (Ni^{2+}), and cobalt (Co^{2+}), which are readily found in the human body. Why metal increases bonding, how and why complex structures change depending on the metal, why metal type is important in increasing bonding efficiency, etc. It still hasn't been explained. Although there are many theoretical studies trying to answer some questions, detailed mechanical problems are still unsolved. In this study, using DFT methods, the chemical structure of the metal bearing histidine tags was modeled realistically to describe the binding energy quantitatively. Quantum mechanics is a branch that describes the behavior of atoms, electrons, or particles at the molecular level. Software developed for structure optimization is used in quantum chemistry studies. The basic principle of these software is to read input and perform optimization operations according to these inputs. We carried out our quantum mechanics studies with the Gaussian 6.0 application, one of the most used applications. There are two different issues that are important in these studies: The first is the choice of method appropriate to the structure. The other is to choose the base depending on the structure situation. Appropriate methods and basis sets for the models were selected and the models were created. The models were constructed from hexa histidine oligomers coordinated to metal ions Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , and Co^{2+} through the nitrogen atoms of the imidazole rings. The models were then linked to amino acid dimers (the smallest units representing the protein) via their N-termini. All model structures were first optimized by filling in the missing values of metal cations with oxygen atoms at the B3LYP/6-31G(d,p) level. For metal atoms, a basis set consisting of 6-31G(d,p) levels was used with the gen keyword, the method developed by Stevens and his group. All calculations were performed using the IEFPCM solver model in implicit water environment. Quantum mechanics studies have concluded which transition metal in the histidine tag structure contributes to the formation of a

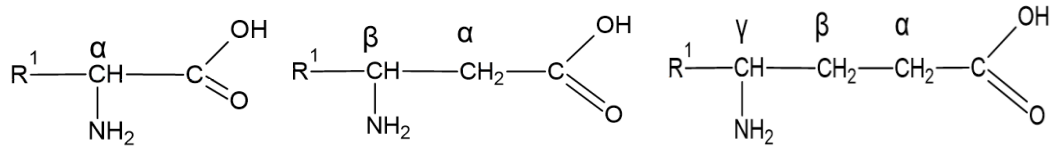
more stable structure. This result we obtained is very similar to the results in the literature. Following these studies, protein – ligand docking studies were carried out using optimized histidine tags. In these docking studies, a 12-sequence structure with a 1BNA dodecomere structure, which is most similar to human DNA, was used as the target macromolecule. The synthetic DNA dodecomere structure is little more than a full turn of the dextral double-stranded B form. The two ends of the spiral are interlocked at 19° angles. In this structure, small grooves overlap. At the center of the molecule where distortion is least, the structure has an average rotation of 36.9° per step, or 9.8 base pairs per rotation. The dihedral angle between the A and T base pairs at the center of the molecule is 17.3° , and the angle between the G and C bases at the two ends is 11.5° . While purine groups have high delta values, pyrimidine sugars have low delta values in the structure. All poses obtained as a result of docking were examined and the best poses were examined. As a result of this study, it was observed that our optimized histidine tag structure binds more to DNA in the minor groove and interacts more with the guanine base. The coupling distance to guanine bases is similar in length for three different metals. A simulation was performed to support these results. All conditions in the simulation were chosen the same for 3 different metals. In this simulation, how our protein and ligand behave in a real solvent environment is simulated. The simulation time was set to 50 ns. The results obtained are similar to our quantum mechanical and protein docking results.



1. GİRİŞ

1.1 Amino Asitler

Amino asitler (aa), amino ve asit gruplarını içeren maddeler olarak adlandırılır. Proteinler temel birimleri olan amino asitlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Bu nedenle amino asit eksikliği sırasında protein sentezinde hata oluşur ve protein eksikliği nedeniyle hastalıklar meydana gelmektedir. Bu yönüyle amino asitler gen anlatımında da önemli rol almaktadır. mRNA olarak adlandırılan haberci RNA'ların çevirime yardımcı olmak üzere amino asitler kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra bazı amino asitler insan vücudunda sentezlenmemektedir ve dışarıdan alınmaktadır. Bu tür amino asitlere esansiyel amino asitler denmektedir. Bazıları ise vücutta sentezlenmektedir bu aminoasitlere ise esansiyel olmayan aminoasitler adı verilmektedir. Bazıları ise vücutta sentezlenmesine rağmen yetersiz kalmaktadırlar ve diyet ile alınmalıdırlar. Bu tür amino asitlere ise yarı esansiyel amino asitler denmektedir. Amino asitler birçok hastalıkta da önemli rol almaktadırlar. Enzim oluşumunda rol alan amino asitlerin eksikliğinde hastalıkların meydana geldiği düşünülmektedir. Örnek olarak kanser hastalarındaki amino asit seviyesi araştırıldığında bu seviyenin sağlıklı bireylerdeki seviyeden farklı olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bir hastalık olan karaciğer sirozunda ise plazma dallı zincirli amino asit düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir [1]. Tüm amino asitler asimetrik bir karbona sahiptirler ve optik olarak aktiftirler. Fakat Glisin bu kaideyi bozmaktadır. Asimetrik bir yapı sergilememektedir. Aynı zamanda amino asitlerin L veya D izomerleri vardır ve bu yapılar gliseraldehitlere referansla tanımlanır. Amino asitlerin yapısında birincil amino grubu ve alfa karbon atomuna bağlı bulunan bir karboksil grubuna sahiptir. Fakat bu yapı prolin için geçerli değildir. Birincil amino grubu prolin amino asitinde bulunmamaktadır [2]. Alfa amino asitlerinin yanı sıra beta amino asitleri de bulunmaktadır. Bu amino asitlerin alfa amino asitlerinden farkı amino grubunun beta karbona bağlı olmasından kaynaklı bir durumdur. Aynı durum gama amino asitleri için de geçerlidir. Amino grubu gama karbona bağlı bulunmaktadır (Şekil 1.1).

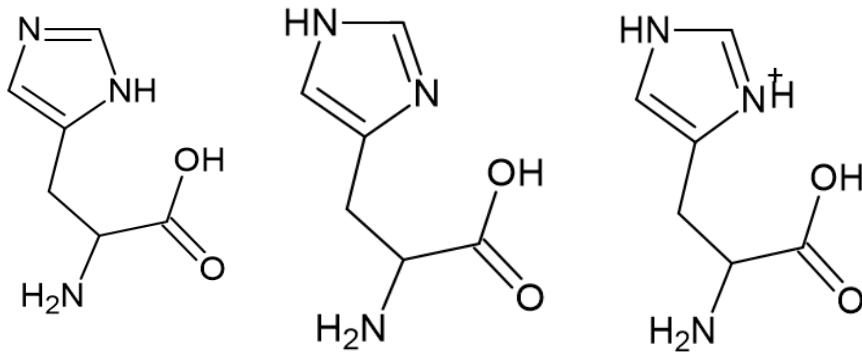


Şekil 1.1: Alfa, Beta ve Gama aminoasit yapıları.

Amino asitlerin yan zincirlerinde farklı varyasyonlara sahip olmaları nedeniyle birçok farklı biyokimyasal özelliklere ve bu özelliklere bağlı işlevlere sahip olabilirler.

1.2 Histidin

Yunanca anlamı doku olan histidin amino asiti Albrecht Kossel tarafından ilk olarak 1896 yılında protamininden izole edilen bir amino asittir. Bazik bir amino asit olan histidin yapısında bir imidazol halkasına sahiptir ve pK sı 6.0 dır. Histidin amino asiti hem nötr formda hem de protonlanmış halde bulunabilir. İmidazol halkasında bulunan nitrojen atomları üzerinde hidrojen bulunma durumuna göre 3 farklı histidin yapısı bulunmaktadır. HID yapısı imidazol halkasında bulunan delta nitrojen atomunda hidrojen bulunması durumudur. HIE yapısı imidazol bulunan epsilon nitrojen atomunda hidrojen bulunması durumudur. HIP yapısı ise her iki nitrojen atomunun üzerinde hidrojen atomunun bulunması durumudur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: HID (Sol), HIE (orta) VE HIP (sağ) yapısı.

Histidin, yapısında imidazol halkası bulunması nedeniyle pi-pi bağları, hidrojen bağları, koordinat bağları ve katyon-pi bağları oluşturma yeteneğine sahip önemli bir amino asittir [1,3]. Oligomerleri, protein saflaştırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [4-7]. Histidin aynı zamanda biyomoleküllerin yapısında sıklıkla

bulunur ve bu yapılarda birçok işleve sahiptir. Histidine zengin peptidleri virüs benzeri partiküllere, lipozomlara veya proteinlere rekombinant olarak verilebilir.

1.2.1 Histidin ve geçiş metalleri

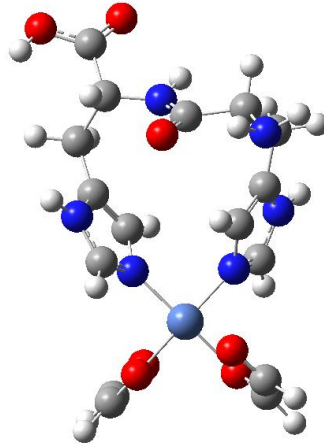
Zaman ilerledikçe ve araştırmalar arttıkça metallerin yaşamımızdaki rolü anlaşılmaya çalışılmıştır. Özellikle metal katyonlarının merkezi bir bileşen olarak kullanılmasına imkân tanıyan birçok alan ve teknoloji sayesinde tıpta ve farmasötik tedavilere kadar kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle gelecekte metaller bu yönleri ile çok kullanılacaktır. Böyle pozitif yanlarının bulunmasının yanı sıra metallerin negatif yanları da bulunmaktadır. Çok sık kullanılmaya başlayan metaller için depolama sorunu oluşmaktadır. Metaller için düzenli depolama alanı oluşturulamaması nedeniyle akan sulara sızma durumu tehlike arz etmektedir. Bu sızma ile bitkilerde ve hayvanlarda bulunan metal miktarı artmaktadır. İnsanlar ise hayatlarının devamı için hem hayvanlara hem de bitkilere ihtiyaç duyması sebebiyle dolaylı olarak bu artış insanları da etkilemektedir. Bu yol ile insanlara geçen metal iyonları kan dolaşımına karışabilir ve hücre hasarlarına, nörolojik hastalıklara, onkogeneze ve başka hastalıklara potansiyel olarak yol açabilir. Bu etkilerinin yanı sıra metaller kan dolaşımına girdikten sonra kanda bulunan proteinlere sahip oldukları amin ve karboksil uçlarının yanı sıra sahip oldukları R gruplarının reaktif potansiyelleri sayesinde amino asitlere bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma ile devam eden hücresel süreçlerin engellenmesine, redoks tepkimelerinin artması ile serbest radikallerin artmasına veya yapısal olarak bozulmalara neden olabilmektedir [6].

Biyomoleküllerde sıklıkla bulunan histidin amino asiti fizyolojik süreçlerde sıklıkla yer almaktadır. Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Co^{+2} gibi geçiş metalleri biyolojik ortamlarda sıklıkla bulunmaktadır. Histidin amino asitinin sulu ortamda geçiş metallerine olan ilgisi araştırma konusu olmuştur. Çalışılan bu konularda histidin, yapısında bulunan imidazol halkasındaki azot atomlarıyla geçiş metalleri arasında koordinasyon bağı yapmakta ve oktoomer yapıya sahip olan geçiş metallerinin kalan diğer 4 koordinasyonları ise etraflarındaki su molekülleri ile yapılmaktadır. Koordinasyonu tamamlayan geçiş metallerinde elektron geçişleri olmaktadır. Bu elektron geçişlerinin ligandan proteine olup olmadığı kuantum mekanik çalışmalar ile belirlenebilmektedir. Bahsedilen bu koordinasyon en çok bakır (Cu^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) metalleri ile gerçekleştirilmektedir. Gerçekleşen bu koordinasyon biyomoleküller için oldukça kritik bir olaydır. Örnek olarak karboksilat-histidin-çinko yapısı

metalo proteinlerin işlevinde oldukça önemli bir role sahiptir. Diğer bir örnek ise bakır metalini bağlayan riboflavin bağlayıcı protein diyaliz durumunda iyi bir tip II bölgesi oluşturabilir. İnsanlarda çinko takviyesi olarak kullanılan çinko sülfat yerine çinko histidin yapısının vücutta daha iyi emildiği tespit edilmiştir. Çalışmalardan birinde ise çinko-histidin yapısının insan kanında olduğu tespit edilmiştir ve Menkes hastalığının tedavisinde kullanılmıştır. Bahsedilen bu hastalıkların tedavisinin yanı sıra histidin-metal komplekslerinin çok daha farklı şekilde işlev gördüğü düşünülmektedir. Bunlar protein katlanmasının önlenmesi, yapı stabilizasyonu gibi birçok konuda çözüm olacağı düşünülmektedir. Histidinin hidrofilik yapısı elde edilen bu koordinasyon ile modifiye edilecek ve bahsedilen bu sorunların çözümüne olanak sağlayacaktır [1,5].

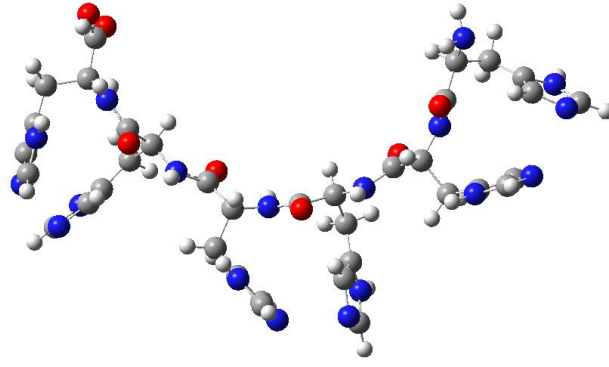
1.2.2 Histidin ve metal koordinasyonu

Histidin etiketlerinin temel kullanım amacı protein saflaştırması ve saflaştırılan maddenin en saf halde olması olduğu için Ni, Zn, Cu, Co gibi geçiş metalleri saflaştırma aşamasında kullanılmaya başlanmıştır. Bu metaller genellikle +2 oksidasyon durumlarında koordinasyonu gerçekleştirirler (Şekil 1.3) [1,4,6,7].



Şekil 1.3: İki histidin imidazolü arasına koordine olmuş metal iyonu.

Metal iyonları iki histidin imidazol arasında koordine edilir ve koordinasyonlarını bazı model çalışmalarında [6,8] su molekülleri veya deneylerde reçinenin oksijenleri ile tamamlar [4,8]. Protein dizisine eklenen histidin oligomerleri, his-tag adı verilen altı histidin kalıntısından oluşur. Daha kısa veya daha uzun histidin uzunluğu, bağlanma afinitesini olumsuz etkiler [1,3] (Şekil 1.4). Metal iyonları, histidin etiketlerinin proteinlere bağlanma davranışında rol oynar [1,3]. Her metalin bağlanma afinitesi, bağlanma kapasitesi, seçicilik vb. ile ilgili kendi avantajları ve dezavantajları vardır [2,9].



Şekil 1.4: Altılı histidin etiketi.

1.2.3 Histidin Oligomerleri ve protein saflaştırmadaki rolleri

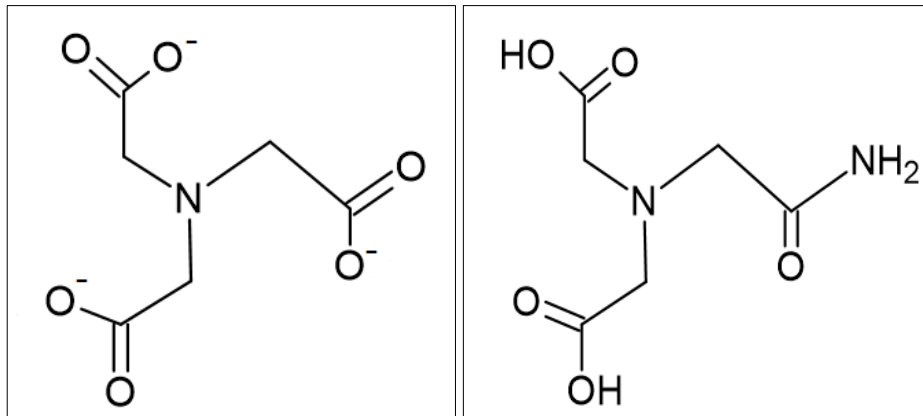
Bu çalışma, hekza histidin oligomerindeki ardışık iki monomerde bulunan imidazol halkası arasına metal katyonlarının koordinasyonunun modellenmesi ve histidin ile metal arasındaki koordinasyon anlaşılması üzerine birtakım çalışmalar içermektedir. Divalent metal katyonları, 2 imidazol halkasının nitrojen atomlarına koordine edilir ve koordinasyonun geri kalanı, adsorbattaki oksijen atomları tarafından tamamlanır. Metallerin dahil edilmesi histidin etiketlerinin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirdiğinden, metalin koordinasyon mekanizmasının ve histidin etiketlerinin proteinleri bağlama kabiliyetinin niteliksel olarak anlaşılması çok zordur. Bu nedenle 6 histidin içeren bir hekza histidin yapısı oluşturulmuştur ve Zn, Cu, Ni ve Co gibi geçiş metalleri 6 histidin yapısındaki iki imidazol arasına yerleştirilmiştir ve koordinasyonu rezin molekülleri ile tamamlanmıştır. Bu yapı kuantum mekanik çalışmalar ile en kararlı hale getirilmiştir ve metal etkinliğinin anlaşılması adına bir dizi çalışmaya tabi tutulmuştur.

Elde ettiğimiz optimize yapıların bir protein veya bir DNA saflaştırma aşamasında nasıl bağlandığını anlayabilmek için protein yerleştirme (docking) çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada insan DNA'sına en çok benzeyen 12 bazlık dodokomer 1BNA yapısı hedef protein olarak kullanılmıştır. Yerleştirme çalışmamız kör (blind) yerleştirme olarak yapılmıştır, yani hedef DNA'mızın tüm yapısı çalışma alanı içerisine alınmıştır.

Yerleştirme çalışmalarımızın sonuçlarının doğruluğu için bir simülasyon yapılması gerekmektedir. Bu simülasyon protein ve ligandın gerçek bir çözücü ortamında nasıl davrandığını bize göstermektedir. Simülasyon uygulamasıyla birlikte tüm elde ettiğimiz sonuçlarımız karşılaştırılmıştır.

1.3 Metalli Reçineler ve NTA (Nitrilotriasetik asit) Şelatları

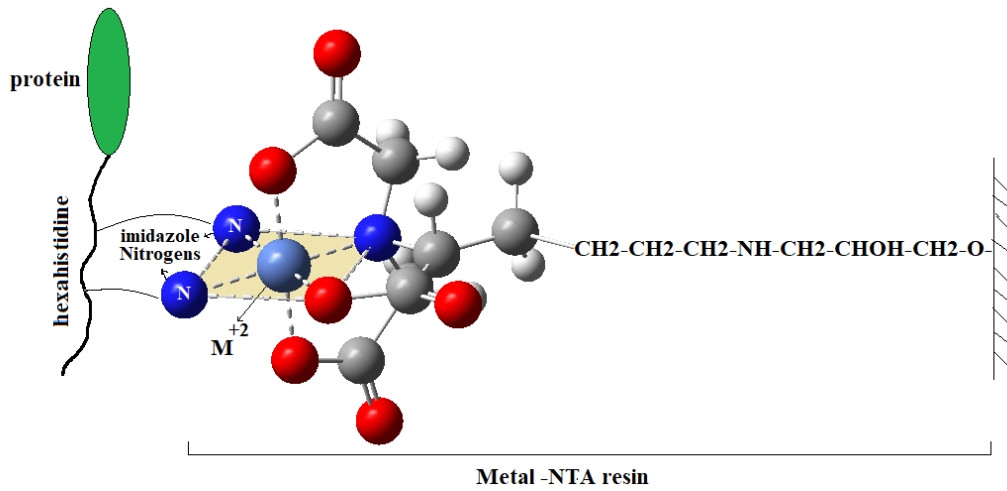
Metal atomları 6'lı koordinasyonu tamamlayabilmek için etrafında bulunan su moleküllerinin oksijen atomları ile koordinasyon yapabilmektedirler. Veya yeni geliştirilen yöntemlerden olan reçineler ile metal atomu etrafında koordinasyon yapılabilir. Reçineler ticari olarak geliştirilen bir ürün olmakla birlikte farklı kombinasyonları bulunmaktadır. Yapılan bu kombinasyonlarla metal bağlama afiniteleri artırılmaya çalışılmıştır. Yapısında bulunan oksijen atomları ile metal arasında 4'lü koordinasyon gerçekleşmektedir. Geriye kalan iki koordinasyon ise histidin molekülünde bulunan azot atomları ile gerçekleşmektedir. NTA şelatları kromatografide kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bahsedildiği üzere NTA şelatları metal koordinasyonunda eksik kalan koordinasyonu tamamlayarak protein saflaştırma aşamasında yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Ve bu şelatlayıcı ajanlar renksizlerdir. NTA şelatlarının (Şekil 1.5) temel görevi reçine oluşturabilmek ve bu oluşturulan reçine ile metal iyonlarıyla koordinasyon oluşturmak ve tek adımda saflaştırma işlemini gerçekleştirebilmektir. Ayrıca diğer bir görevi bu koordinasyon ile metal iyonlarını hareketsiz hale getirmektedir [9]. Farklı şelatlayıcılar bulunabilmektedir. Bunlardan bir diğeri ise IDA (iminodiasetik asit) şelatlayıcısıdır. IDA ve NTA arasındaki farklılık bulundurdıkları şeatlama bölgelerinin sayısından kaynaklanmaktadır. IDA 3 adet şeatlama bölgesi içerirken NTA 4 adet şeatlama bölgesi içermektedir. İki şeatlayıcı arasındaki bu fark metal bağlama afinitesinde farklılığa yol açar ve iyon sızıntısını azaltabilir veya artırabilir, bu şeatlama bölgesi arasındaki farkla doğru orantılıdır [10].



Şekil 1.5: NTA yapısı.

1.4 IMAC (Hareketsizleştirilmiş metal iyon afinite kromatografisi) ve Rekombinant Proteinler

IMAC kromatografi yöntemi protein saflaştırma aşamasında kullanılan önemli bir yöntemdir. Porath ve arkadaşları tarafından immobilize katyon yönteminin protein saflaştırma aşamalarında çok kullanışlı bir yöntem olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur [11]. Bu kromatografik yöntemin çalışma prensibi ve adsorpsiyonu sağlayan temel olay hareketsiz hale getirilen metal iyonları ile bir donör arasında koordinasyonun sağlanmasıdır. IMAC yöntemi normal ve tersine olarak ikiye ayrılmaktadır. Normal olan yöntemde metal iyonları bir destek üzerine şelatlanır. Saflaştırma için verilen protein metal iyonlarına bağlanır. Ters IMAC yönteminde ise protein yüzeyinde hareketsizleştirilmiş metal iyonu desteğe bağlanmış donör gruba koordinasyon bağı ile bağlanmaktadır. Ters IMAC yöntemi genel olarak metaloproteinlerle sınırlanmıştır. Bunların yanı sıra bu yöntem sadece saflaştırma işleminde kullanılmamaktadır. Enzimler metal şelat desteklerine adsorbe edilerek enzim reaktörleri oluşturulabilir [12].



Şekil 1.6: Metal – Rezin gösterimi [38].

Rekombinant protein bir ekspresyon vektörüne klonlanmış ve gen ekspresyonunu destekleyen ve rekombinant DNA tarafından kodlanabilen protein dizileridir. Histidin etiketleri altı histidin amino asitinden oluşmaktadır. Bu histidin kalıntıları bir vektöre genetik mühendisliği yöntemleri ile aktarıldıktan sonra bir rekombinant protein elde edilmiş olmaktadır. Bu rekombinant protein IMAC yöntemine tabi tutularak şelatlayıcılar ve geçiş metalleri yardımıyla saflaştırılmaktadır. Histidin etiketleri doğal koşullarda veya denatüre edici koşullar altında saflaştırılabilir. Ama genel olarak

histidin etiketlerinin metal-şelat desteğine (Şekil 1.6) bağlanması denatüre koşullar altında daha iyi gerçekleşmektedir. Bunun nedeni ise histidin etiketi tamamen açığa çıkar ve etiketlenmemiş rekombinant olmayan protein saflaştırılma olasılığı daha da düşmüş olacaktır [10].

1.5 Literatürdeki Deneyler ve Modeller

Histidin ve metal koordinasyonunun güçlendirilmesi için yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların temel amacı saflaştırılan maddenin daha saf elde edilmesine yöneliktir.

Yapılan bir çalışmada histidinin kuantum mekanik çalışmalara su moleküllerine olan ilgisinin geçiş metalleri ile artıp artmayacağına bakılmıştır. Çalışma sonucunda geçiş metallerinden olan Zn^{+2} (çinko) metali ile histidin molekülü arasında sıkı katyon – pi etkileşimlerinin olduğu anlaşılmıştır ve bu da diğer geçiş metali olan Cu^{+2} göre histidinin su ile olan bağlanma afinitesini artıracak olduğu düşünülmektedir. Bu artışın sıkı olan katyon – pi etkileşimlerinden kaynaklanan imidazol halkası üzerindeki elektron dağılımının değişmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir [5].

Yapılan başka bir çalışmada ise geçiş metallerinin biyolojik süreçte oynadığı rolü anlaşılmaya çalışılmıştır. Çünkü metal iyonlarının biyolojik süreçte oynadığı rolü anlayabilmek birçok hastalığın önlenmesine katkıda bulunacaktır. Metallerin insan vücuduna alınma mekanizmasının öğrenilmesiyle Alzheimer ve bazı kanser türlerinin engellenmesinde önemli rol oynayabilir. Bu çalışmada tekli ve ikili histidin aminoasitler ile metal iyonlarının kompleks oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. Bu çalışma 3 farklı metal atomu üzerinden ilerlemektedir. Bunlar; Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} metalleridir. Yoğunluk fonksiyonu teorisi yöntemi ile tekli ve ikili metal kompleksleri optimize edilmiştir ve elde edilen sonuçlarda her iki kompleksinde kendiliğinden oluştuğu sonucuna varılmıştır [6].

Yapılan başka bir çalışmada ise histidin amino asitinin bağlanma bölgeleri araştırılmıştır. Metal iyonu olarak Cu^{+2} metali tercih edilmiştir. Hekza histidinin en kararlı yapı olduğu düşünülen bu çalışmada farklı imidazol halkaları arasına koordinasyonu yapılan metal iyonunun, hangi halkalar arasında daha kararlı olduğu MD (Moleküler Dinamik) ve YFT çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Etkili bağlanmanın pH 9 civarında olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın en önemli bulgularından birisi

ise metal iyonunun bazı bağlanma pozisyonlarında alfa sarmal yapı indüklediğinin tespit edilmesidir [3].

1.6 Kuantum Mekanik Çalışmaları

Kuantum mekaniği atomların, elektronların veya moleküler düzeydeki parçacıkların davranışlarını tanımlayan bir daldır. Kuantum kimya çalışmalarında yapı optimizasyonu için geliştirilen yazılımlar kullanılmaktadır. Bu yazılımlar temel prensibi girdi okuma ve bu girdilere göre optimizasyon işlemlerini yapmaktır. En çok kullanılan uygulamalardan biri olan Gaussian 16 [14] ve GaussView 6.0 [13] uygulaması ile kuantum mekanik çalışmalarımızı gerçekleştirdik. Bu çalışmalarda önemli olan iki farklı husus vardır: İlki yapıya uygun yöntem seçimidir. Diğerisi ise yapı durumuna bağlı olarak baz seçiminde bulunmaktır.

1.7 Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Moleküler kenetlenme çalışmaları moleküller arasındaki etkileşimi simüle eden ve kullanılan reseptör ve ligandlar arasındaki bağlanma pozisyonlarını ve bu bağlanmaların afinitelerini gösteren yapısal tabanlı bir ilaç tasarım yöntemidir [15]. Son yıllarda özellikle son 30 yılda moleküler biyolojide oluşan ihtiyaçlar ve yapı bazlı ilaç keşfi çalışmalarında oluşan ihtiyaç nedeniyle ortaya çıkan bir alandır. Gelişen bilgisayar yöntemleri ve donanımları ile molekül veri tabanlarına erişimi kolaylaştırmıştır. Bilgisayar alanındaki bu gelişim moleküler kenetlenme yazılımlarının işlerini kolaylaştırmıştır. Bu yazılımların amacı reseptör ve ligand arasındaki yapısal olarak ve enerji olarak bağlanma afinitesini tahmin edebilmektedir. Moleküler kenetlenme çalışmaları genel olarak reseptör olarak adlandırılan küçük bir hedef molekül ile ligand olarak adlandırılan küçük bir molekül arasında gerçekleşmektedir. Bu kenetlenme genel olarak protein-ligand kenetlenmesi olarak adlandırılır. Artan çalışmalarla protein-protein kenetlenmesine ilginin artmasına neden olmuştur [16]. Bununla birlikte reseptör molekülün ve ligand molekülünün sabit veya esnek olduğu birçok uygulama yapılabilmektedir. Örnek olarak sabit reseptör sabit ligand uygulaması, esnek reseptör sabit ligand uygulaması ve esnek reseptör esnek ligand uygulamalarıdır. Yapıdaki esneklik arttıkça molekülün sahip olduğu açılarda değişebilmektedir. Bu değişimler ile molekül doğada bulunduğu halini yerleştirme sonucu alması daha yüksek olasılıklıdır. Bu da esneklik arttıkça yerleştirme doğruluk

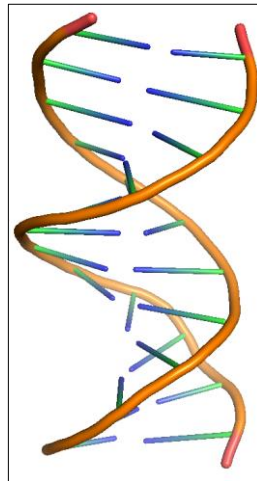
oranının arttığını göstermektedir. Fakat bu esnekliğin getirdiği negatif bir yön vardır. Yapıdaki esneklik arttıkça yerleştirme için kullanılan bilgisayar donanımları daha uzun süreler çalışacaktır. Yani daha fazla sistem gereksinimine ihtiyaç duyulmaktadır [17].

1.7.1 Yeniden kenetlenme çalışması

İlgilenilen protein kompleksinin veri tabanlarından kristal yapısının elde edilmesi ile ve bu yapıda bulunan ligandın ayrılması ve ayrılan ligandın makromolekülün apo-formuna yeniden yerleştirilmesi çalışmasına yeniden kenetleme çalışması adı verilmektedir. Kenetlenmenin başarısı ise RMSD (Kök Ortalama Kare Sapması) değeri ile ölçülmektedir. Eğer bu değer 2 Å (angstrom) altında ise kenetlenme genel olarak başarılı gerçekleşmiştir denilebilir. Bunun gibi birçok başarı ölçütü de bulunmaktadır [16].

1.7.2 1BNA

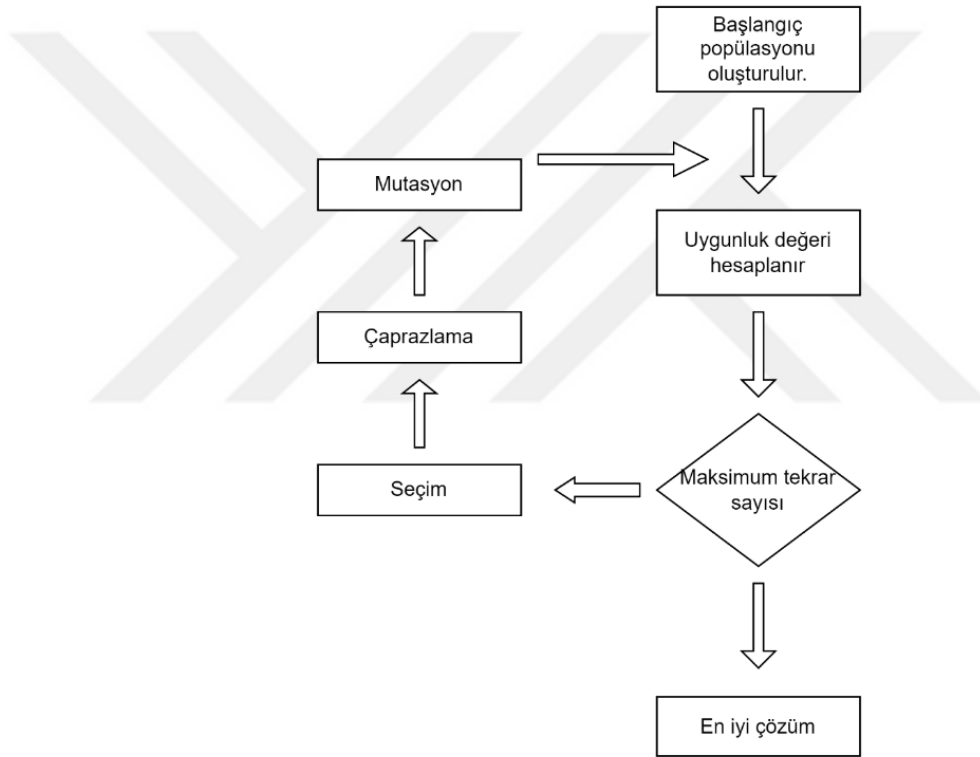
Sentetik DNA dodokomer yapısı sağa dönümlü çift sarmallı B formunun bir tam tur dönüşünden biraz daha fazlasıdır. Sarmalın iki ucu birbirine 19 derecelik açılar ile kenetlenmektedir. Bu yapıda küçük oluklar üst üste gelmektedir. Bozulmanın en az olduğu molekül merkezinde yapı adım başına 36,9 derece veya dönüş başına 9,8 baz çifti ortalama dönüşe sahiptir. Molekül merkezinde A ve T baz çiftleri arasındaki dihedral açı 17.3^0 , iki uçta bulunan G ve C bazları arasındaki açı ise 11.5^0 . Pürin grupları yüksek delta değerlerine sahip iken pirimidin şekerleri yapıda düşük delta değerlerine sahiptir (Şekil 1.7) [18].



Şekil 1.7: 12 baz çiftine sahip dodokomer DNA yapısı.

1.7.3 Genetik algoritma

Genetik algoritma popülasyon tabanlı stokastik bir algoritmadır. Bu nedenle doğruluğu tartışılabilir. Fakat bu algoritmayı güvenilir kılan en önemli özelliği her nesilde en iyi çözümleri bulma ve bu çözümlerle diğerlerini iyileştirmesidir (Şekil 1.8). Bunun sayesinde tüm popülasyon nesilden nesile iyileşmiş olur. Genetik algoritmanın temel mantığı seçim, çaprazlama ve mutasyon işlemleridir. Bu algoritma Darwin evrim teorisinden esinlenerek elde edilmiştir. Bu algorithma her çözüm bir popülasyona, her parametre ise bir gene karşılık gelmektedir. Algoritma popülasyondaki uygunluk durumunu kontrol etmektedir. Kötü olan çözümleri sonuçları iyileştirmek için rastgele bir seçim yöntemiyle iyi çözümler seçilir [19].



Şekil 1.8: Genetik algoritma akış şeması.

1.7.4 Lamarckian genetik algoritması

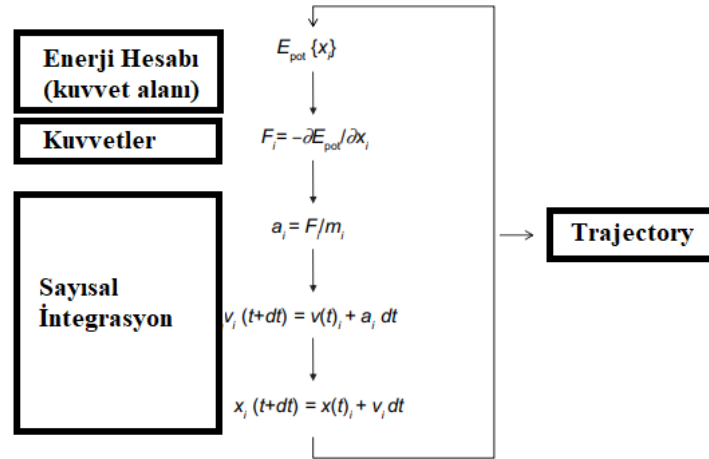
Lamarckian genetik algoritmasının mantığında öğrenerek kazanılan özelliklerin nesillere aktarılması vardır. Bu yaklaşım genetik yapının yerel aramanın sonucunu yansıttığını gösterir. Bu yaklaşımda bireyin genetik yapısı değiştirilir ve popülasyona tekrar yerleştirilir. Dolayısıyla bu teori biyolojide kullanılamayacağı için genel evrimselleşme konularına ışık tutması açısından bilgisayarlarda simüle edilerek kullanılabilir. Bu yaklaşım ile genetik algoritmaların arama aşaması hızlandırılabilir.

Fakat bireylerin genetik yapısını değiştirdiği için genetik algoritmaların daha iyi keşfetmesini olumsuz etkileyebilir. Bu yaklaşımda fenotipten genotipe doğru gidilir. Bu ise ters haritalama olarak adlandırılır. Ters haritalama yöntemi basit uygulamalarda etkili olabilir fakat gerçek hayat problemlerini çözmede yetersiz kalabilir. Bu istekleri karşılamak için ise hibrit genetik algoritmalar kullanılmaktadır [20].

1.8 Moleküler Dinamik alışmaları

Moleküler dinamik simülasyonları 70’li yılların sonlarına doğru gelişmiştir. İlk olarak birkaç yüz atomun simülasyonu yapılabiliyordu. Daha sonra bu yöntemin gelişimiyle birlikte çözücülü ortamda membrana bağlı proteinler, nükleozomlar ve ribozomların simülasyonları yapılmaya başlanmıştır. Yeterli gteki bilgisayarlar kullanılarak 50.000 ile 100.000 atoma sahip yapıların simülasyonları gerçekleştirilebilmektedir. Bu başarının en büyük nedeni yüksek performanslı bilgi işlem sistemlerinin gelişmesi ve simülasyonda kullanılan moleküler dinamik algoritmalarının (şekil 1.9) basitliğinden kaynaklanmaktadır. Moleküler dinamik simülasyonları 40 yılın üzerinde kullanımı devam etmektedir. Günümüzde yapılan simülasyonlar mikro saniyelerde yapıldığı için konformasyonel değişiklikler ve protein-ligand etkileşimleri etkili bir şekilde simüle edilebilmektedir. Bilgisayar ekran kartları (GPU) gelişimiyle birlikte simülasyonlar ekran kartları üzerinde gerçekleştirilmektedir.

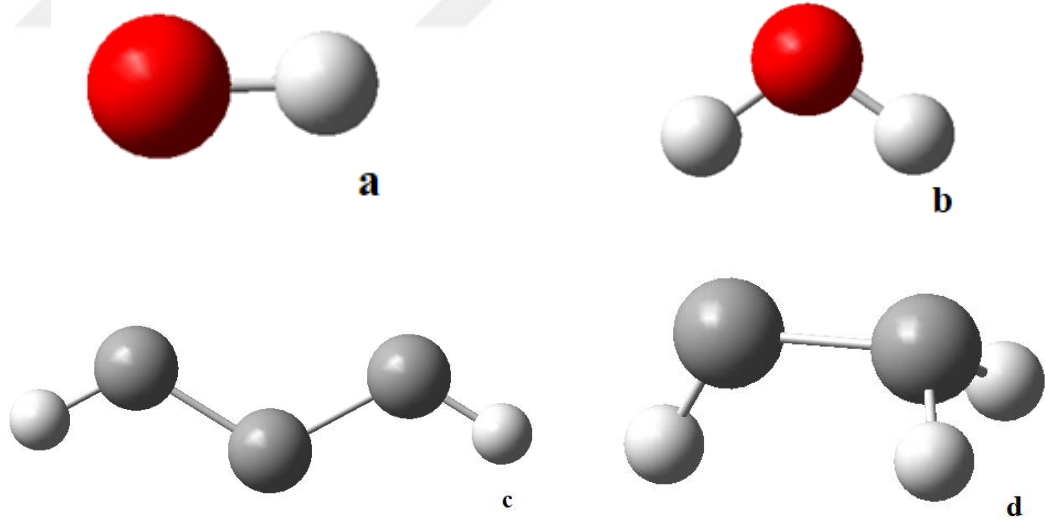
Moleküler dinamik çalışmalarda dikkat edilmesi gereken birçok nokta vardır. Bu noktalar simüle edilecek olan yapıya göre değişiklik göstermektedir. Yapıya uygun koşullar belirlendikten sonra simülasyon başlatılmalıdır. Bu simülasyonların yapılabildiği birçok bilgisayar yazılımı bulunmaktadır. Bu yazılımlar: GROMACS, NAMD, AMBER, CHARMM, Desmond ve OpenMM’dir [21]. AMBER ve CHARMM yazılımları aynı zamanda bir kuvvet alanı isimleridir. Bu yazılım isimleri kuvvet alanlarının isimleri ile karıştırılmamalıdır. Çünkü bir simülasyon yazılımı birden fazla kuvvet alanına sahip olabilmektedir. Fakat çeşitli donanımlarla ve desteklenen özelliklerle ne kadar verimli çalıştıkları farklılık gösterebilmektedir [22].



Şekil 1.9: Moleküler dinamik algoritması [21].

1.8.1 Kuvvet alanları

Moleküler dinamik simülasyonlarında bir molekül bağlarla birbirlerine bağlanmış bir dizi yüklü atom olarak tanımlanır. Bu oluşan moleküller arasında bağ uzunluğu, bağ açısı, dihedral açılar ve bağlı olmayan Van der Waals ve elektrostatik (Şekil 1.10) etkileşimlerin zaman içindeki değişimini göstermek için kuvvet alanları kullanılır [23].



Şekil 1.10: a) Bağ uzunluğu b) Bağ açısı c) Torsion açısı d) Improper açı gösterimi.

İlk kuvvet alanları 1960'lı yıllarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu kuvvet alanları moleküler mekanik yöntemlerin zamanla gelişmesiyle ortaya çıkmıştır. Temel amaçları izole moleküllerin yapılarını, titreşim spektrumlarını ve entalpi değerlerini tahmin edebilmektir. En başta küçük organik moleküller üzerinde çalışılmıştır ve Allinger grubu tarafından MM2, MM3, MM4 kuvvet alanları geliştirilmiştir. Küçük

moleküllerden daha kompleks moleküllere geçiş yapabilmek için farklı kuvvet alanları geliştirilmiştir. Bunlar CHARMM, AMBER, GROMOS, OPLS ve COMPASS kuvvet alanlarıdır. Bu kuvvet alanları oldukça geniş çapta kullanılmaktadır. Bu kuvvet alanları geliştiriciler tarafından sürekli geliştirilmektedir ve farklı versiyonları bulunmaktadır (CHARMM19, CHARMM22, CHARMM27; GROMOS96, GROMOS45A3, GROMOS53A5, GROMOS53A6; AMBER91, AMBER94, AMBER96, AMBER99, AMBER02). 1990'lı yılların başlarında polarize edilebilir kuvvet alanları geliştirilmeye başlanmıştır. DRF90 ve AMOEBA verilebilecek iyi bir örnektir. Daha sonralarında AMBER, OPLS ve GROMOS kuvvet alanları da geliştirilmiştir ve polarize edilebilir versiyonları çıkarılmıştır [24].

Su modelleri için birçok model geliştirilmiştir. Bu kuvvet alanları TIP3P, TIP4P, TIP5P, SPC ve SPC/E, TIP4P/2005'dir [25].

1.8.2 İstatistiksel topluluklar (Ensembles)

Simülasyonda kullanılan birçok farklı topluluk vardır. Bu topluluklar işlevlerine göre farklılık göstermektedir.

1.8.2.1 NVE

Mikrokanonik olarak bilinen bir topluluktur. Sabit partikül sayısı, sabit hacim ve sabit enerjiye sahiptir. N, sabit partikül sayısını, V, sabit hacmi, E, sabit enerjiyi temsil etmektedir. Herhangi bir sıcaklık veya basınç kontrolü olmadan Newton denklemi çözülerek elde edilir. Bu toplulukta enerji her zaman korunur. Fakat dengeleme için bu tür simülasyonlar önerilmemektedir. Çünkü enerji sabittir bu nedenle istenilen sıcaklığa ulaşamamaktır [26].

1.8.2.2 NPT

İzotermal-izobarik topluluk olarak bilinir. N, sabit partikül sayısını, P, basınç, T, sıcaklığı temsil etmektedir. Sabit partikül sayısı ve sabit basınca sahiptir. Bu toplulukta hacim ayarlanarak basınç kontrolü yapılır. Bu simülasyonlar genel olarak doğru basınç, hacim ve yoğunlukların önemli olduğu durumlarda tercih edilmektedir [26].

1.8.2.3 NVT

Kanonikal topluluk olarak bilinir. Bu toplulukta sabit sıcaklık ve sabit basınç vardır. N , sabit partikül sayısını, V , hacim, T , sıcaklığı temsil etmektedir. Hacim simülasyon boyunca sabit tutulmaktadır [26].





2. YÖNTEM

Tez çalışması sırasında birçok yöntem denenmiştir. Bu yöntemler arasında kuantum mekanik, moleküler kenetleme ve moleküler dinamik çalışmaları vardır. Çalışmalarda histidin molekülü ve geçiş metalleri için en uygun kuantum mekanik teorileri seçilmiştir. Kuantum mekanik olarak birçok yöntem vardır. Bunlar arasında Hartree Fock Teori, Semi-Empirikal teori ve metaller için en yaygın en gelişmiş yöntem olarak kullanılan Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi bulunmaktadır. Bahsedilen bu yöntemlerin hepsi Gaussian 6.0 [14] uygulaması ile kullanılabilir. Çalışmamızda Gaussian uygulaması kullanılarak kuantum mekanik çalışmalar iletirilmiştir. Aynı şekilde moleküler kenetlenme çalışmaları içinde birçok uygulama bulunmaktadır. Bu uygulamaların genel olarak Lamarcian genetik algoritmaları kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise en yaygın kullanılan program olan AutoDock [27] programı kullanılmıştır. Moleküler dinamik çalışmaları yapılan önceki çalışmaların devamı ve doğrulayıcısı niteliğinde olduğundan moleküler dinamik çalışmaları ile çalışmalarımıza devam edilmiştir. Moleküler dinamik çalışmalarımızda da Desmond [28] uygulaması kullanılmıştır.

2.1 Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (YFT)

Yoğunluk fonksiyoneli teorisi Hohenberg ve Kohn tarafından ele alınan çok önemli bir makalenin 1964 yılında yayınlanması ve bunun akabinde 1965 yılında Kohn ve Sham tarafından yazılan bir makale ile ortaya çıkmıştır ve gelişimi başlamıştır [29]. Bu gelişimle birlikte YFT son 30 yılda periyodik sistemlerin kuantum mekanik simülasyonları için sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur. Kuantum kimyagerleri gelişen bu yöneme sessiz kalamamış ve moleküllerin enerji yüzeylerinin simülasyonunu oluşturmak için bu yöntemi kullanmaya başlamışlardır [30]. Bu yöntem çeşitli moleküler hesaplamalar ve teori ve deney arasındaki bağlantının kurulmasına izin verir ve genel olarak yapının geometrik, elektronik ve spektroskopik özellikleri hakkında bilgi edinmeye yardımcı olur [31] Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisinin kuantum mekanik çalışmalardaki önemini anlayabilmek için geleneksel

dalga fonksiyonlu yaklaşımları bilmek gerekir. Bu yöntemler kuantum mekaniğinin temeli olan Schrödinger denkleminde yaklaşık çözümler bulmaya çalışır. Bu çalışmaların temeli ise Hartree ve Fock'un 1920'deki çalışmaları ile başlamıştır. Hartree-Fock (HF) teorisine göre sistemin N tane cisim dalga fonksiyonunun ve N spin orbitalin bir Slater determinantı ile tahmin edilebileceğini öne sürer. Bu denklemlerin çözümü ile sistemin enerjisi hesaplanabilir. Fakat Hartree-Fock yönteminin temel eksikliği elektronların birbirinden bağımsız hareket ediyormuş gibi ele almasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir deyişle elektron korelasyonunun ihmal edilmesidir. Bundan dolayı Hartree-Fock yöntemi biyo-inorganik kimya gibi sistemler için basit ve etkinliği düşük kalmaktadır. Bu nedenle Hartree-Fock teorisinin korelasyon eksikliğini tamamlayabilmek ve tam dalga fonksiyonuna yaklaşabilmek için post-HF (HF sonrası) ab initio çalışmalar olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat bu yöntemlerin eksiklikleri ise 20'den fazla atomlar için uygun olmamaları ve maliyet açısından çok yüksek olmalarıdır.

Yoğunluk fonksiyonel teorisinde ise hem HF hem de post-HF'deki sorunların çözümü için yollar aranmıştır. Bu yöntemin temel mantığı dalga fonksiyonunu elektronik yoğunlukla değiştirerek çözüm aramaktadır. Modern Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisinde Hohenberg ve Kohn'a göre iki teori vardır. Birincisi, temel durumdaki elektron yoğunluğunun elektronik dalga fonksiyonunu ve doğal olarak elektronik sistemin tüm temel durum özelliklerini oluşturduğunu söylemektedir. İkincisi ise, elektron dağılım enerjisinin elektron yoğunluğunun bir fonksiyoneli olarak tanımlanabilir ve bu fonksiyonelin temel durum yoğunluğu için bir minimum olduğunu söylemektedir. Bu teorilerle çok cisimli Schrödinger denkleminin çözümü sağlanabilir. Ve artık amaç yoğunluk fonksiyonunun en aza indirilmesi olur.

Pratikte Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisinin ortak bir kullanıma ulaşmasının temeli Kohn-Sham yakınsaması ile olmuştur. Bu yakınsama bir HF yaklaşımıdır. Etkileşimde olmayan sistemleri çözmek etkileşimde olanlara nazaran daha kolaydır. Çünkü dalga fonksiyonu orbitallerin bir Slater determinantı olarak temsil edilebilir. Böyle bir sistemin kinetik enerji fonksiyonu tam olarak bilinir ve bilinmeyen tek terim olarak değişim korelasyon fonksiyonu kalmaktadır. Bu bilinmeyen ise Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisinin sorunu oluşturmaktadır. Çeşitli doğruluk seviyelerinde birçok yaklaşım vardır. Bunlardan en temel ve basiti enerjinin sadece yerel yoğunluğa bağlı olduğu yaklaşımdır (LDA). YFT yönteminin gelişmesinde büyük rol oynayan bir sonraki adım ise hibrit fonksiyonellerin tanıtılmasıdır. Hibrit-YFT yöntemlerinden en

çok bilineni B3LYP yöntemidir. Bu yöntem daha çok geçiş metallerini içeren moleküllerin hesaplanmasında kullanılır. Fakat yine de sınırlamaları ve başarısız yönleri bulunmaktadır. Bu eksikliklerin giderilebilmesi için çift hibrit yöntemi geliştirilmiştir. En çok bilinen yöntemleri ise B2PLYP yöntemidir [31].

2.1.1 Baz fonksiyonları

Hesaplamalı kimya çalışmalarında moleküler orbital oluşturabilmek için lineer kombinasyonların bir birleşimi olarak baz setleri kullanılır. Bu baz setleri aynı zamanda baz fonksiyonları olarak da adlandırılabilir. Baz setleri aslında matematiksel fonksiyonlardan oluşan setlerdir [32].

2.1.1.1 Yöntemler

Yapılan kuantum mekanik çalışmalarda YFT kullanılmıştır. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisinde amaca yönelik kullanılan birçok yöntem vardır. Bu yöntemler kullanılan atom tipine göre seçilmelidir. Çalışmalarımızda geçiş metalleri olan Ni, Zn ve Cu kullandığımız için B3LYP yönteminin diğer yöntemlere göre daha iyi sonuç verdiği karar verilmiştir. Aynı zamanda yapılan hesaplamalı çalışmalarda da B3LYP yönteminin daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi amaca yönelik kullanılan farklı birçok yöntem sahtir. Bu yöntemler arasında B3P86, B3PW91, O3LYP, APFD, CAM-B3LYP ve LC-BLYP vb. yöntemler vardır. Bu yöntemler adlandırılırken kullanılan her bir harflerin farklı anlamları vardır. Örnek olarak B harfi Becke değişim fonksiyonunu tanımlar, LYP korelasyon fonksiyonunu tanımlar, S Slater değişim fonksiyonunu tanımlar [14].

2.1.1.2 Metaller için baz setleri

Kuantum mekanik çalışmalarda birçok baz seti kullanılmaktadır. Bu baz setleri hesaplama sırasında atomların moleküler orbital oluşturabilmeleri için gerekli olan fonksiyon setleridir. Birçok farklı baz setleri kullanılabilir. Atomlara esneklik kazandırmak adına polarizasyon veya difüzyon fonksiyonları da eklenebilir. Örnek olarak birçok farklı baz seti gösterilebilir. Bunlar arasında 6-31G, 6-311G, 6-31G*, 6-31G+* gibi türevlendirilebilen baz setleri vardır. Bu çalışmada 6-31G** kullanılmıştır. Her bir sayı farklı bir anlam ifade etmektedir. Çalışılan örneklerde 6 sayısı ağır atomlar için Gaussian primitive ve baz fonksiyonlarını oluşturur. Diğer rakamlar ise hafif atomlar için primitive ve baz fonksiyonları sayısını oluşturur. * ile gösterilen simge

atoma polarizasyon eklemektedir. + ile gösterilen simge ise atomlara difüzyon eklemektedir. Bu eklentiler Gaussian primitiveleri ve baz fonksiyonlarında değişikliğe neden olmaktadır [14].

2.1.2 YFT çalışmaları

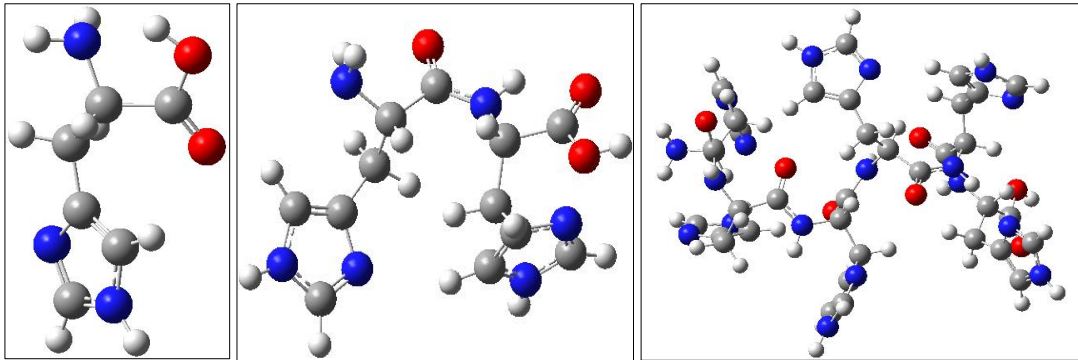
YFT çalışmaları birkaç farklı şekilde ilerlemiştir. Bu yollar hedeflenen moleküle adım adım ilerlemenin basamaklarını oluşturmaktadır. İlk olarak çalışmalar gaz fazında gerçekleştirilmiştir. Bu ortamda elde edilen optimize yapılar kullanılarak sulu fazda moleküller tekrar optimize edilmiştir. Çalışılan tüm histidin molekülleri metalli ve metalsiz yapı olacak şekilde optimize edilmiştir.

2.1.2.1 Metalsiz YFT çalışmaları

Bu aşamada yapılan tüm çalışmalarda herhangi bir metal kullanılmadan gaz fazında ve su fazında gerçekleştirilmiştir.

Gaz fazında metalsiz yapı optimizasyonu

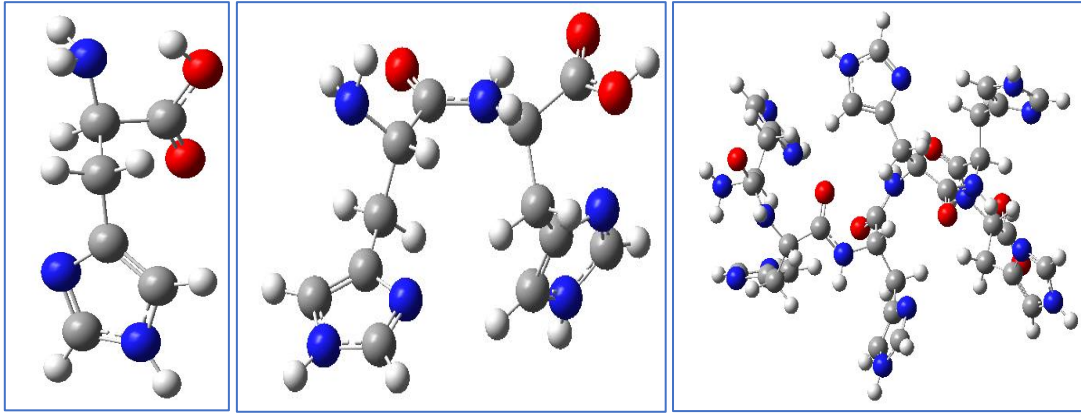
Tek histidin amino asiti Gausview 6.0 [13] uygulaması kullanılarak çizilmiştir. Çizilen amino asit YFT yöntemi B3LYP fonksiyonu ve 6-31G** baz seti ile optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen tek histidin optimizasyonu kullanılarak dimer histidin, dimer histidin ile tetramer histidin ve hekza histidin yapısı oluşturulmuştur. Tüm yapılar aynı yöntem ile optimize edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Tekli, ikili ve altılı susuz metalsiz yapılar.

Sulu ortamda metalsiz yapı optimizasyonu

Gaz fazında optimize edilen histidin yapılarının tümü IEFPCM yöntemi kullanılarak sulu ortamda optimizasyonları aynı yöntem ve baz seti ile tekrar gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Sol tek histidin, ortadaki ikili histidin ve sağdaki 6'lı histidin optimizasyonları göstermektedir.

2.1.2.2 Metalli YFT çalışmaları

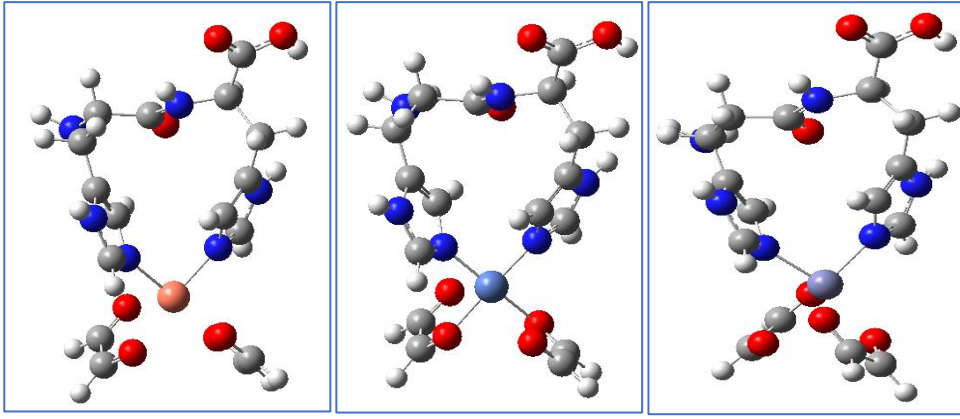
Metalsiz optimizasyon çalışmaları sonrasında metalin histidin etiketi üzerinde etkisini açıklamak için ve literatürdeki deney sonuçlarından yararlanarak metalli yapı optimizasyonları yapılmıştır.

Gaz fazında metalli yapı optimizasyonu

Metalsiz optimizasyonlar sonucunda elde edilen 1,2,3,4,5 ve 6 'lı optimize yapılar kullanılarak metalli yapılar oluşturulmuştur. Ardışık iki metal arasına çalışılan metaller koordine edilmiştir. Bu koordinasyon histidin imidazol halkalarında bulunan azot halkalarına yapılmıştır. Metal ve azot atomları arasında koordinasyon bağı oluşturulacak şekilde metal iyonları yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu yapılar YFT yöntemi olan B3LYP ve metal için baz seti 6-31G** [33] değerinde gen anahtar kelimesi kullanılarak internet sitesi üzerinden çekilmiştir ve girdi dosyasına eklenmiştir. Kalan C (karbon), O (oksijen), N (azot) ve H (hidrojen) için ise 6-31G** baz seti kullanılmıştır.

Su çözücüsü içeren ortamda metalli yapı optimizasyonu

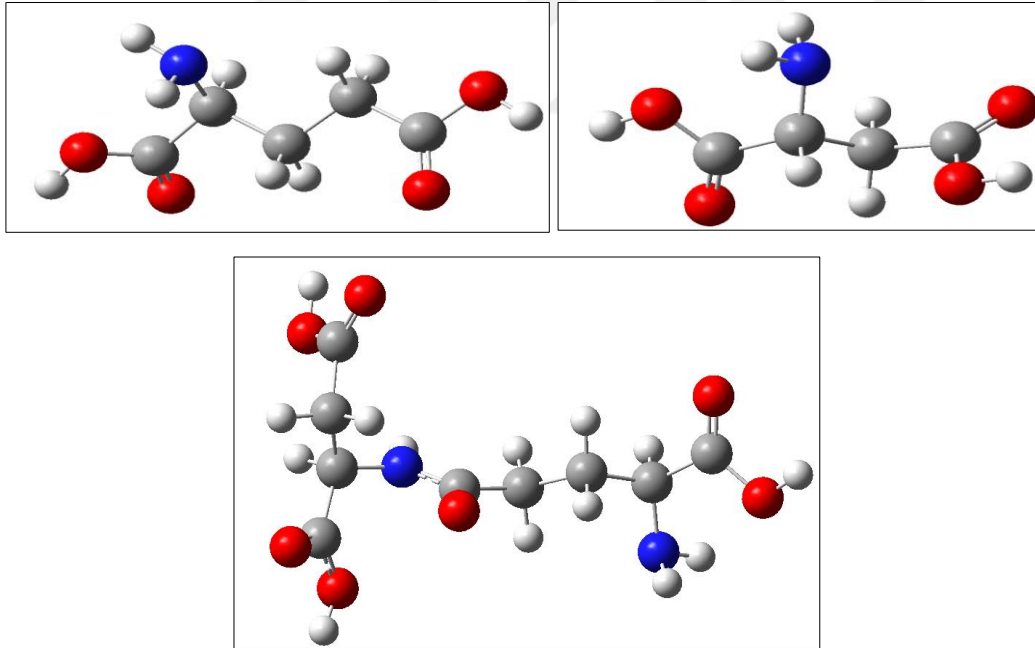
Gaz fazında optimize edilen histidin yapıları sulu fazda tekrar optimize edilmiştir. Optimizasyon işlemleri YFT yöntemi olan B3LYP fonksiyonu ile yapılmıştır. Metal ve diğer atomları farklı baz setleri optimize edilmesini sağlayan Gen anahtar kelimesi kullanılmıştır. Metaller için internet sitesinden [33] baz setleri alınmıştır ve optimizasyon sırasında kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: 2 histidin - 1 metal yapısının sırasıyla Cu, Ni, Zn optimizasyonları.

2.1.2.3 Amino asitli YFT çalışmaları

Optimize edilen 6'lı histidin yapıları kullanılarak histidin oltalarının proteinlere olan ilgisi incelenmiştir. Bu çalışmalarda amino asit dizisi olarak iki farklı amino asit ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Bu amino asitler glutamik asit ve aspartik asittir, bu iki asit farklı uzunluktadır. Glutamik asit ve aspartik asit birbirleri ile yaptıkları peptid bağları ile farklı kombinasyonlar oluşturulmuştur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Glutamik asit (sol üst), aspartik asit (sağ üst) ve glutamik asit-aspartik (alt) asit yapısı.

Optimize his-tag yapılarının amin uçlarından (NH_2) ve optimize edilen amino asit yapılarının karboksil uçlarından (COOH) bağlanma gerçekleştirilerek amino asitli yapılar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu yapıların bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarla his-tag yapılarının proteinlere olan ilgisi araştırılmıştır.

2.1.2.4 Optimize yapılarda frekans çalışmaları

Kuantum mekanik çalışmalarda kullanılan Gaussian 6.0 [14] programı belirli eşik değerleri ile çalışarak optimizasyonları gerçekleştirmektedir. Bu eşik değerleri hedeflenen değerlere geldiğinde program optimizasyonu sonlandırmaktadır. Fakat verilen başlangıç geometrisine göre elde edilen optimize yapı en düşük enerjili yapı olmayabilir. Yapıların reaksiyon grafiğinde lokal minimum noktaları global minimum noktası veya geçiş yapısının bulunduğu noktalar bulunabilmektedir. Global minimum noktalar en düşük enerjiye sahip olunan noktalardır. Lokal minimum noktalar ise düşük enerjili noktalardır. Optimize yapıların en düşük enerjiye sahip olup olmadıkları bilinmemektedir fakat farklı başlangıç geometrisi denemeleri ile farklı lokal minimum noktaları bulunabilir. Burada önemli olan optimize edilen yapıların geçiş yapılarında olmamasıdır. Bunu tespit etmenin yolu ise yapılarda frekans hesaplamalarının yapılmasıdır. Freq anahtar kelimesi kullanılarak frekans hesaplamaları tüm çalışılan moleküller için yapılmıştır. Elde edilen frekans sonuçlarında negatif bir frekans bulunması halinde elde edilen yapının bir geçiş yapısı olduğu anlaşılmaktadır. Yapılan frekans çalışmalarında beklendiği üzere negatif frekans bulunmamıştır (Şekil 3.13).

2.1.2.5 Optimize yapıların NBO (Doğal Bağ Orbitali) yüklerinin hesaplanması

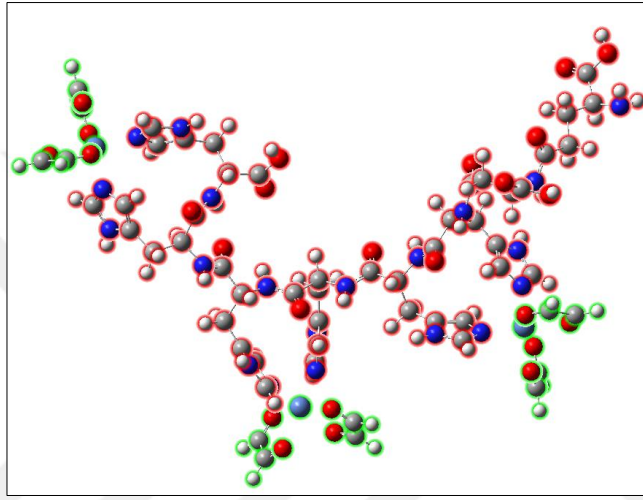
Optimize geometrilerde yük dağılımını görebilmek için daha uygun bir yöntem olan NBO yüklerinin hesaplanması yapılmıştır. Bu hesaplamalar kullanılarak yüklerin ligandan proteine mi yoksa tam tersine proteinden liganda doğru aktarıldığını açıklamaya çalışılmaktadır. NBO yüklerinin hesaplanması pop=nbo anahtar kelimesi ile yapılmaktadır.

2.1.2.6 Tekli Nokta (SP) çalışmaları ile ESP (Elektrostatik Potansiyel) yüklerinin hesaplanması

NBO yük hesabına ek olarak farklı bir yöntemle yük hesabı yapmak için ESP yöntemi kullanılmıştır. Hesabı yapmak için optimize edilen yapılarda tekli nokta hesabı ile ESP yükleri hesaplanmıştır. Tekli nokta hesabında optimize yapı geometrisinde değişiklik yapmadan sadece yük hesabı yapılır.

2.1.2.7 BSSE (Temel Set Süperpozisyon Hatası) hesaplamaları

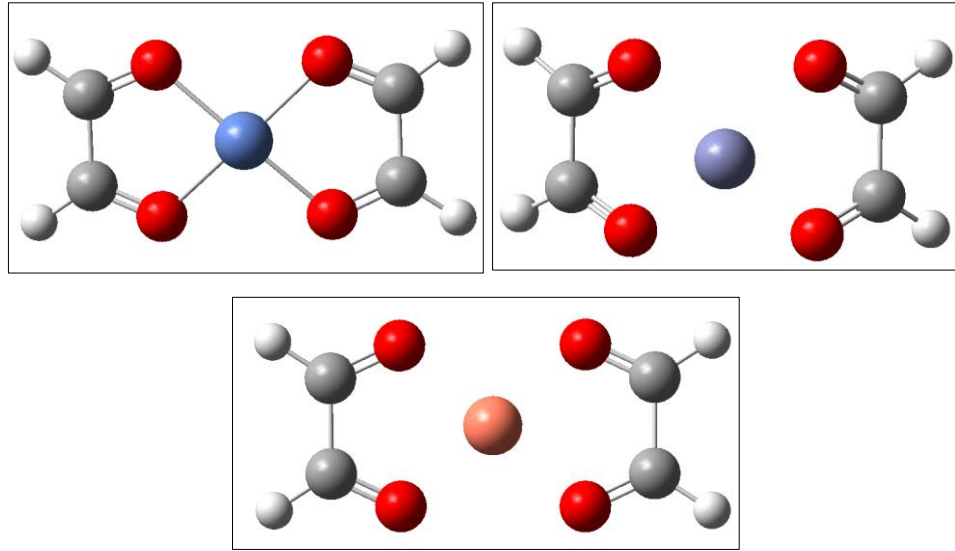
Moleküller arasındaki etkileşim enerjisi toplam enerjiden her bileşenin enerjilerinin çıkarılması ile elde edilmektedir. İki monomer bir dimer oluşturmaya çalışıldığında birbirlerine yaklaşmaktadırlar ve bu yaklaşımla orbitalleri etkilemektedir. Bu etki baz setleri arasında olmaktadır ve bu baz setleri karşı moleküller etkilemektedir. Ve bu etki temel küme süper pozisyon etki olarak adlandırılır [34]. Bu çalışmada metal rezin yapısını ilk parça histidin-aminoasit yapısını ikinci parça olarak ayarlayarak BSSE hesabı yapılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: His₆M₃ – AA yapısı için BSSE hesabı parça gösterimi.

2.1.2.8 Rezin – Metal yapılarının optimizasyonu

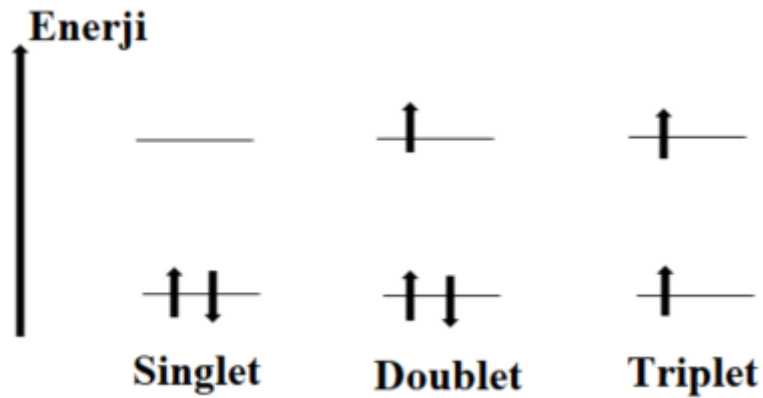
Histidin dimerlerinin imidazol halkaları arasına koordinasyonu yapılan metal atomlarının altılı koordinasyonunun kalan dört koordinasyonu rezin molekülleri ile tamamlanmaktadır. Yapılan BSSE çalışmalarında ve NBO yük transferi çalışmalarında metal yük dağılımının nasıl olduğunu görmek ve rezin parçasının enerjisini hesaplamak için bu yapının optimizasyonu aynı baz seti ve yöntem ile 3 farklı metal için de gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Rezin – Nikel (sol üst), Rezin – Çinko (sağ üst) ve Rezin – Bakır (alt) yapı optimizasyonları.

2.1.2.9 Yapılarda çokluk (Multiplicity) hesaplamaları

Bileşiklerdeki çokluk sayısı $2S+1$ formülü ile hesaplanmaktadır (Şekil 2.7). S toplam dönüş açısal momentum sayısıdır. Moleküllerin orbitallerinde bulunan eşlenmemiş elektron sayısı ile hesaplanır. Eşlenmemiş elektron sayısına bağlı olarak yapılar singlet, doublet, triplet vb. çokluk değerlerine sahip olabilmektedir. Bu çalışmada 2 (nikel, bakır) farklı metal için de farklı çokluk değerleri ile hesaplamalar yapılmıştır.



Şekil 2.7: Çokluk hesabının orbitaller üzerinde gösterimi.

2.2 Moleküler Kenetlenme

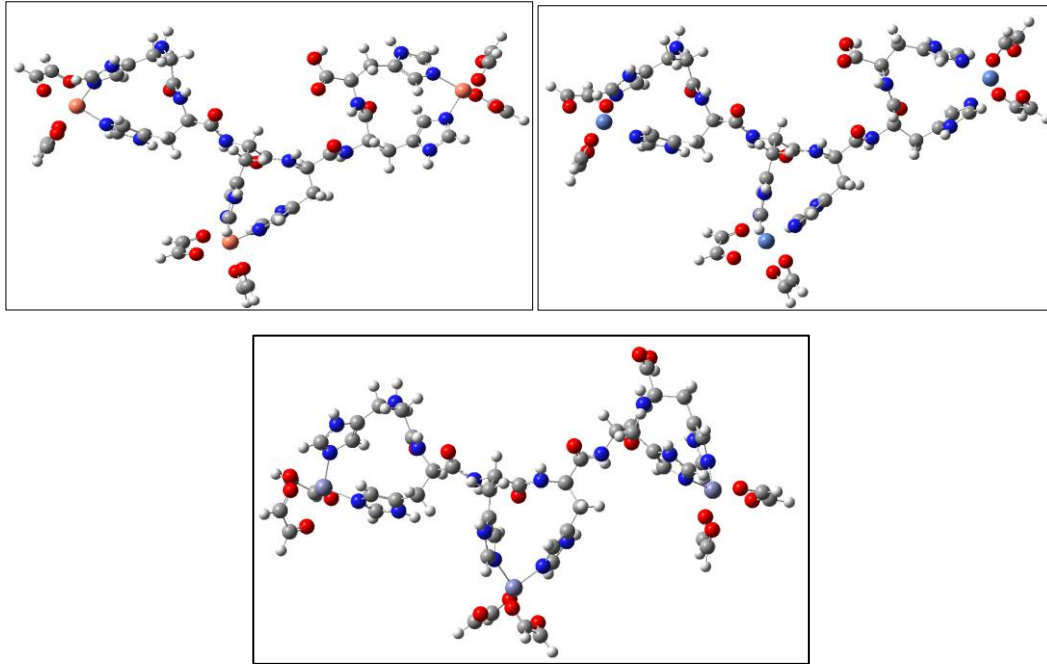
Moleküler kenetlenme çalışmalarına başlamadan önce ligand molekülünün kenetleneceği hedef makromolekülün seçilmesi aşaması ve bu moleküllere uygun koşulların sağlanması gerekmektedir.

2.2.1 Hedef makromolekül seçimi ve hazırlanması

Hedef makromolekül seçiminde ideal olan seçim X-ışını veya nükleer manyetik rezonans (NMR) ile deneysel olarak belirtilen yapıların seçilmesidir. Seçilen hedef yapı liganda ve amaca uygun olmalıdır. Kuantum mekanik çalışma kısmında optimize edilen his-tag (6 histidin metal kompleksi) ligand olarak belirlenip hedef molekül ise 1BNA olarak belirlenmiştir.

2.2.2 Ligand molekülünün seçimi ve hazırlanması

Yapılan kuantum mekanik çalışmaları sonucunda birçok histidin yapısı denenmiştir. Bu denemeler sonucunda elde edilen his-tag yapısı 6 histidin ve metal içeren yapı en kararlı yapı olduğu görülmüştür. Elde edilen bu kararlı yapı yapılacak olan yerleştirme çalışmalarında ligand olarak kullanılmıştır. Kuantum mekanik çalışmalarda 3 farklı geçiş metali kullanıldığı için yerleştirme çalışmaları bu 3 farklı metal ile optimize edilmiş olan his-tag yapısı ve metalsiz halde bulunan his-tag yapısı ile yapılmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: His₆Cu₃ (sol üst), His₆Ni₃ (sağ üst) ve His₆Zn₃ (alt) yapı optimizasyonları.

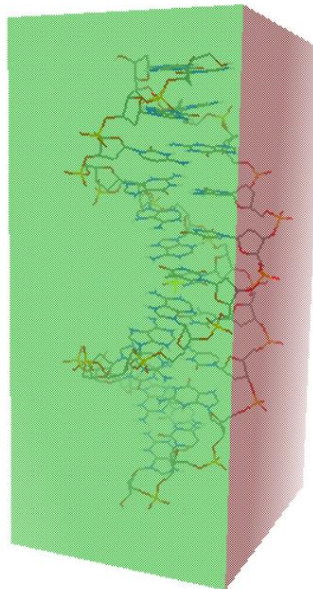
2.2.3 Yerleştirme çalışmaları

Yapılan tüm yerleştirme çalışmaları AutoDock uygulaması ile yapılmıştır [27]. Seçilen makromolekül uygulamada açılarak yapıda bulunan tüm su molekülleri silinmiştir. Uygulama ligand ve reseptör molekülleri için yalnızca polar hidrojen atomlarının bulunduğu atom modelini kullanır. Ayrıca molekül üzerinde bulunan kısmi yüklerin de atanması gerekmektedir. Seçilen makromolekül (1BNA) için Gasteiger yükü 13,9-14 arasında olmalıdır. Programda bu yük ayarlandıktan sonra programın çalışabileceği uzantı olan pdbqt uzantısına reseptör çevrilir.

Kuantum mekanik çalışmalar sonucunda elde edilen ligand için ise optimizasyon sonucu kararlı bir yapıda olduğundan sadece pdbqt uzantısına çevrilerek hazır hale getirilmiştir.

2.2.3.1 Yerleştirme alanı seçimi (Grid Box)

Kenetleme çalışması için dosya uzantıları ayarlandıktan sonra kenetlenmenin makromolekül yani reseptör üzerinde hangi bölgede olacağını seçmek için yerleştirme alanı seçimi yapılmalıdır. Reseptör üzerinde bölge seçimleri yapılabilir fakat bu çalışmada kör (Blind) yerleştirme (Şekil 2.9) olarak adlandırılan tüm reseptörün seçili olduğu yerleştirme çalışması yapılmıştır. Bu sayede elde edilen düşük enerjili ligandın tüm DNA üzerinde hangi bazlara bağlandığı ve büyük oluk veya küçük oluk üzerinden bağlanıp bağlanmadığı tespit edilecektir.



Şekil 2.9: Kör (blind) yerleştirme için ızgara kutusu (Grid box) gösterimi.

2.2.3.2 Poz sayısı ve algoritma seçimi

Protein ligand arasındaki kenetlenmenin kaç pozda gerçekleşmesi gerektiği belirlenmiştir. Poz sayısının yüksek olması çalışma için daha iyi olacaktır. Bu nedenle poz sayısı 75-100 arasında belirlenmiştir. Böylece esnek ligandın reseptör üzerinde daha doğru bölgeye bağlanma olasılığı artırılmış olur. Poz sayısı arttıkça programın yüksek bağlanma enerjisini ve uygun reseptör-ligand yapısını bulma olasılığı artırılmış olur. Fakat poz sayısı artırıldığı için kullanılan bilgisayar donanımları daha uzun süreler kullanılır. Bu durumla kullanılan bilgisayar üzerinde bulunan Merkezi İşlem Birimi (CPU) kullanım zamanı artmış olur bu da dezavantajdır. Diğer bir seçim ise arama algoritması seçimidir. Program üzerinde bulunan genetik algoritması arama algoritması olarak seçilmiştir. Lamarckian genetik algoritması program çıktısı vermek amacıyla seçilmiştir.

2.3 Moleküler Dinamik

Kenetlenme çalışmalarının bitmesinin ardından bu çalışmaları desteklemesi adına moleküler dinamik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar Desmond [28] uygulaması kullanılarak yapılmıştır. Moleküler dinamik çalışmaları kompleks halde bulunan protein ve ligand yapısının gerçek hayatta bir çözücü içerisinde nasıl davrandığını görebilmek adına yapılan bir çalışmadır. Bu çalışma 3 farklı metalli yapı içinde tekrarlanmıştır.

2.3.1 Moleküler dinamik koşulları

Schödinger Desmond [28] programı kullanılarak yapılan simülasyonda bir çok parametre vardır. Bu parametreler kullanılan protein ve liganda göre koşullar belirlenmiştir.

2.3.1.1 Protein hazırlık aşaması

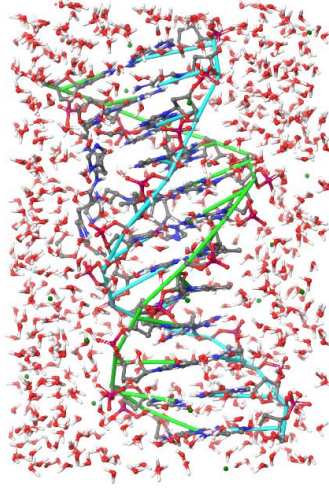
İlk olarak ön işlemlerle hidrojen bağları, metaller için zer-order bağlar ve disülfid bağları oluşturulur. Diğer aşama ise PROPKA kullanılarak pH 7.4'e ayarlanmıştır ve optimizasyon başlatılmıştır. Optimizasyon işleminden sonra ise yapıda oluşan herhangi bir sorunu veya oluşan sterik engelleri ortadan kaldırmak için OPLS3 kuvvet alanı kullanılarak minimizasyon yapılmıştır.

2.3.1.2 Sistem oluşturma aşaması

Bu aşamada SPC özücü modeli seçilmiştir. Kutu şekli olarak ortorombik şekil seçilmiştir. Oluşturulan kutu boyutlarının hesaplama yöntemi olarak Mutlak boyut (Absolute size) seçilmiştir. Kutu boyutu olarak (Å) $x=30$ $y=30$ $z=30$ ayarlanmıştır. Daha sonra ise iyon ekleme aşamasına geçilmiştir. Yapı nötrlemek adına eksik olan iyonlar hesaplanmıştır ve Na^+ ve Cl^- iyonları eklenmiştir. Ve son olarak iř çalıştırılmıştır ve simülasyonun başlaması için gerekli olan yapı hazır hale getirilmiştir (şekil 2.10).

2.3.1.3 Simülasyonu başlatma

Simülasyon süresi olarak 50 ns belirlenmiştir ve yörünge (trajectory) olarak 10 ps seçilmiştir. Topluluk (Ensemble) olarak ise NPT yöntemi seçilmiştir, sıcaklık 310 Kelvin'e ayarlanmıştır. Basınç 1.01325 (bar) olarak ayarlanmıştır. Ve sistem Grafik İşleme Birimi (GPU) ekirdekleri üzerinde başlatılmıştır.



şekil 2.10: İyon ve çözücü eklenmiş kompleks yapı.



3. HESAPLAMALAR

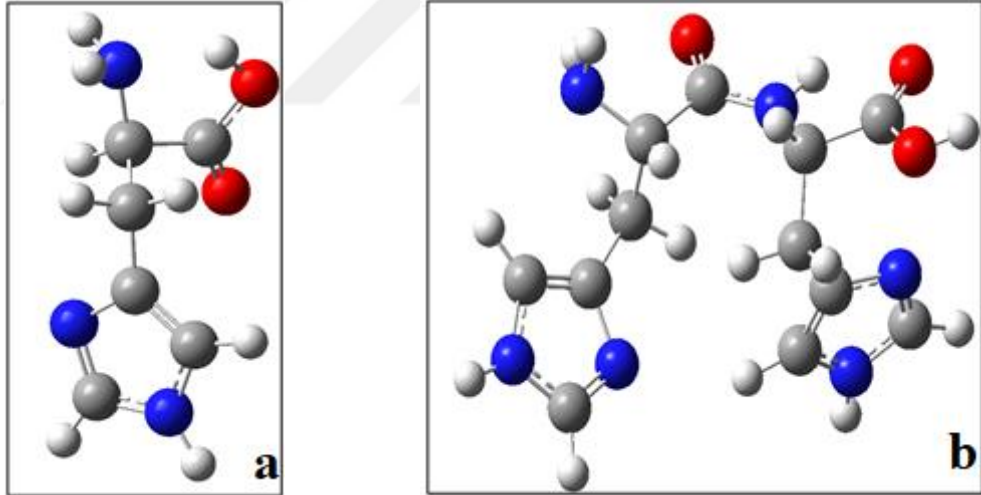
Yapılan bütün kuantum mekanik çalışmalar ve yerleştirme çalışmalarının sonuçları aşağıda gösterilmektedir.

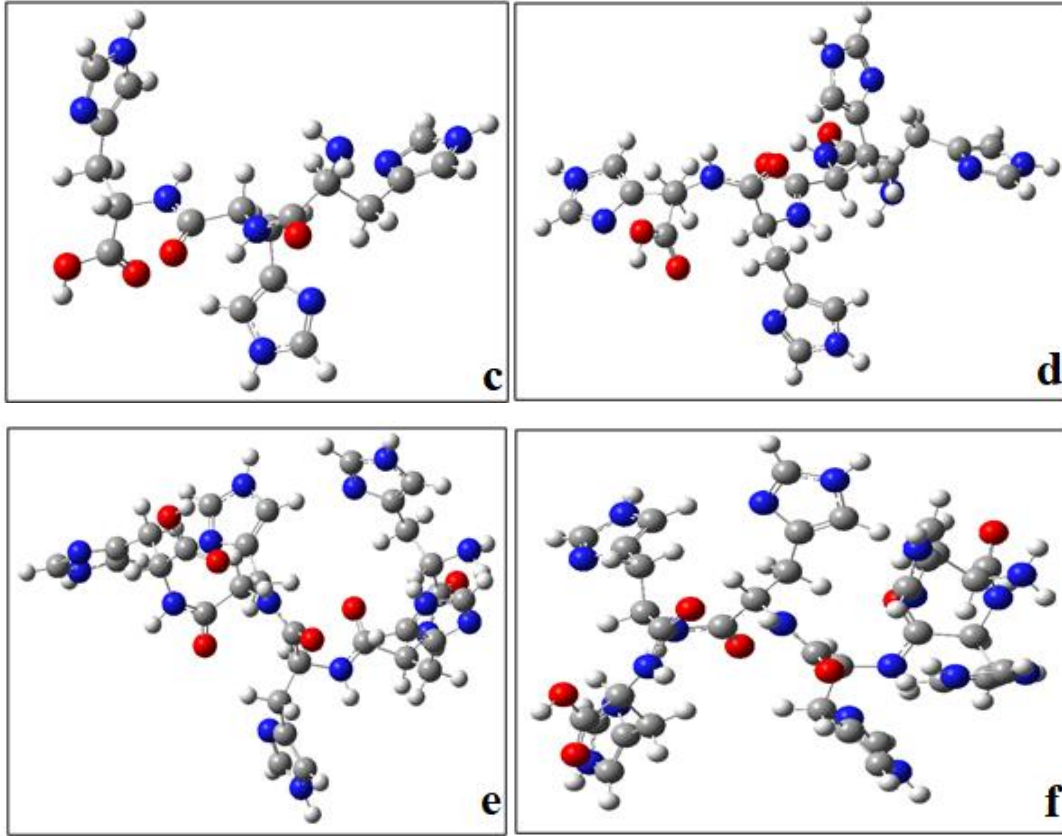
3.1 Yapı Optimizasyonları

Yapı optimizasyonları metalli ve metalsiz olarak ikiye ayrılmıştır.

3.1.1 Metal içermeyen yapı optimizasyonları

1, 2, 3, 4, 5 ve 6'lı histidin moleküllerinin tamamı sulu fazda optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonların hepsi YFT yöntemi olan B3LYP ve 6-31G** baz seti ile yapılmıştır (Şekil 3.1).

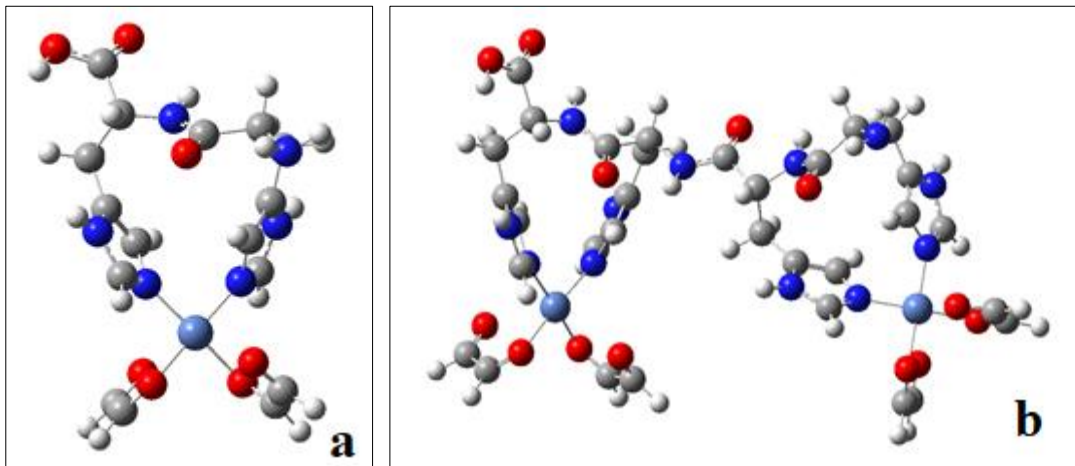


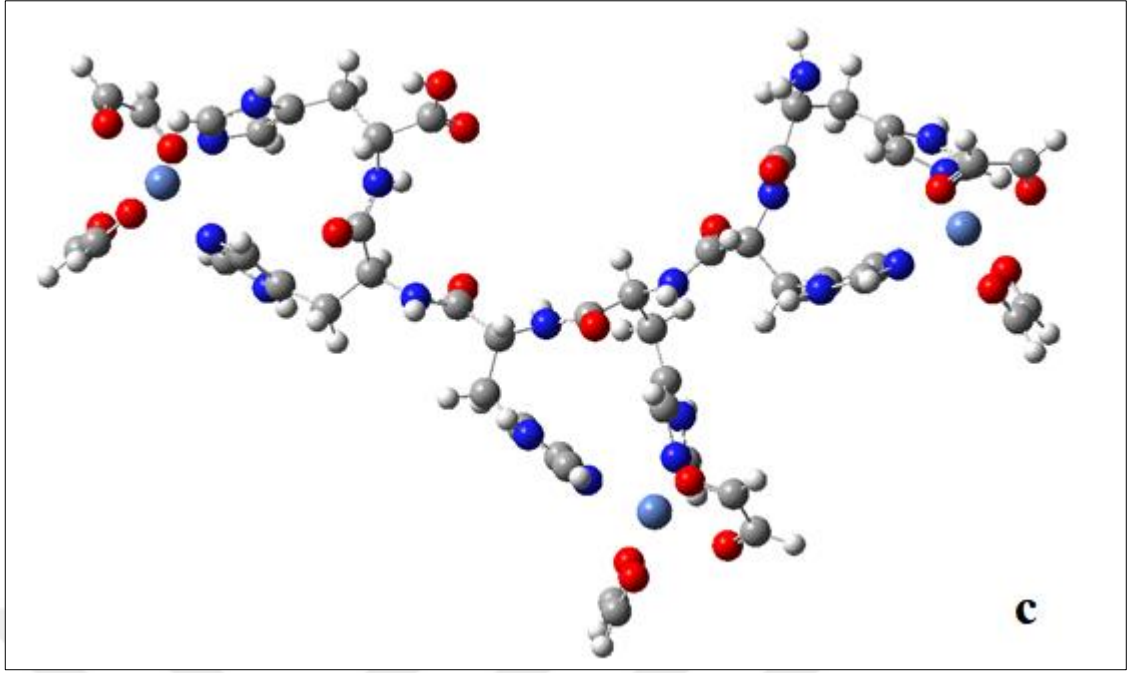


Şekil 3.1: Şekilde gösterilen numaralar **a)** Monomer **b)** Dimer **c)** Trimer **d)** Tetramer **e)** Pentamer **f)** Hekzamer hisitidinlerin metalsız optimizasyonlarıdır.

3.1.2 Nikel içeren His-tag yapı optimizasyonları

2, 4 ve 6 histidinli yapıların imidazol halkaları ve rezin molekülleri arasına nikel metali koordine edilerek yapılar optimize edilmiştir. Bu yapıların hepsi YFT yöntemi olan B3LYP yöntemi ve metaller için Gen komutu ile metallere özel olan baz seti hazırlanarak 6-31G** baz seti optimizasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

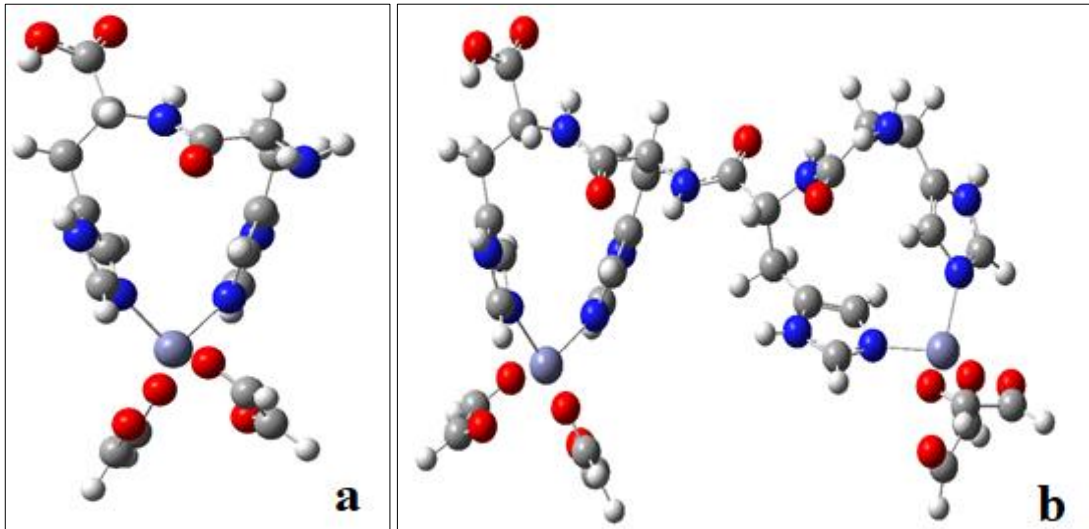


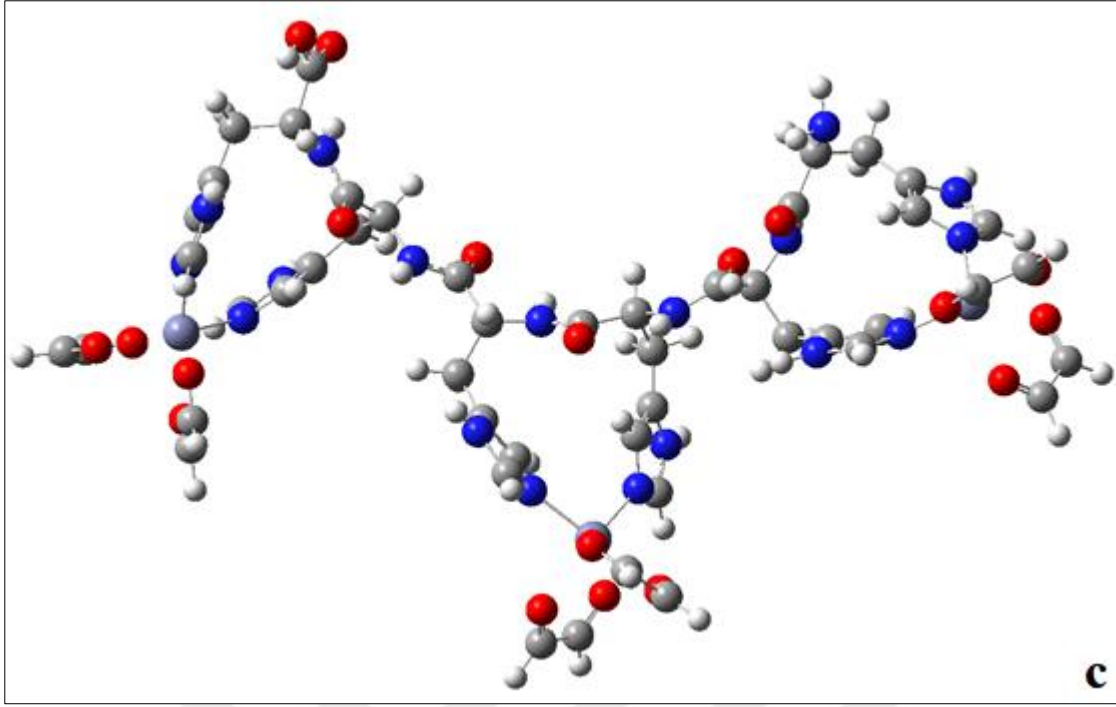


Şekil 3.2: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₂Ni₁ **b)** His₄Ni₂ **c)** His₆Ni₃ yapılarının optimizasyonlarıdır.

3.1.3 Çinko içeren His-tag yapı optimizasyonları

2, 4 ve 6 histidinli yapıların imidazol halkaları ve rezin molekülleri arasına çinko metali koordine edilerek yapılar optimize edilmiştir. Bu yapıların hepsi YFT yöntemi olan B3LYP yöntemi ve metaller için Gen komutu ile metallere özel olan baz seti hazırlanarak 6-31G** baz seti optimizasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).

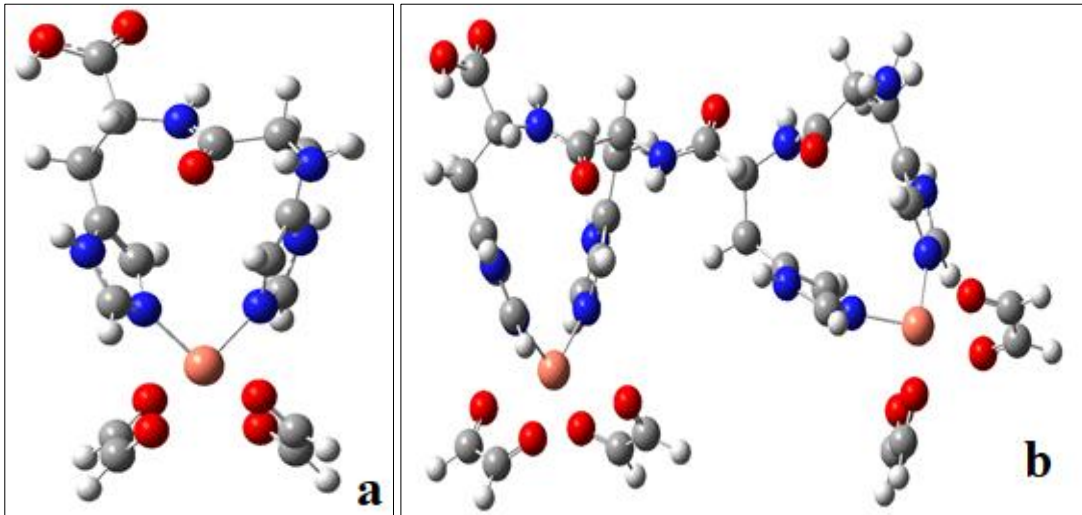


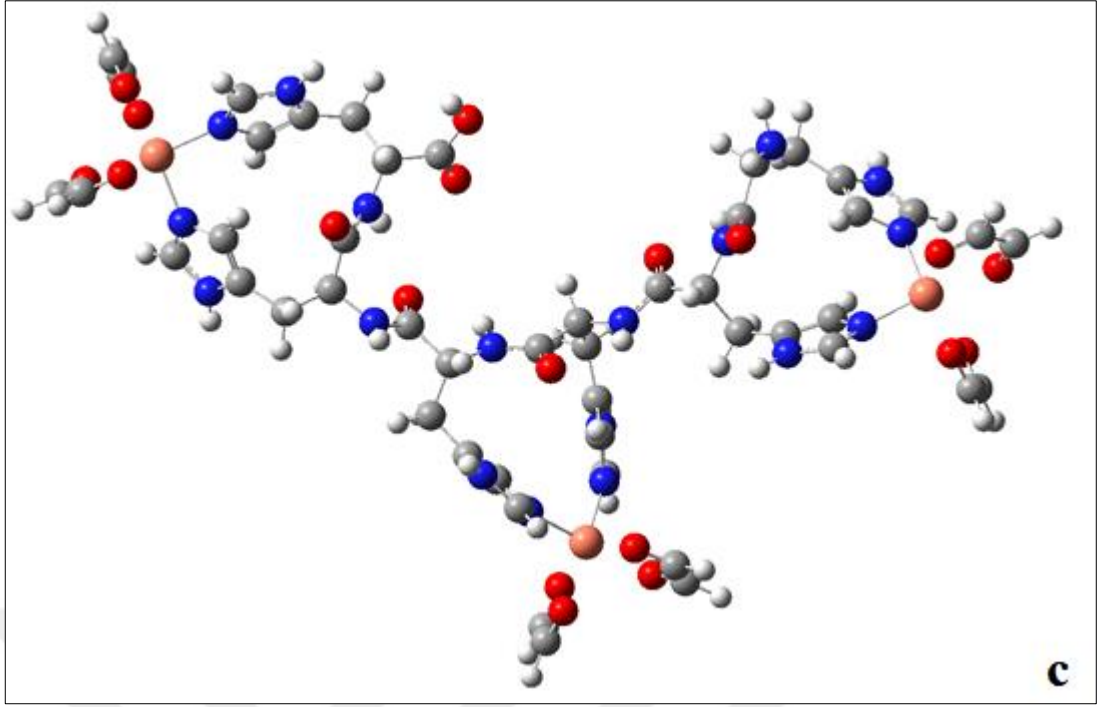


Şekil 3.3: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₂Zn₁ **b)** His₄Zn₂ **c)** His₆Zn₃ yapılarının optimizasyonlarıdır.

3.1.4 Bakır içeren His-tag yapı optimizasyonları

2, 4 ve 6 histidinli yapıların imidazol halkaları ve rezin molekülleri arasına bakır metali koordine edilerek yapılar optimize edilmiştir. Bu yapıların hepsi YFT yöntemi olan B3LYP yöntemi ve metaller için Gen komutu ile metallere özel olan baz seti hazırlanarak 6-31G** baz seti optimizasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).

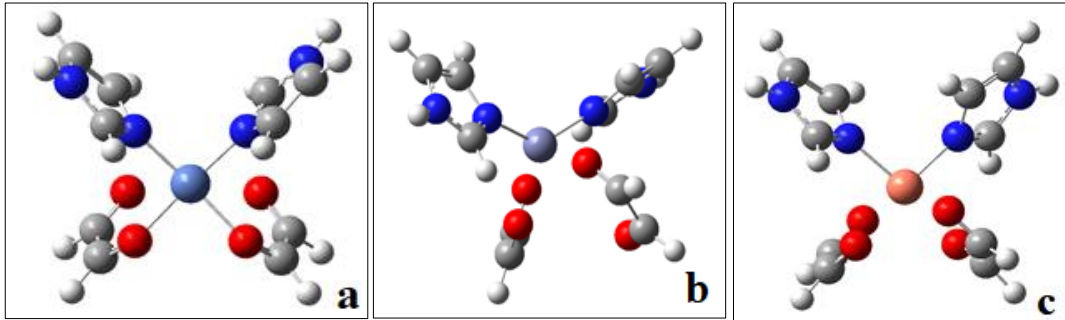




Şekil 3.4: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₂Cu₁ **b)** His₄Cu₂ **c)** His₆Cu₃ yapılarının optimizasyonlarıdır.

3.1.5 İmidazol halkası – Rezin molekülü optimizasyonu

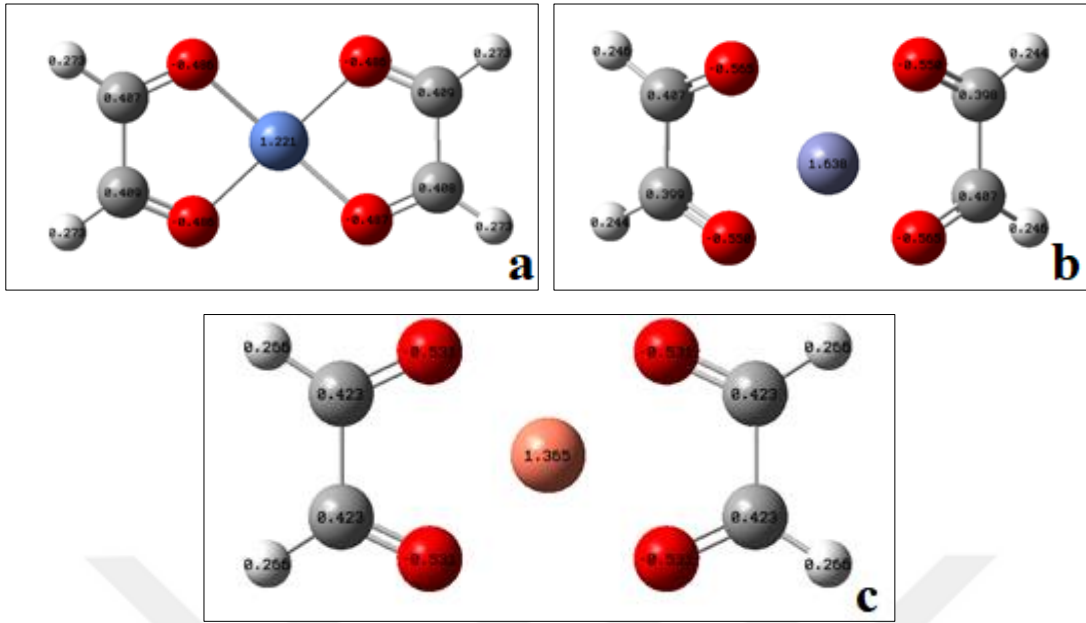
Nikel, Çinko, Bakır metallerinin +2 yüklerinin hangi atomlar üzerine dağıldığını görmek adına imidazol halkası ve rezinin bulunduğu bir yapı B3LYP ve 6-31G** baz seti ile optimize edilerek NBO yük dağılımına bakılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Şekilde **a)** Nikel **b)** Çinko **c)** Bakır atomlarının imidazol halkası ve rezin molekülü ile olan optimizasyonu gösterilmektedir.

3.1.6 Rezin molekül – Metal optimizasyonu

+2 yüke sahip olan Nikel, Çinko, Bakır metallerinin imidazol halkası olmadan oksijen atomları üzerine ne kadar yük dağıttığını tespit edebilmek adına sadece rezin molekülleri ve metal atomunun bulunduğu bir optimizasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Şekilde a) Nikel b) Çinko c) Bakır atomlarının rezin molekülüne olan yük transferi gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Tabloda metal ve rezin yapısının optimizasyon enerjisi gösterilmektedir.

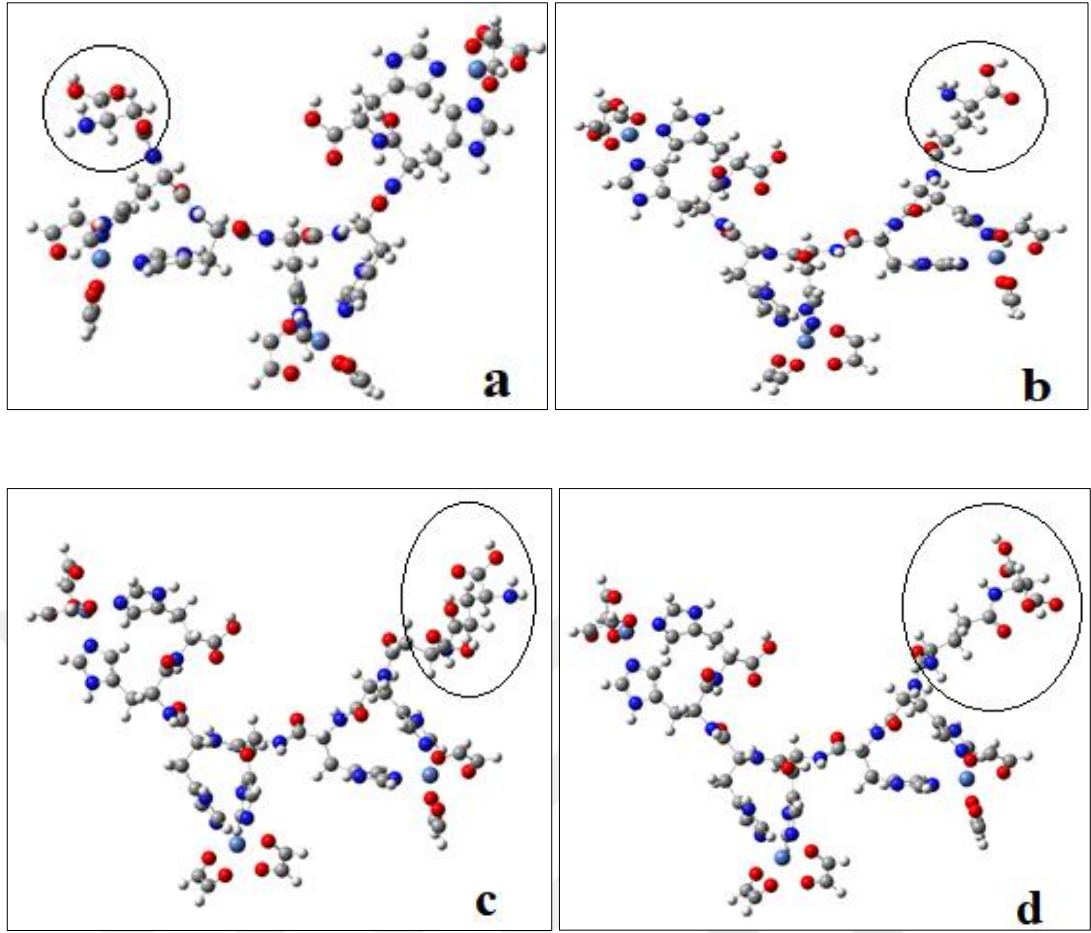
Metal	E (M-Rezin) ⁺² (Au)	E (M-Rezin) ⁺² (Kcal/mol)
Ni	-1963,4735	-1232079,61
Cu	-2095,6118	-1314996,39
Zn	-2234,5055	-1402152,19

3.1.7 His₆M₃ Yapılarının amino asit ile olan optimizasyonları

Nikel, Çinko ve Bakır metallerinin 6 histidinli yapı ile olan optimizasyonlarına farklı uzunlukta olan glutamik asit, aspartik asit ve bunların kombinasyonları bağlanmıştır. Aspartik asit ve glutamik asit peptid bağı ile bağlanarak daha uzun bir amino asit oluşturulmuştur. Yeni oluşturulan bu amino asit dizisi hem aspartik asit ucundan hem de glutamik asit ucunda bağlanarak optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu bağlanma sonucunda oluşan enerji farklılıklarından His-tag yapılarının amino asite olan ilgisi araştırılmıştır.

3.1.7.1 His₆Ni₃ - AA optimizasyonları

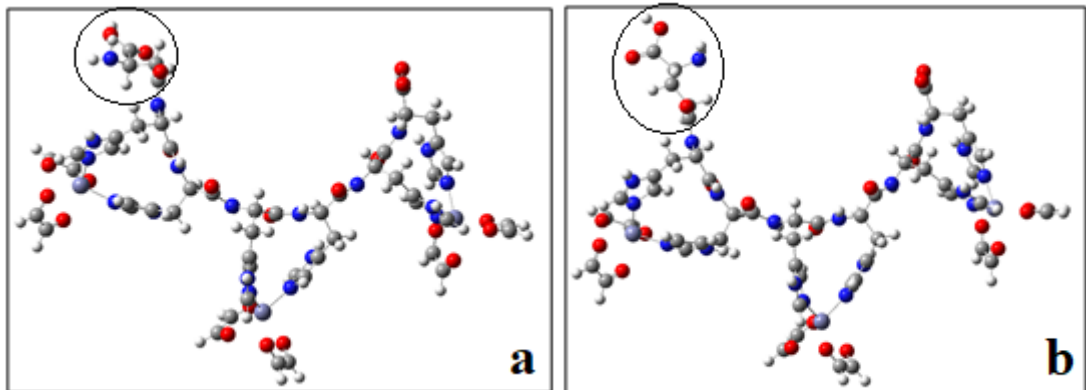
His₆Ni₃ yapısına amino asitler peptid bağı ile bağlanmıştır (Şekil 3.7).

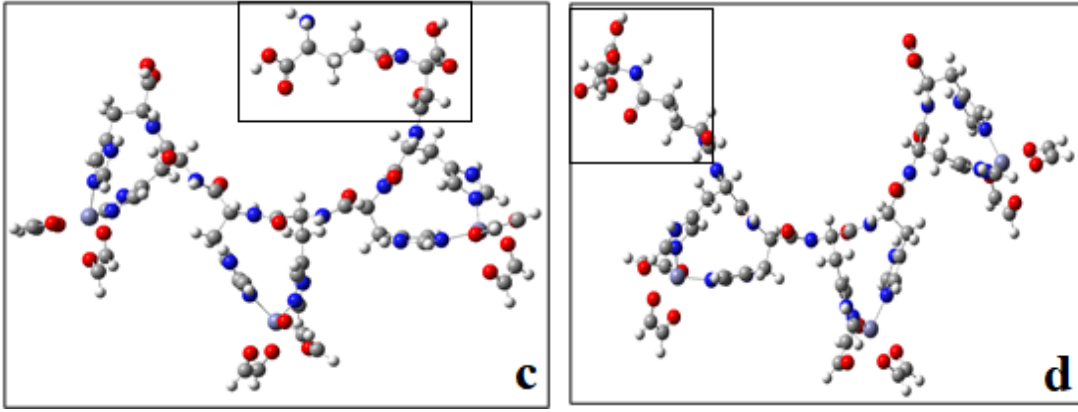


Şekil 3.7: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₆Ni₃ – Aspartik asit **b)** His₆Ni₃ – Glutamik asit **c)** His₆Ni₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) **d)** His₆Ni₃ – (Glutamik asit + Aspartik asit) hisitidinlerin optimizasyonlarıdır.

3.1.7.2 His₆Zn₃ - AA optimizasyonları

His₆Zn₃ yapısına amino asitler peptid bağı ile bağlanmıştır (Şekil 3.8).

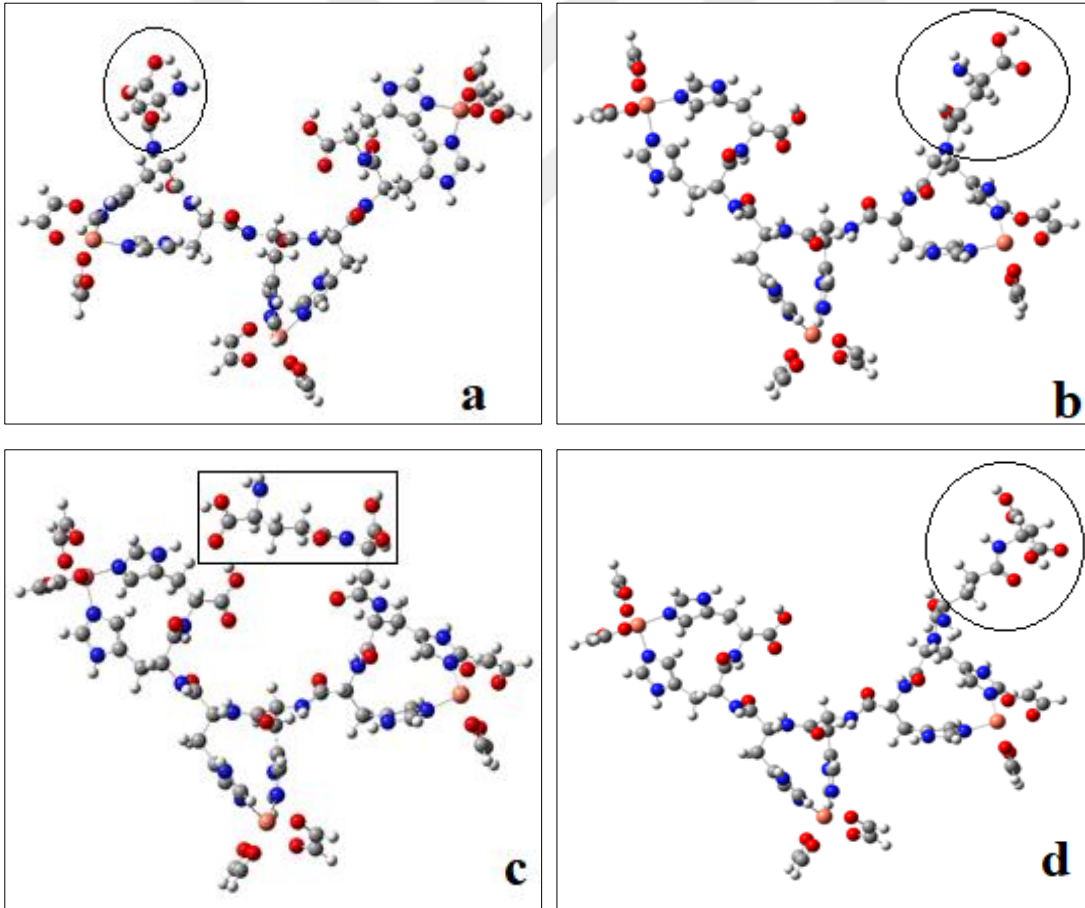




Şekil 3.8: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₆Zn₃ – Aspartik asit **b)** His₆Zn₃ – Glutamik asit **c)** His₆Zn₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) **d)** His₆Zn₃ – (Glutamik asit + Aspartik asit) hisitidinlerin optimizasyonlarıdır.

3.1.7.3 His₆Cu₃ - AA optimizasyonları

His₆Cu₃ yapısına amino asitler peptid bağı ile bağlanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₆Cu₃ – Aspartik asit **b)** His₆Cu₃ – Glutamik asit **c)** His₆Cu₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) **d)** His₆Cu₃ – (Glutamik asit + Aspartik asit) hisitidinlerin optimizasyonlarıdır.

Tablo 3.2: YFT çalışmaları sonucunda elde edilen Metalsiz - Metalli aminoasit bağlı yapıların optimize enerji değerleri.

Yapılar		Enerji	
		Au	Kcal/mol
His₆		-2910,6315	-1826421,22
His_{6a}		-3346,5023	-2099930,16
His_{6g}		-3385,8888	-2124645,20
His_{6ag}		-3821,8024	-2398181,01
His_{6ga}		-3821,8008	-2398180,02
His_{6M}	Ni	-8801,4245	-5522893,93
	Zn	-9614,3557	-6033008,22
	Cu	-9197,7635	-5771596,62
His_{6Ma}	Ni	-9237,3322	-5796426,00
	Zn	-10050,262	-6306539,70
	Cu	-9633,6693	-6045127,52
His_{6Mg}	Ni	-9276,6511	-5821098,61
	Zn	-10089,5811	-6331212,13
	Cu	-9672,9877	-6069799,83
His_{6Mag}	Ni	-9712,5525	-6094626,69
	Zn	-10525,4865	-6604742,80
	Cu	-10108,9038	-6343337,18
His_{6Mga}	Ni	-9712,5549	-6094628,23
	Zn	-10525,4850	-6604741,86
	Cu	-10108,8921	-6343329,83

Tablo 3.3: Denk.1,2 ve 3 kullanılarak hesaplanan YFT çalışmaları metal etkisini, metal varken amino asit etkisini ve amino asit varken metal etkisini gösterir.

		Enerji Birimi	Ni	Cu	Zn
ΔE_1		Au	-5890,7931	-6287,1321	-6703,7242
		Kcal/mol	-3696472,70	-3945175,39	-4206586,99
ΔE_2	a	Au	-435,9077	-435,9058	-435,9067
		Kcal/mol	-273532,07	-273530,90	-273531,49
	g	Au	-475,2265	-475,2242	-475,2253
		Kcal/mol	-298204,68	-298203,21	-298203,91
	ag	Au	-911,1279	-911,1403	-911,1308
		Kcal/mol	-571732,6	-571740,56	-571734,58
	ga	Au	-911,1303	-911,1286	-911,1293
		Kcal/mol	-571734,31	-571733,22	-571733,65
	a	Au	-5890,8300	-6287,1671	-6703,7602
		Kcal/mol	-3696495,85	-3945197,36	-4206609,55
ΔE_3	g	Au	-5890,7624	-6287,0990	-6703,6923
		Kcal/mol	-3696453,41	-3945154,63	-4206566,93
	ag	Au	-5890,7501	-6287,1015	-6703,6841
		Kcal/mol	-3696445,69	-3945156,17	-4206561,79
	ga	Au	-5890,7541	-6287,0913	-6703,6842
		Kcal/mol	-3696448,20	-3945149,81	-4206561,84

Tablo 3.2'de verilen optimize edilmiş yapıların enerji değerleri kullanılarak amino asidin ortamdaki uzaklaştırılmasında metalin etkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Bunun için bazı reaksiyon enerjileri hesaplanmıştır. İlk olarak, metalin histidin 6 oligomerine olan koordinasyon enerjisi, denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı.

$$\Delta E_1 = E_{\text{His6M}} - E_{\text{His6}} \quad (3.1)$$

Denklem 3.2, amino asidin metal içeren histidin oligomerine bağlanma enerjisini hesaplamak için kullanılır.

$$\Delta E_2 = E_{\text{His6ssM}} - E_{\text{His6M}} \quad (3.2)$$

Metalik histidin 6 oligomerine amino asit eklendikten sonra, metal çıkarma enerjisi denklem 3.3 kullanılarak hesaplandı.

$$\Delta E_3 = E_{\text{His6ssM}} - E_{\text{His6ss}} \quad (3.3)$$

Tablo 3.4: YFT hesaplamalarına göre amino asidin histidin oligomerine bağlanma enerjisi.

Denklemler	Birim	Enerji
ΔE_4	a	Au
		Kcal/mol
	g	Au
		Kcal/mol
	ag	Au
		Kcal/mol
	ga	Au
		Kcal/mol

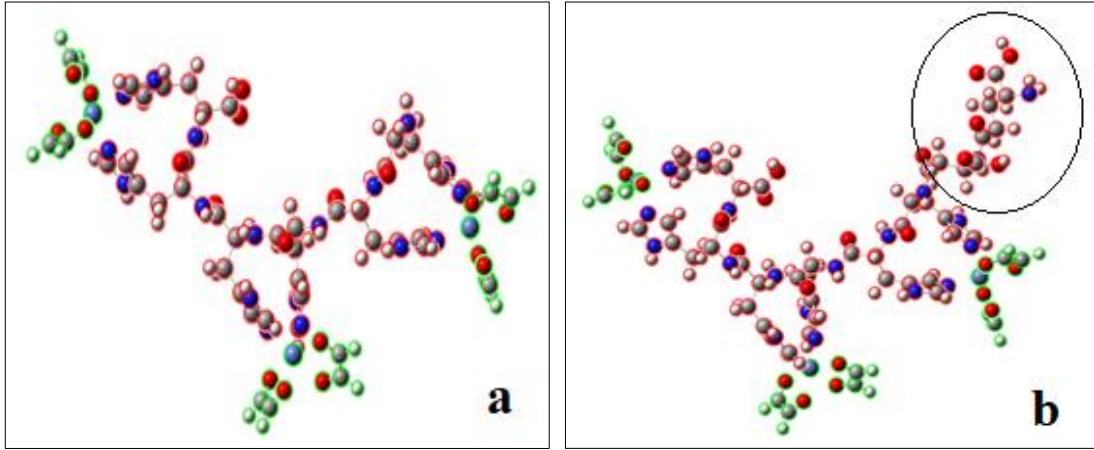
Denklem 3.4 kullanılarak, aminoasit ilavesinden sonra metal olmayan Histidin 6 oligomerinin amino asit farkını gösterir.

$$\Delta E_4 = E_{\text{His6ss}} - E_{\text{His6}} \quad (3.4)$$

3.1.8 BSSE (Temel Set Süperpozisyon Hatası) optimizasyonları

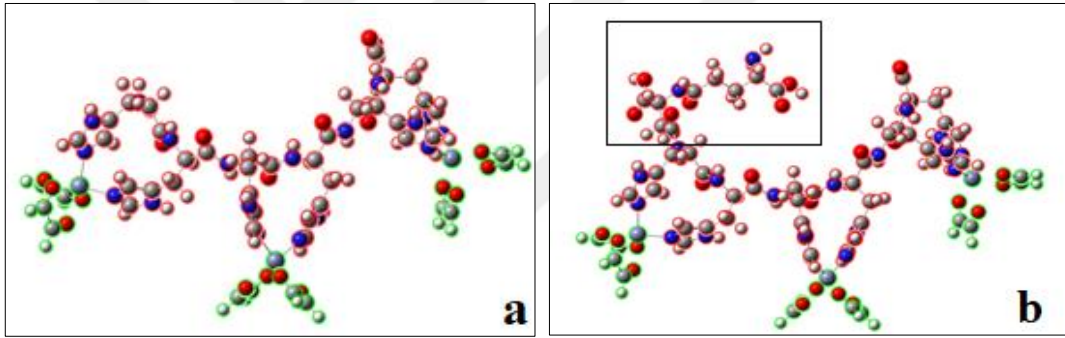
His₆M₃ yapıları ve His₆M₃ – AA yapıları için BSSE hesaplamaları yapılmıştır. His₆M₃ – AA yapılarından sadece Aspartik asit + Glutamik asit bağlı yapı için BSSE hesaplaması yapılmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda iki farklı yapı için oluşan farklılık incelenmiştir.

3.1.8.1 His₆Ni₃ için BSSE hesaplamaları



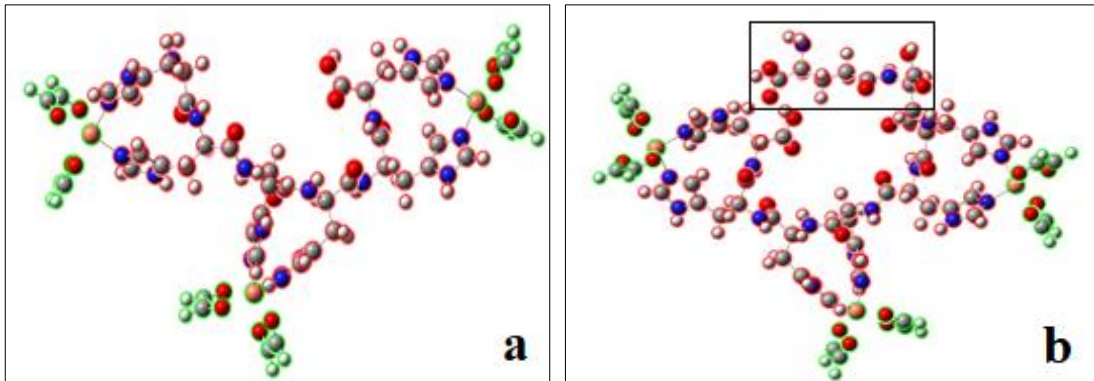
Şekil 3.10: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₆Ni₃ **b)** His₆Ni₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) yapılarının BSSE optimizasyonlarıdır.

3.1.8.2 His₆Zn₃ için BSSE hesaplamaları



Şekil 3.11: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₆Zn₃ **b)** His₆Zn₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) yapılarının BSSE optimizasyonlarıdır.

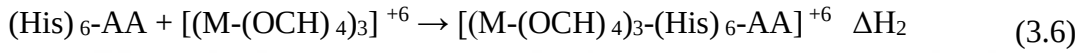
3.1.8.3 His₆Cu₃ için BSSE hesaplamaları



Şekil 3.12: Şekilde gösterilen numaralar **a)** His₆Cu₃ **b)** His₆Cu₃ – (Aspartik asit + Glutamik asit) yapılarının BSSE optimizasyonlarıdır.

Tablo 3.5: Tabloda His₆M₃ ve His₆M₃ – AA yapısının BSSE enerjileri gösterilmektedir.

	Kompleksleşme Enerjisi (BSSE)(Kcal/mol)		
	Ni	Cu	Zn
His ₆ M	-737,6	-467,4	-454,4
His ₆ MAA	-749,4	-474,7	-463,0
Farklılık	-11,8	-7,3	-8,6



Eşitlik 3.5 ve 3.6’ da verilen değerler tablo 3.1 ve tablo 3.2’deki değerler kullanılarak hesaplandığında tablo 3.6’daki gibi sonuçlar elde edilmektedir.

Tablo 3.6: Eşitlik 3.5 ve 3.6’ da verilen eşitliklere göre oluşan ΔH_1 ve ΔH_2 enerjileri.

Metal	ΔH_1 (kcal/mol)	ΔH_2 (Kcal/mol)
Ni	-233,9	-209,4
Cu	-186,2	-160,6
Zn	-130,4	-105,3

3.1.9 Çokluk hesapları

Optimize yapıların hangi çokluk değerlerinde daha kararlı olduğunu tespit etmek için Nikel ve Bakır atomlarının çokluk değerlerinde değişiklikler yapılarak enerji farklılıklarına bakılmıştır. Çinko atomu bu değişikliklerden etkilenmeyecektir. Çünkü orbitalleri tam olan çinko atomunun çokluk değeri singlettir (1). Nikel atomu ise singlet (1), triplet (3) gibi farklı çokluk değerleri alabilmektedir. Aynı şekilde bakır atomu da doublet (2) ve kuartet (4) çokluk değerlerini alabilmektedir.

Tablo 3.7: Nikel ve Bakır atomu için farklı çokluk değerleri.

Kompleks Enerji (Au)			
	Metal	Ni	Cu
Çokluk	Singlet	-8801,3418	-
	Dublet	-	-9197,7598
	Triplet	-8801,3838	-

Tablo 3.7 (devam) : Nikel ve Bakır atomu için farklı çokluk değerleri.

Çokluk	Kompleks Enerji (Au)		
	Metal	Ni	Cu
	Kuartet	-	-9197,7635

3.1.10 Frekans hesaplamaları

Yapıların kararlı halde olup olmadığının kontrol etmek için frekans hesaplamaları her yapı için yapılmıştır ve sonuçlarda negatif frekans bulunmamıştır.

	Mode #	Frequency	Infrared
1	1	5.44	2.4265
2	2	7.46	4.1182
3	3	9.01	2.2477
4	4	9.36	4.2435
5	5	12.51	2.2909

Şekil 3.13: Gaussian 6.0 [14] programı frekans hesabı program çıktısı.

3.1.11 Metaller için baz seti karşılaştırması

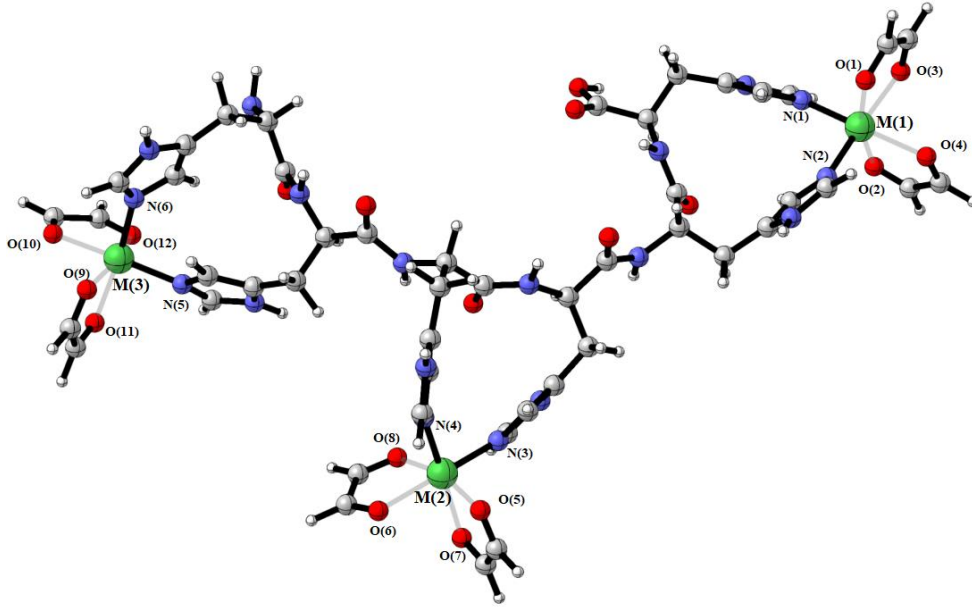
Metal atomları için iki farklı baz seti karşılaştırılmıştır. İlk yöntem SDD ve ikinci yöntem ise her metal için ayrı kullanılan baz setleri arasında karşılaştırma yapılmıştır (Tablo 3.8). Her metal için ayrı baz setleri internet sitesi üzerinden çekilmiştir [33].

Tablo 3.8: Baz seti karşılaştırmaları.

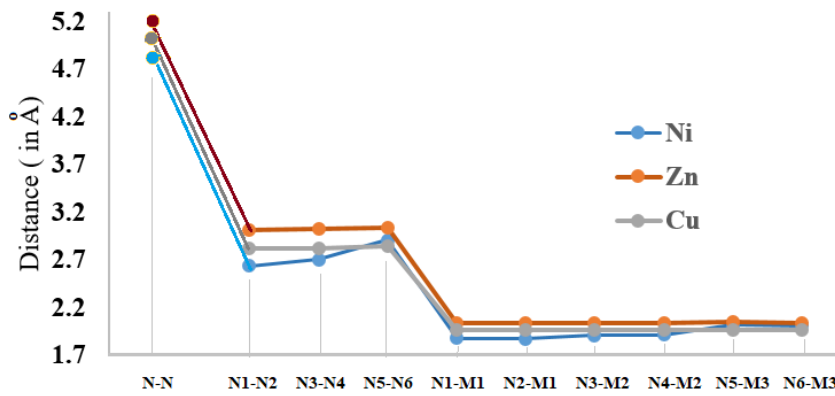
Metal sayısı	Metal	SDD/ 6-31G+** (Au)	SDD/ 6-311G+** (Au)	SDD/ 6-311G++** (Au)	B3LYP/ Metal için baz seti (Au)
1	Ni	-2301,361	-2301,775	-2301,775	-2984,724
1	Zn	-2480,891	-2481,325	-2481,325	-3255,728
1	Cu	-2385,494	-2385,907	-2385,907	-3116,864

3.1.12 Metal – Atom mesafeleri

Yapılan optimizasyon çalışmalarında hem metalli hekza histidin yapısının hem de metallsiz hekza histidin yapısında bulunan imidazol halkasındaki azot (N) atomlarının optimizasyon ve yapıya metal eklenmesi ile elde edilen mesafe değişimleri incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda aşağıdaki tablo (Tablo 3.9) ve grafikler (Şekil 3.15) elde edilmiştir.



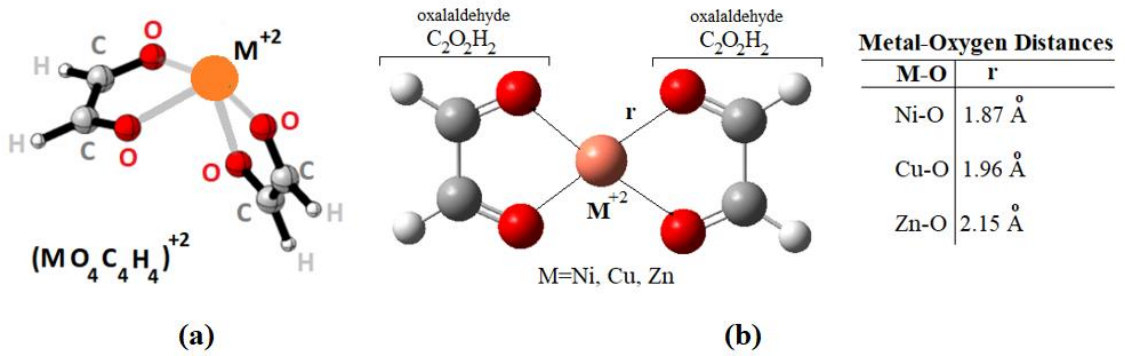
Şekil 3.14: Hekza histidin yapısında bulunan atom mesafeleri ve numaralandırmaları.



Şekil 3.15: Tablo 3.9 kullanılarak oluşturulan 3 farklı metal için olan mesafe grafiği.

Tablo 3.9: Metalsiz ve 3 farklı metal için metallerin imidazol halkalarında bulunan azot (N) atomlarına olan uzaklık.

Bağ Uzunluğu (Å)				
Atomlar	Ni	Zn	Cu	Metalsiz
N(1)-N(2)	2,6283	3,0042	2,8122	4,8130
N(3)-N(4)	2,6941	3,0206	2,8123	8,0174
N(5)-N(6)	2,8959	3,0228	2,8371	5,1416
N(1)-M(1)	1,8659	2,0288	1,9511	-
N(2)-M(1)	1,8642	2,0302	1,9583	-
N(3)-M(2)	1,8997	2,0270	1,9536	-
N(4)-M(2)	1,9036	2,0324	1,9547	-
N(5)-M(3)	2,0042	2,0379	1,9504	-
N(6)-M(3)	1,9991	2,0327	1,9575	-



Şekil 3.16: Metal – Rezin sisteminin model yapısı, **a)** yan görünüm **b)** üstten görünümü.

Saflaştırma deneylerinde en yaygın kullanılan katyonlar Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} ’ dir. Çalışmalarda bitişik histidin birimlerinin imidazol halkalarında bulunan nitrojen atomları ve reçineleri taklit eden oksalaldehit gruplarında bulunan 4 oksijen atomu ile metal katyonumuz Şekil 3.16’ de görüldüğü üzere hekzahedral bir koordinasyon yapmaktadır.

3.1.13 NBO, ESP yük ve HOMO – LUMO çalışmaları

Elde edilen optimize yapılar üzerinde metal etkisinin ne olduğunu daha iyi anlayabilmek için ve metal katyonu üzerinde bulunan +2 yükün hangi atomlara katkıda

bulunduğunu tespit edebilmek için NBO, ESP ve HOMO – LUMO çalışmaları yapılmıştır.

3.1.13.1 NBO ve ESP yük tespiti çalışmaları

His₆M₃ yapılarının her birine NBO ve ESP yük hesaplaması yapılmıştır. Bu hesaplamalar ile metal atomunun üzerindeki yük dağılımlarının nasıl olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.10: Metalsiz ve 3 farklı metal için metallerin imidazol halkalarında bulunan azot (N) atomları üzerindeki yük dağılımı.

NBO Yükleri					ESP Yükleri			
Atom	Ni	Cu	Zn	Metalsiz	Ni	Cu	Zn	Metalsiz
N(1)	-0,632	-0,642	-0,681	-0,577	-0,239	-0,117	-0,292	-0,315
N(2)	-0,632	-0,642	-0,680	-0,549	-0,274	-0,127	-0,381	-0,611
M(1)	1,185	1,194	1,354		0,925	0,649	1,015	
N(3)	-0,634	-0,638	-0,682	-0,560	-0,208	-0,220	-0,283	-0,511
N(4)	-0,633	-0,638	-0,683	-0,538	-0,288	-0,310	-0,437	-0,599
M(2)	1,184	1,186	1,355		0,891	0,870	1,051	
N(5)	-0,633	-0,642	-0,682	-0,554	-0,224	-0,190	-0,320	-0,640
N(6)	-0,636	-0,645	-0,685	-0,550	-0,301	-0,2	-0,382	-0,508
M(3)	1,184	1,191	1,353		0,884	0,737	1,048	

Tablo 3.11: Alıcı(Acceptor) ve verici(Donor) olarak metallerin etkileşim enerjileri (Kcal/mol).

NBO Etkileşim Enerjisi (Kcal/mol)			
Metal	Alıcı	Verici	Farklılık
Ni	1269	198	1071
Cu	1350	413	937
Zn	958	90	868

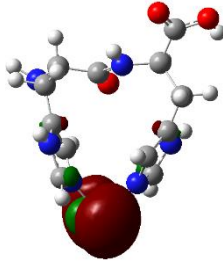
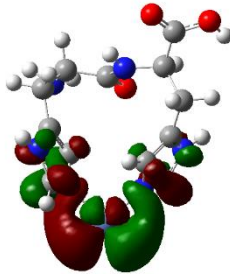
Tablo 3.12: His₆M yapısına sahip 3 farklı metal için oksijen atomlarına ait NBO ve ESP Yükleri.

	NBO Yükleri (esu)			ESP Yükleri (esu)		
	Ni	Cu	Zn	Ni	Cu	Zn
O(1)	-0,516	-0,484	-0,525	-0,375	-0,382	-0,320
O(2)	-0,511	-0,533	-0,524	-0,340	-0,290	-0,395
O(3)	-0,512	-0,533	-0,521	-0,340	-0,292	-0,395
O(4)	-0,516	-0,482	-0,522	-0,360	-0,375	-0,321
O(5)	-0,515	-0,492	-0,523	-0,365	-0,368	-0,335
O(6)	-0,510	-0,528	-0,525	-0,328	-0,339	-0,399
O(7)	-0,512	-0,529	-0,522	-0,342	-0,344	-0,397
O(8)	-0,516	-0,492	-0,518	-0,358	-0,369	-0,334
O(9)	-0,515	-0,481	-0,518	-0,356	-0,379	-0,345
O(10)	-0,511	-0,530	-0,526	-0,334	-0,302	-0,403
O(11)	-0,512	-0,535	-0,525	-0,339	-0,310	-0,395
O(12)	-0,516	-0,484	-0,520	-0,346	-0,372	-0,318

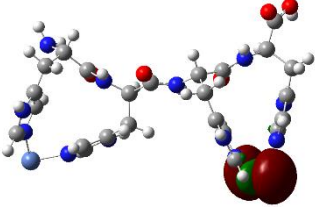
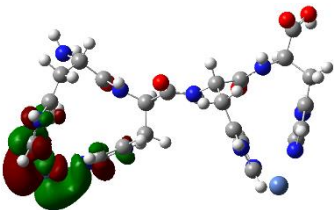
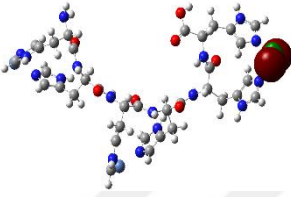
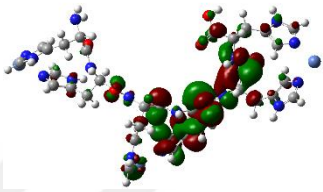
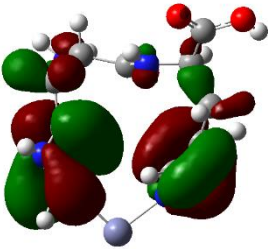
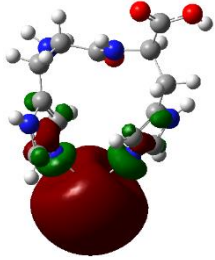
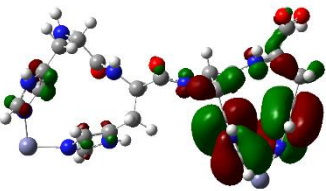
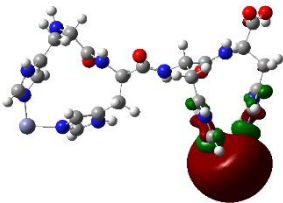
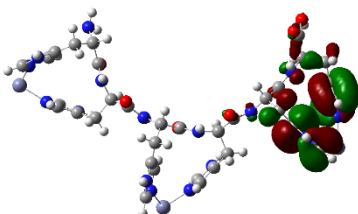
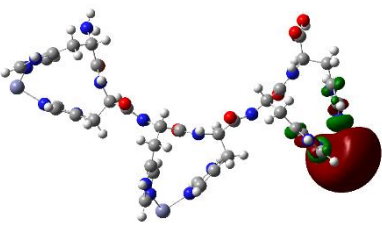
3.1.13.2 HOMO – LUMO çalışmaları

Yapılan NBO ve ESP çalışmalarından sonra yük transferinin yönünü tespit etmek adına HOMO – LUMO çalışmaları Gaussian 6.0 [14] uygulaması kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmalar ile farklı uzunluktaki histidin oligomerlerinin metal katyonu ile etkileşimi sonucu yük transfer yönleri tespit edilmiştir.

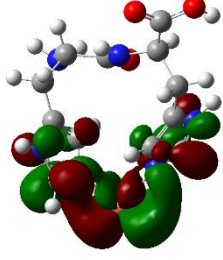
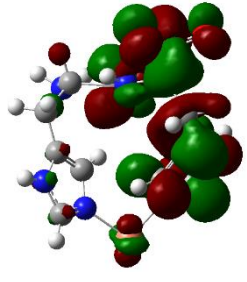
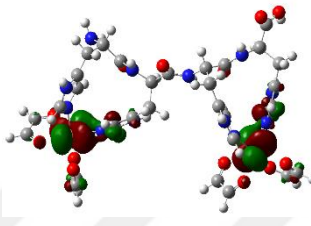
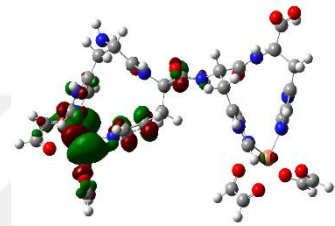
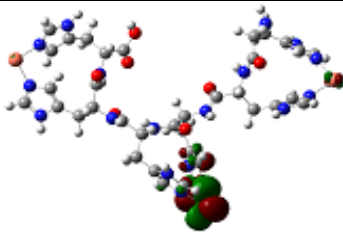
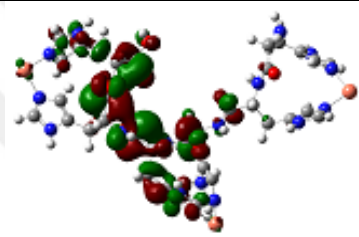
Tablo 3.13: 2, 4 ve 6 histidinli yapıların HOMO - LUMO gösterimi.

Metal	Histidin sayısı	HOMO	LUMO
Ni	2		

Tablo 3.13 (devam) : 2, 4 ve 6 histidinli yapıların HOMO - LUMO gösterimi.

Metal	Histidin sayısı	HOMO	LUMO
Ni	4		
	6		
Zn	2		
	4		
	6		

Tablo 3.13 (devam) : 2, 4 ve 6 histidinli yapıların HOMO - LUMO gösterimi.

Metal	Histidin sayısı	HOMO	LUMO
Cu	2		
	4		
	6		

3.2 Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Elde edilen optimize His₆M₃ yapıları moleküler kenetlenme çalışmalarında kullanılmak üzere bir ligand gibi hazırlanmıştır. Hedef protein olarak Şekil 2.9’ da gösterilen 1BNA yapısı kullanılmıştır. Çalışmamızda hedef protein üzerinde ligandımızın hangi bazlardan ve DNA’nın hangi oluklarından bağlandığını görmeyi hedefledik. Metalsiz His-tag yapısı ve 3 farklı metal ile optimize edilmiş His-tag yapısı kullanılarak kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Ligand hazırlama

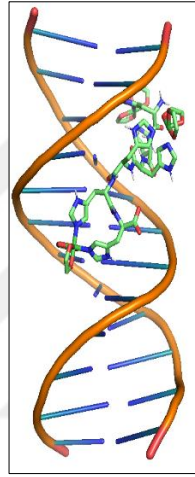
Zn, Ni, Cu ile üç farklı Histidin etiketinin 3 boyutlu yapısı kuantum mekanik çalışmalar sonucunda elde edilmiştir. Yapıya Polar hidrojen atomları varsayılan olarak eklenmiştir. İmidazol halkasının protonasyon durumu ZINC [35] veri tabanındaki verilere göre ayarlanmıştır.

3.2.2 Protein hazırlama

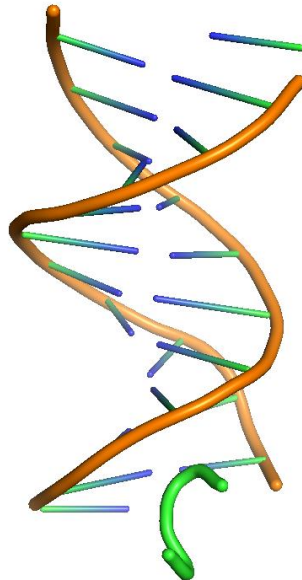
Reseptör olarak bir insan DNA fragmanı olan 1BNA yapısı tercih edilmiştir. Bu yapıdaki su molekülleri silinerek hidrojen atomları eklendi ve ızgara kutusu 1BNA yapısını kapsayacak şekilde oluşturulmuştur.

3.2.3 Kenetlenme prosedürü

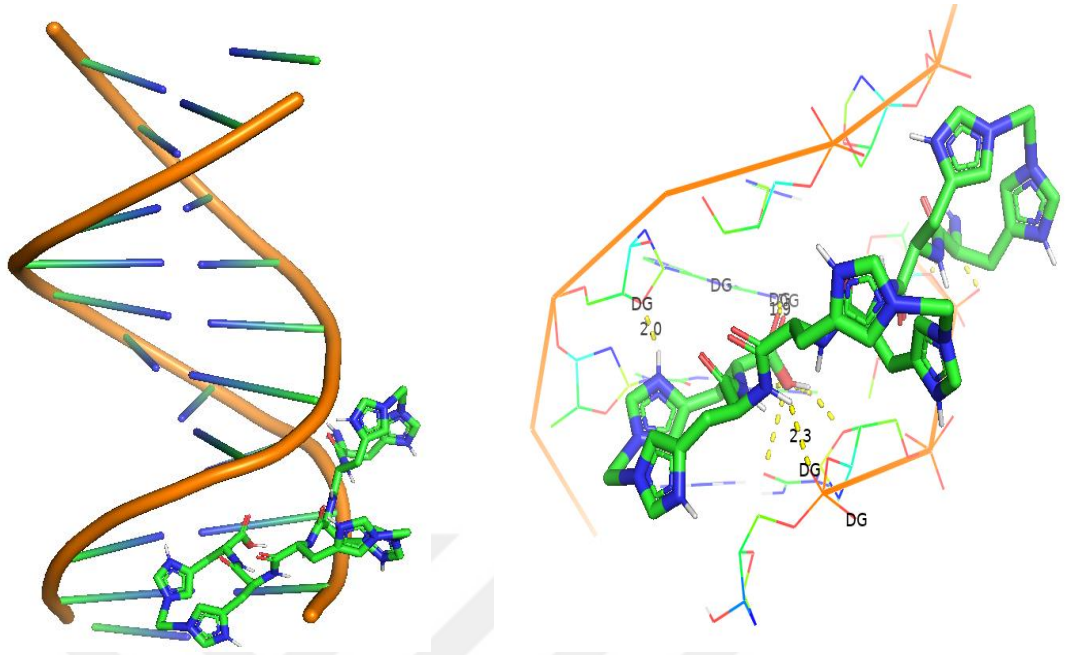
Tüm yanaşma hesaplamaları AutoDock Vina 1.1.2 [36] ile yapılmıştır. Elde edilen yerleştirme skorları, Kcal/mol birimleri cinsinden Gibbs serbest bağlanma enerjisi olarak ifade edilmiştir. En iyi kümelenmiş veriler içinde en uygun bağlanma enerjisine sahip kenetlenme pozı seçilmiştir.



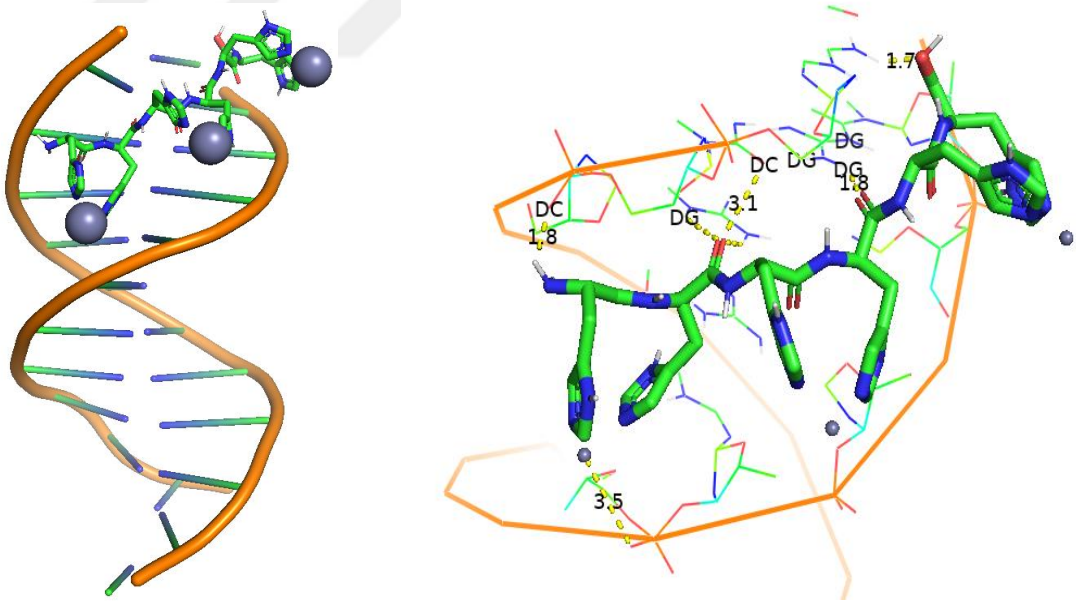
Şekil 3.17: Temsili kenetlenme yapısı.



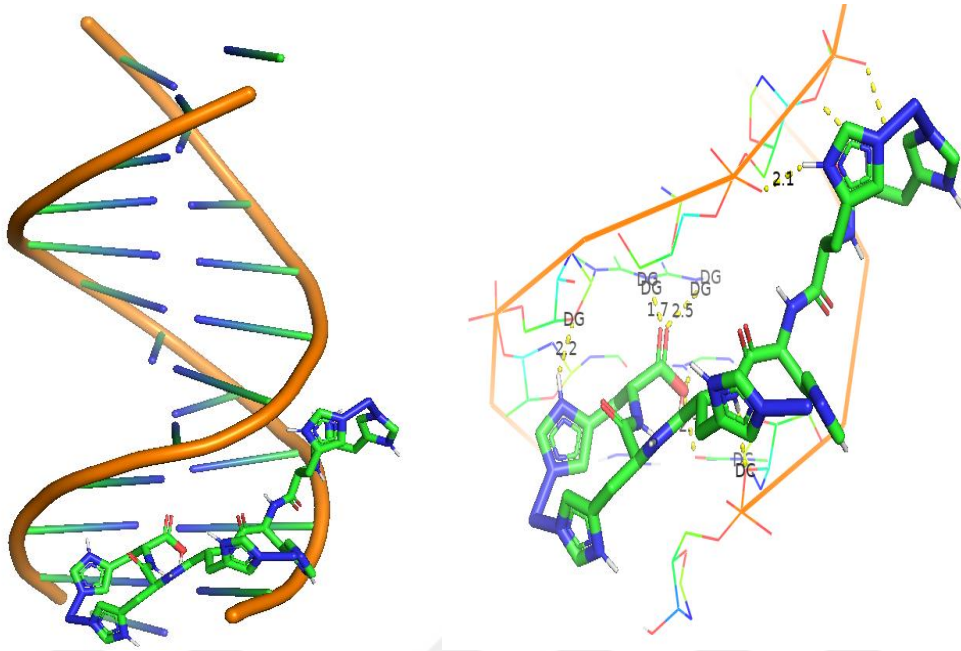
Şekil 3.18: Metal bulundurmayan His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.



Şekil 3.19: Bakır metali içeren His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.



Şekil 3.20: Çinko metali içeren His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.



Şekil 3.21: Nikel metali içeren His-tag yapısının 1BNA yapısına kenetlenmesi.

Tablo 3.14: 4 farklı yapının 1BNA dodokomer yapısına bağlanma enerjileri verilmiştir.

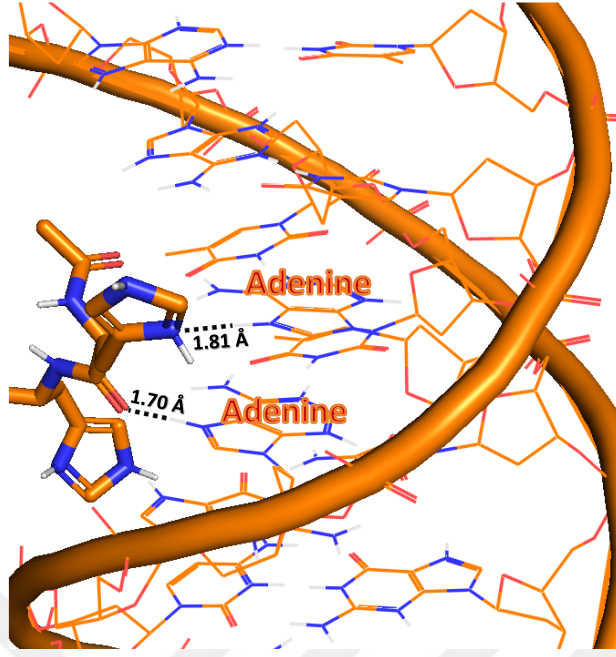
	His₆Ni₃	His₆Zn₃	His₆Cu₃	His₆
Bağlanma Enerjisi (Kcal/mol)	-9,7	-6,95	-9,1	+2,2

3.3 Moleküler Dinamik Çalışmaları

Yapıların simülasyonları bölüm 2.3' de bahsedilen koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Metal içermeyen kompleksin moleküler dinamik çalışması

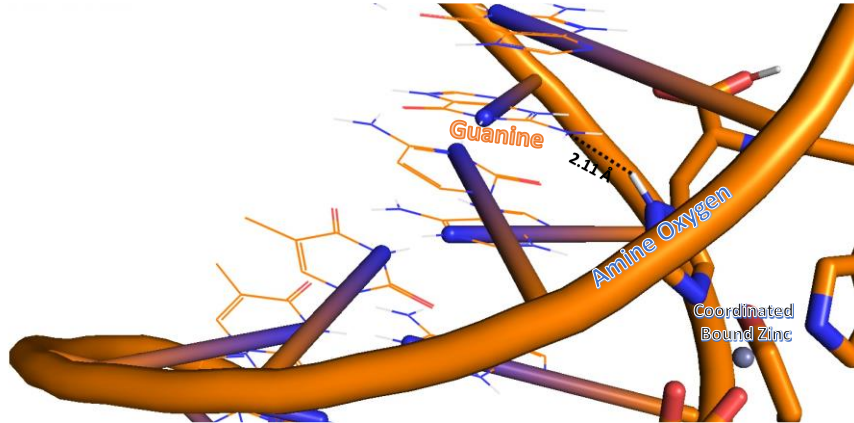
Şekil 3.22'de görülebileceği gibi, pH 7,4 fizyolojik koşullar altında herhangi bir metal koordinasyonu olmadan Oligo-Histidin etiketi, bağlanma modu için 1BNA'nın kesinlikle büyük oluk alanını seçer ve bölge seçici olarak Adenin'e çok güçlü bir şekilde bağlanır. Bağlanma enerjisi -8,9 kcal/mol'dür ve bu da Adenin'e karşı güçlü bir yakınlığı olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.22: Herhangi bir metalokompleks içermeyen Oligo-Histidin, ana oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanır, birden fazla Adenin nükleotidini bölge seçici olarak seçer.

3.3.2 Çinko içeren kompleksin moleküler dinamik çalışması

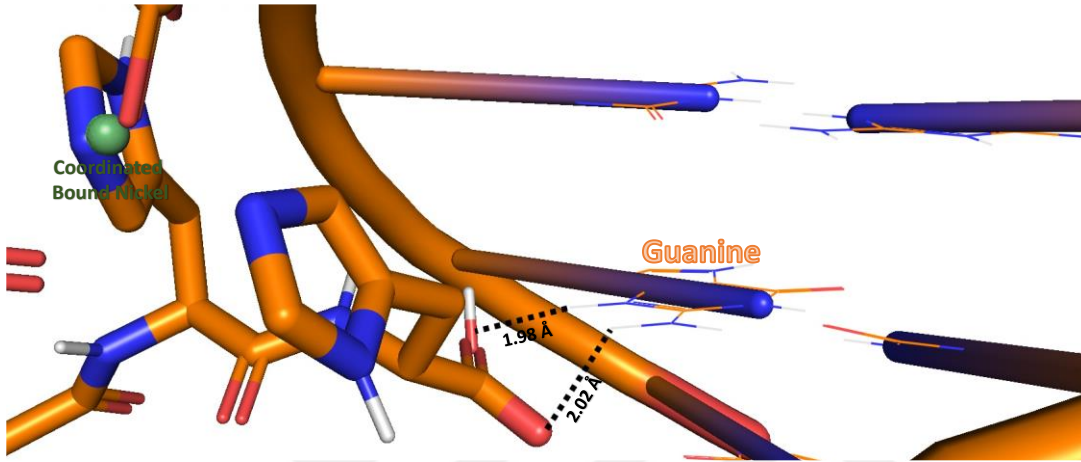
Küme analizinde, en çok birikmiş Hidrojen bağlı pozlar bize Şekil 3.23'deki gibi Histidinin amin grubunun küçük oluk bağlanması ve Guanin nükleotid bölgesel seçiciliği verilerini verir. Hidrojen bağları 2,11 Å mesafe civarında birleşir ve fonksiyonel grupların bağlanma enerjisi -9,5 kcal/mol civarındadır. Sonuçlardan anlaşılacağı gibi, metal kompleksinin eklenmesiyle bağlanma modu değişir ve nükleotid bölgesel seçiciliği de değişir.



Şekil 3.23: Çinko metalokompleksli Oligo-Histidin, küçük oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanıyor ve bölge seçici olarak Guanin nükleotidini seçer.

3.3.3 Nikel içeren kompleksin moleküler dinamik çalışması

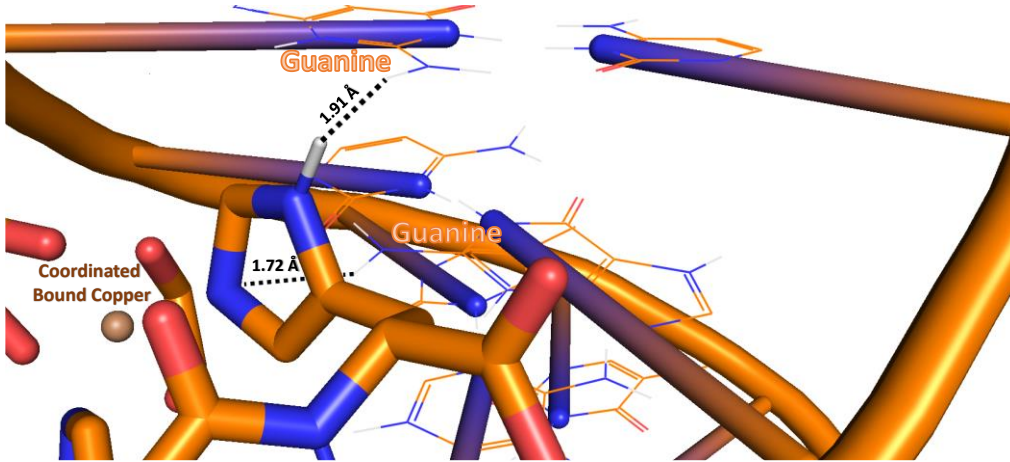
-13,5 kcal/mol bağlanma enerjisine sahip olan Nikel metalokompleks, karboksilik grubun Amin alanı yerine Guanin bağlanması haricinde yüksek hassasiyetle bölgesel seçici olarak Guanin nükleotidini seçer (Şekil 3.24). Nikel, Oligo-Histidin moleküler yapısını Nitrojenler yerine Oksijenler yoluyla Hidrojen bağları oluşturmaya zorlar. Hidrojen bağları mesafeleri kabaca 1,98 ve 2,02 Å civarındadır.



Şekil 3.24: Nikel metalokompleksli Oligo-Histidin, küçük oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanır ve bölge seçici olarak Guanin nükleotidini seçer.

3.3.4 Bakır içeren kompleksin moleküler dinamik çalışması

Bakır kompleksi, yerleştirmelerin -10,8 kcal/mol'ün üzerinde olduğu ve pozların Guanin'i diğer nükleotid türlerine göre kesinlikle tercih ettiği ve aslında çoklu Guanin bağlanmasının Nikel bazlı sonuçlara kıyasla baskın olduğu çok net bir küme verisine sahiptir. Hidrojen bağları 1,72 Å ve 1,91 Å civarındaydı ve 1BNA'nın küçük oluğundan bağlanma gerçekleşmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25: Bakır metalokompleksli Oligo-Histidin, küçük oluk alanı yoluyla 1BNA'ya bağlanır ve bölgesel seçici olarak birden fazla Guanin nükleotidini seçer.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Hekza histidil kompleksi içeren metalin optimize edilmiş yapısı Şekil 3.14' de gösterilmektedir. Metal katyonu, ikisi histidin kalıntılarının imidazol halkalarının nitrojenleriyle ve dördü reçinenin oksijenleriyle olmak üzere altı bağ yapar. Hesaplamaların kolaylığı açısından reçineler model yapılarında oksalaldehit gruplarıyla temsil edilmiştir. Ticari nitrilotriasetik asit (NTA) reçinesi daha karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir, ancak metal katyonlarını benzer şekilde koordine eder, dört hidrojen bağı [37] oluşturmak için üç oksijen ve bir nitrojen kullanır, bu da bu çalışmanın amaçları açısından oksalaldehit yaklaşımını temsil eder. Hekza histidin koordineli Metal-NTA reçinesinin şematik gösterimi Şekil 1.6'da gösterilmektedir.

Komplekslerin optimizasyonu sırasında mümkün olan tüm çokluk durumları dikkate alınmış ve enerji hesaplamaları için en düşük enerji yapıları seçilmiştir. Tablo 3.7'de görüldüğü üzere nikel ve bakır atomu için farklı çokluk değerleri optimizasyon sırasında denenmiştir. Bu denemelerden elde edilen sonuca göre çokluk değeri artırıldığında yapıların kararlılık halinin arttığı görülmüştür. Çinko atomunda çokluk değeri değiştirme söz konusu değildir. Bunun sebebi çinko atomunun tüm orbitalleri doludur. Bu nedenle elektron transferi bir sonraki orbitale yapılamayacaktır. Çinko atomu bu nedenle sadece singlet yapıda bulunabilmektedir. Tablo 3.8'de ise optimizasyonlar farklı baz setleri ve farklı yöntemlerle denenmiştir. Bu denemeler sonucunda metal içeren yapılar için gen anahtar kelimesi ile kullanılan 6-31G** düzeyindeki baz setinin daha kararlı bir yapı oluşturduğu sonucuna varılmıştır ve metal içeren tüm yapılar bu baz seti ile optimizasyonları yapılmıştır. Metal yokluğunda iki imidazol halkasının N atomları arasındaki mesafe 2,6 Å- 3,0 Å arasındadır. Bununla birlikte, Şekil 3.14'de görüldüğü gibi metal koordinasyonu belirli bir tür simetri gerektirir ve metal (M) – N imidazol mesafeleri 1,9 Å- 2,0 Å arasında ve metalin türünden neredeyse bağımsız olarak dalgalanır (Şekil 3.15). Metal içermeyen histidin yapılarında imidazol halkalarının birbirinden daha uzakta olduğu görülmektedir (Şekil 1.4). Ancak metaller imidazol halkalarındaki nitrojen atomlarıyla koordine edildiğinde

nitrojen atomları arasındaki bağ uzunlukları 4,8-8,0 Å'den 2,6-3,0 Å'a kadar düşmektedir.

Metallerin koordine ettiği metal atomları ve nitrojen atomları üzerindeki kısmi yükler, metal taşıyan reçineye koordine edilen hekza histidin üzerindeki elektron transferinin yönünü açıklamak için NBO ve ESP olmak üzere iki farklı yük yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 3.10). Azot atomlarının kısmi yükleri daha az negatif hale gelirken, metal üzerindeki +2 yükü daha az pozitif hale gelir. Yüklerdeki değişiklikler, elektronların bazik nitrojenin yalın çiftlerinden d-orbitallerine, oradan da metal atomlarına aktarıldığını göstermektedir. Üzerinde en yüksek pozitif yüke sahip çinkonun, biraz daha yüksek iyon yarıçapı nedeniyle imidazol halkalarıyla daha zayıf etkileşime sahip olduğu görülüyor. Nikele kıyasla daha yumuşak (soft) metaller olan bakır ve çinko, sırasıyla neredeyse doldurulmuş ve tamamen doldurulmuş 3 boyutlu alt kabuklara sahiptir. Sert (hard) metal-sert baz komplekslerinin, yumuşak metal-sert baz komplekslerinden daha stabil olduğu bilinmektedir. Genel olarak metal komplekslerinin stabilitesi, iki değerlikli metal katyonunun yarıçapı ile ters orantılıdır. Bakır ve çinkoya göre en küçük iyon yarıçapına sahip olan nikelin, temel imidazol nitrojeni sayesinde histidin ile daha kararlı metal kompleksi oluşturması beklenmektedir. İmidazol siklik aromatik yapıya sahiptir. Metal iyonunun koordine edildiği nitrojen atomu, aromatik sistemin parçası olmayan yalnız çiftlere sahiptir, dolayısıyla baziktir ve elektron donörü olarak görev yapmaktadır. Elektronlar bazik nitrojenin yalnız çiftlerinden metal d-orbitallerine aktarılır. Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} 'dan en sert asittir ve bazik N atomu aracılığıyla histidinin imidazol kısmı ile en kararlı kompleksi oluşturur. NBO yüklerine göre pozitif yük artan iyon yarıçapına göre artar. Bununla birlikte, ESP yükleri bakır üzerindeki yükün en az pozitif olduğunu tahmin ederek Cu^{+2} 'nin koordinasyon komplekslerindeki ek kovalent karakterini ortaya koymaktadır.

İki değerlikli metal katyonun kovalent olarak bağlandığı reçine parçasının oksijen atomlarındaki kısmi yükler, metalin cinsine göre önemli bir değişiklik göstermemektedir. Hesaplanan NBO ve ESP yükleri sırasıyla -0,51 ve -0,36 civarındadır. Atomlardaki maksimum yük farkları sırasıyla NBO ve ESP yöntemleriyle tahmin edilen 0,05 esu ve 0,1 esu'dur. Her iki yükleme yöntemi de metal ile reçinenin oksijenleri arasında önemli bir yük aktarımının olmadığını ortaya çıkarmıştır (Tablo 3.12).

Metal varlığının ve metal tipinin, etketin protein yakalama kabiliyeti üzerindeki etkisi, denklem 3.5 ve 3.6'da verilen reaksiyonların entalpisi hesaplanarak niceliksel olarak incelenmiştir.

İlk olarak His₆M ve His₆M-AA komplekslerinin M= Ni, Cu ve Zn için termodinamik kararlılığı hesaplanmıştır. Tablo 3.5, hekza histidin taşıyan metalin N terminaline kısa amino asit zincirinin (dimer) eklenmesiyle elde edilen stabilite olarak tanımlanan temel set süperpozisyon hatası (BSSE) düzeltilmiş kompleksleşme enerjilerini göstermektedir. His₆Ni₃'nin amino asit ekleme afinitesi, His₆Cu₃ ve His₆Zn₃'ninkinden daha yüksektir. His₆ ve His₆-AA'nın metalik reçineye afinitesi de denklemler (3.5 ve 3.6)'de verilen reaksiyonların entalpisi hesaplanarak tahmin edilmiştir.

Hesaplanan enerjiler, her iki reaksiyonun da ekzotermik olduğunu ve metal nikel olduğunda ΔH_1 ve ΔH_2 'nin (Tablo 3.6) en negatif olduğunu gösterdi. Metal türüne göre değişen reaksiyon entalpisinin azalan sırası (ΔH_1 ve ΔH_2), $Ni^{+2} > Cu^{+2} > Zn^{+2}$ şeklindedir.

Birinci sıradaki geçiş metalleri, bazılarla oluşturdukları komplekslerde genellikle elektron alıcısı olmalarına rağmen, metalden bazik atomlara elektronların geri bağışlanma olasılığı vardır. Geri bağlanmada metal, π -bağlayıcı moleküler yörüngeden imidazol halkaları üzerinde lokalize olan π^* -antibağlayıcı moleküler yörüngeye elektron bağışlar. Ni, Cu ve Zn metalleri için $[(M-(OCH)_4)_3-(His)_6]^{+6}$ kompleksinin elektron alıcı/verici özellikleri, yalnızca metallerin bağlı etkileşimleri dikkate alınarak NBO analizinden tahmin edilmiştir. Tablo 3.11, metallerin alıcı ve verici olarak kovalent veya elektrostatik olarak bağlı atomlarla etkileşimlerinin NBO enerjilerini göstermektedir. Metaller güçlü elektron alıcıları ve zayıf elektron vericileridir. Bakırın en yüksek etkileşim enerjisine sahip olması, bağlı etkileşimlerdeki kovalent yapısının bir başka göstergesidir. Verici etkileşim enerjileri daha baskın olan alıcı etkileşim enerjilerinden çıkarıldığında, farklılıklar Ni'nin koordinasyon kompleksindeki en güçlü etkileşimleri oluşturduğunu göstermektedir. Enerjinin azalan sırası, metallerin artan iyonik yarıçaplarıyla aynı sırayı takip eder.

Tablo 3.13'de, $[(M-(OCH)_4)_3-(His)_6]^{+6}$ komplekslerindeki HOMO ve LUMO sınır moleküler yörüngelerinin lokalizasyonları gösterilmektedir. İmidazolden Ni'ye elektron transferi, HOMO'nun imidazol halkasında lokalize olması, LUMO'nun ise metal ve reçine oksijenleri üzerinde lokalize olması nedeniyle metalin alıcı doğası ile tutarlıdır. Cu kompleksinde, HOMO imidazol halkasında lokalizedir ve LUMO sadece metalde değil kısmen imidazol halkasında lokalizedir, bu da elektronların metalik

bölgeden imidazol halkasına geri bağışlanma olasılığını gösterir. Zn durumunda, HOMO yalnızca imidazol halkaları üzerinde lokalize olur ve LUMO, Zn^{+2} metalinin tamamen dolu 3d yörüngesi nedeniyle yalnızca reçine kısmında lokalize olur.

Moleküler kenetlenme çalışmaları 3 farklı metal içeren yapı ve metal içermeyen yapı olmak üzere 4 farklı kompleks üzerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.17’de görüldüğü üzere His-tag yapısı 1BNA hedefine bağlanmamaktadır. Tablo 3.14’de moleküler kenetlenme sonucunda bağlanma enerjileri gösterilmektedir. Metal içermeyen kompleksin bağlanma enerjisi pozitif çıkmıştır. Bu enerji değeri yapının hedef makro moleküle bağlanmadığını göstermektedir.

Şekil 3.19’ da bakır kompleksinin kenetlenme yapısı gösterilmektedir. Bakır kompleksi, yerleştirmelerin -9,1 kcal/mol’ün üzerinde olduğu ve pozların Guanine bazını diğer nükleotid türlerine göre kesinlikle tercih ettiği ve aslında birden fazla Guanin bağlanmasının olduğu görülmektedir. Hidrojen bağları 2,0 Å ve 1,9 Å civarındadır ve 1BNA’nın makro molekülüne küçük oluk tarafından beğlendiği görülmüştür.

Şekil 3.20’de çinko kompleksinin kenetlenme yapısı gösterilmektedir. Yapılan küme analizinde hidrojen bağlı pozlar, oligo histidin grubu ile küçük oluk arasında gerçekleşmektedir. Ve bu yapı daha çok Guanin ve sitozin bazını tercih ettiği görülmektedir. Hidrojen bağları 1,8 Å mesafe civarındadır. Yapının bağlanma enerjisi -6,95 kcal/mol civarındadır.

Şekil 3.21’de nikel kompleksinin kenetlenme yapısı gösterilmektedir. -9,7 kcal/mol bağlanma enerjisine sahip olan Nikel metalokompleks yapı diğer metallerde olduğu gibi küçük oluğu tercih etmiştir ve nükleotit olarak Guanin nükleotitini tercih etmiştir. Hidrojen bağları mesafeleri kabaca 1,7 ve 2,2 Å civarındadır.

Kuantum mekanik çalışmalarda da olduğu gibi moleküler kenetlenme çalışmalarında da metal içeren kompleksin bağlanma enerjisi diğer metallere göre daha iyi çıkmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar literatürdeki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir [9]. Aynı zamanda metal içermeyen yapının bağlanma gerçekleştirmemesi geçiş metallerinin bağlanmaya etkisini göstermektedir.

Bölüm 3.3’de gösterilen simülasyon görüntülerinden ve bağlanma enerjilerinden de anlaşılabileceği üzere metal etkisi açıkça görülebilmektedir. Metallerin bağlanmaya etkisi simülasyon boyunca kuantum mekanik ve moleküler kenetlenme çalışmalarında olduğu gibi değişmemiştir ve Ni, Cu ve Zn olarak literatür bilgilerini destekleyen yönde sonuçlar elde edilmiştir.

5. SONUÇLAR

Hareketsizleştirilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC), hem akademik hem de endüstriyel amaçlar için yaygın olarak kullanılan önemli bir protein saflaştırma aracıdır. Bu işlem, rekombinant protein dizilerindeki Histidin etiketleri ile saflaştırma reçinesindeki iki değerlikli metal katyonu M^{+2} arasındaki spesifik bağlanma etkileşimine dayanır. Spesifik M^{+2} tipi, saf olmayan numunelerde hedef proteine karşı daha yüksek derecede seçicilik ve/veya afinite sağlayabilir ve dolayısıyla reçine seçimi, saflaştırılmış üründe istenen özellikler tarafından belirlenir. Nikel reçineleri, His-etiketli proteinlere karşı yüksek afiniteleri nedeniyle yaygın olarak kullanılır; bu, bir yakalama adımı olarak faydalıdır, ancak bunlar, numunelerin daha düşük seçiciliği ve daha düşük saflığı anlamına gelmektedir. Öte yandan Ni-reçinelerin bu kadar çok tercih edilmesinin nedeni belirsizliğini koruyor. Bu çalışma, saflaştırma reçinesinde M^{+2} olarak Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} 'nin His-etiketi bağlanma özelliklerine odaklanmaktadır. Sonuçlarımız, hesaplanan entalpi değişiklikleri ΔH_1 ve ΔH_2 'ye dayanarak nikelin üç metal arasında en yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermektedir; bu da Ni^{+2} reçinesinin hem His₆ hem de His₆-AA ile kompleksleşmeye karşı en yüksek afiniteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. NBO hesaplamaları tarafından niceliksel olarak tahmin edildiği üzere en yüksek etkileşim enerjisine sahiptir. Çalışmamız, iki değerlikli metallerin koordinasyon ve kompleksleşme davranışları hakkında daha fazla bilgi sağlayarak deneysel çalışmalarda en çok tercih edilen metalin neden nikel olduğunu doğrulanmıştır. Daha geniş bir çift değerlikli metal katyonları ve amino asit dizisini içeren daha ileri çalışmalar, potansiyel olarak daha yeni protein saflaştırma stratejilerine bilgi verebilir, bu etkileşimlerin hem afinitesini hem de özgüllüğünü geliştirebilir ve ek saflaştırma adımlarına olan ihtiyacı azaltabilir.

Kuantum mekanik çalışmalarla elde edilen bu sonuçlar moleküler kenetlenme ve moleküler dinamik çalışmaları ile desteklenmektedir. Elde edilen bu bilgiler bize His-tag yapısının protein saflaştırma aşamasında metal kompleks oluşturarak daha iyi bağlanabileceğini ve metal koordinasyonun su molekülleri yerine rezin molekülleri ile yapılabileceği gösterilmiştir.



KAYNAKLAR

- [1] **Akram, M., Asif, H. M., Uzair, M., Akhtar, N., Madni, A., Shah, S. M. A., Ul Hasan, Z., & Ullah, A.** (2011). Amino acids: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 3997–4000. <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- [2] **Wu, G.** (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37, 1-17.
- [3] **J. Watly, E. Simonovsky, R. Wiecek, N. Barbosa, Y. Miller, and H. Kozłowski,** (2014).“Insight into the Coordination and the Binding Sites of Cu^{2+} by the Histidyl-6-Tag using Experimental and Computational Tools,” *Inorg Chem*, vol. 53, no. 13, pp. 6675–6683, doi: 10.1021/ic500387u.
- [4] **Brownleader, M.** (2007). ProPur™: His-tagged protein purification made easy. *Nature Methods*, 4(2), i–ii. <https://doi.org/10.1038/nmeth1004>
- [5] **Song, Y., Zhan, J., Li, M., Zhao, H., Shi, G., Wu, M., & Fang, H.** (2022a). Enhancement of the Water Affinity of Histidine by Zinc and Copper Ions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3957. <https://doi.org/10.3390/ijms23073957>
- [6] **Franklin, L. M., Walker, S. M., & Hill, G.** (2020). A DFT study of isolated histidine interactions with metal ions (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in a six-coordinated octahedral complex. *Journal of Molecular Modeling*, 26(6), 116. <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04389-2>
- [7] **Watly, J., Simonovsky, E., Wiecek, R., Barbosa, N., Miller, Y., & Kozłowski, H.** (2014b). Insight into the Coordination and the Binding Sites of Cu^{2+} by the Histidyl-6-Tag using Experimental and Computational Tools. *Inorganic Chemistry*, 53(13), 6675–6683. <https://doi.org/10.1021/ic500387u>
- [8] **A. D. Becke,** (1993) “A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories,” *J Chem Phys*, vol. 98, no. 2, pp. 1372–1377, doi: 10.1063/1.464304.
- [9] **Flores, A. A., Falokun, O. S., Ilesanmi, A. B., Arredondo, A. V., Truong, L., Fuentes, N., Spezia, R., & Angel, L. A.** (2021). Formation of Co(II), Ni(II), Zn(II) complexes of alternative metal binding heptapeptides and nitrilotriacetic acid: Discovering new potential affinity tags. *International Journal of Mass Spectrometry*, 463, 116554. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2021.116554>
- [10] **Spiestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B.** (2015). *Purification of His-Tagged Proteins* (pp. 1–15). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>
- [11] **Hochuli, E., DoBELL, H., & Schac, A.** (n.d.). NEW METAL CHELATE ADSORBENT SELECTIVE FOR PROTEINS AND PEPTIDES CONTAINING NEIGHBOURING HISTIDINE RESIDUES. In *Journal of Chromatography* (Vol. 411).

- [12] **Sulkowski, E.** (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90068-X)
- [13] **Dennington, R., Keith, T. A., Millam, J. M., Semichem Inc., Shawnee M., KS,** (2016). GaussView, Version 6.
- [14] **Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A. V., Bloino, J., Janesko, B. G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H. P., Ortiz, J. V., Izmaylov, A. F., Sonnenberg, J. L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V. G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery, J. A., Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J.; Heyd, J. J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B., Fox, (2016). D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, Gaussian 16, Revision C.01.**
- [15] **Fan, J., Fu, A., & Zhang, L.** (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>
- [16] **Morris, G. M., & Lim-Wilby, M.** (n.d.). *Molecular Docking*. <http://www.biosolveit.de/FlexX>;
- [17] **Sevdagül Türkoğlu, Z., & Dereli Çalışkan, N.** (n.d.). *Moleküler Yanaştırma (Docking) Yöntemleri ve AutoDock'a Genel Bir Bakış*.
- [18] **Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., & Dickerson, R. E.** (1981). Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2179-2183.
- [19] **Mirjalili, S.** (n.d.). *Studies in Computational Intelligence 780 Evolutionary Algorithms and Neural Networks Theory and Applications*. <http://www.springer.com/series/7092>
- [20] **El-Mihoub, T. A., Hopgood, A. A., Nolle, L., & Battersby, A.** (n.d.). *Hybrid Genetic Algorithms: A Review*.
- [21] **Gelpi, J., Hospital, A., Goñi, R., & Orozco, M.** (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 37. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>
- [22] **Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O.** (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- [23] **Url-**
23<<https://www.ks.uiuc.edu/Training/Workshop/SanFrancisco/lectures/Wednesday-ForceFields.pdf>>, erişim tarihi 11.02.2024.
- [24] **González, M. A.** (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École Thématique de La Société Française de La Neutronique*, 12, 169–200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>

- [25] **Vega, C., Abascal, J. L. F., Conde, M. M., & Aragonés, J. L.** (2009). What ice can teach us about water interactions: a critical comparison of the performance of different water models. *Faraday Discuss.*, 141, 251–276. <https://doi.org/10.1039/B805531A>
- [26] **Url-26**<<https://www.uoxray.uoregon.edu/local/manuals/biosym/discovery/General/Dynamics/Ensembles.html>>, erişim tarihi 11.02.2024.
- [27] **Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J.** (2009b). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- [28] **K. J. Bowers et al.**, (2006). "Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters," *SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*, Tampa, FL, USA, pp. 43–43, doi: 10.1109/SC.2006.54.
- [29] **Parr, R. G.** (1983). *DENSITY FUNCTIONAL THEORY*. www.annualreviews.org
- [30] **Harrison, N. M.** (2003). An introduction to density functional theory. *Nato Science Series Sub Series III Computer and Systems Sciences*, 187, 45–70.
- [31] **Orio, M., Pantazis, D. A., & Neese, F.** (2009). Density functional theory. In *Photosynthesis Research* (Vol. 102, Issue 2, pp. 443–453). <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9404-8>
- [32] **Cramer, C. J.** (2013). *Essentials of computational chemistry: theories and models*. John Wiley & Sons.
- [33] **Pritchard, B. P., Altarawy, D., Didier, B., Gibson, T. D., & Windus, T. L.** (2019). New Basis Set Exchange: An Open, Up-to-Date Resource for the Molecular Sciences Community. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(11), 4814–4820. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00725>
- [34] **Kestner, N. R., & Combariza, J. E.** (2007). *Basis Set Superposition Errors: Theory and Practice* (pp. 99–132). <https://doi.org/10.1002/9780470125908.ch2>
- [35] **Irwin, J. J., & Shoichet, B. K.** (n.d.). *ZINC-A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. <http://chembank.med.harvard.edu>
- [36] **Trott, O., & Olson, A. J.** (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- [37] **Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., & Henco, K.** (n.d.). 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. In *Protocols for Gene Analysis* (pp. 371–388). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:371>
- [38] **Url-38**<<https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1228557/FULLTEXT01.pdf>>, erişim tarihi 11.02.2024.



EKLER

EK A : Nikel atomunun baz setlerini ve yöntemi gösteren girdi (input) dosyası.

EK B : Bakır atomunun baz setlerini ve yöntemi gösteren girdi (input) dosyası.

EK C : Çinko atomunun baz setlerini ve yöntemi gösteren girdi (input) dosyası.

EK A

```
%nproclinda=1
%nprocshared=12
%mem=16GB
# opt b3lyp/gen scrf=(iefpcm,solvent=water) scf=xqc
```

Title Card Required

[illegible]

Şekil A.0.1: Nikel metali içeren yapının girdi (input) dosyası.

EK B

```
%nproclinda=1
%nprocshared=12
%mem=16GB
# opt b3lyp/gen scrf=(iefpcm,solvent=water) scf=xqc
```

Title Card Required

[illegible]

Şekil B.0.2: Bakır metali içeren yapının girdi (input) dosyası.

EK C

```

%nproclinda=1
%nprocshared=12
%mem=16GB
# opt b3lyp/gen scrf=(iefpcm,solvent=water) scf=xqc

Title Card Required

6 1
C      3.91923700   -3.20879500   -1.00874500
C      3.12493500   -1.88529600   -1.09720300
O      3.03266300   -1.28757400   -2.17239700
N      2.48021600   -1.44415600    0.01728400
H      2.53757100   -1.93260500    0.90157700
C      1.56684900   -0.30362500   -0.02424800
C      0.40918300   -0.66631700    0.92950000
N      4.82163800   -3.25026500   -2.15064900
H      4.33515700   -2.91440400   -2.97748000
H      5.13074800   -4.20179300   -2.32892800
H      3.14165700   -3.99575200   -1.02804100
O      0.67429100   -1.01543400    2.07706700
C      4.71785100   -3.44655400    0.29733100
H      4.03688200   -3.50584500    1.15659000
H      5.16463800   -4.44657100    0.22130900
H      1.22624700   -0.20565500   -1.05836000
C      2.23388100    1.02327600    0.45072300
H      1.55219100    1.85246200    0.22051600
H      2.32898600    0.98298800    1.53974400
C      5.78943600   -2.43233400    0.57561100
C      6.34387200   -1.44184100   -0.18725600
N      6.40833800   -2.31033700    1.81321600
H      6.14609800   -1.23954100   -1.22696400

C H O N O
6-31g**
****
Zn      0
S      6      1.00
      0.8240094000D+05      0.1743328988D-02
      0.1237255000D+05      0.1335965991D-01
      0.2818351000D+04      0.6594364956D-01
      0.7945717000D+03      0.2294150985D+00
      0.2547232000D+03      0.4785452968D+00
      0.8713880000D+02      0.3537752977D+00
SP      6      1.00
      0.1732569000D+04      0.2361459089D-02      0.3963125053D-02
      0.4127149000D+03      0.3150177119D-01      0.3113411042D-01
      0.1336780000D+03      0.1272774048D+00      0.1363931018D+00
      0.5038585000D+02      -0.2145928081D-01      0.3501226604D+00
      0.2058358000D+02      -0.6197652235D+00      0.4623179622D+00
      0.8505940000D+01      -0.4590180174D+00      0.2004995027D+00
SP      6      1.00
      0.6936492000D+02      -0.4440098182D-02      -0.7689261805D-02
      0.2362082000D+02      0.7505253308D-01      -0.2997981924D-01
      0.1018471000D+02      0.2533111104D+00      0.7082410821D-01
      0.4334082000D+01      -0.2881897118D+00      0.4046140897D+00
      0.1810918000D+01      -0.7267052298D+00      0.4882324876D+00
      0.7148410000D+00      -0.2133439088D+00      0.1751969956D+00
SP      3      1.00
      0.2823842000D+01      0.4898545031D-01      -0.1586762981D+00
      0.1039543000D+01      0.2592794075D+00      0.8379326898D-01
      0.1432640000D+00      -0.1115711463D+01      0.9840546881D+00
SP      1      1.00
      0.4929600000D-01      0.1000000000D+01      0.1000000000D+01
D      3      1.00
      0.3370764000D+02      0.9262647815D-01
      0.9061106000D+01      0.4002979920D+00
      0.2738383000D+01      0.6896607863D+00
D      1      1.00
      0.7302940000D+00      1.00000000
F      1      1.00
      0.8000000000D+00      1.00000000
****

```

Şekil C.0.3: Çinko metali içeren yapının girdi (input) dosyası.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Alparslan Numan YILDIZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, Haliç Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Lisans** : 2021, Haliç Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği (ÇAP)

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Altınbaş Üniversitesi/Mühendislik Ve Mimarlık Fakültesi/Yazılım Mühendisliği Bölümü/10.11.2022

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Yıldız, A. N., Yurtsever, M., Ağar, S., Kasapbaşı, E. E.** (2023). DNA and EGFR Protein Docking of Hexahistidine. 9th International BAU Drug Design Congress 2023 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:8623732)
- **Yıldız, A. N., Ağar, S., Kasapbaşı, E. E., Yurtsever, M.** (2022). DNA Binding of Polyhistidine: A Molecular Docking Study. 13th Chemical Physics Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:8623722)