

**MEMBRAN PROTEİNLERİNE İYON VE LİGANT
BAĞLANMASININ SERBEST ENERJİ HESABI**

Murat ÇAVUŞ

**DOKTORA TEZİ
FİZİK**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2013
ANKARA**

Murat ÇAVUŞ tarafından hazırlanan “MEMBRAN PROTEİNLERİNE İYON VE LİGANT BAĞLANMASININ SERBEST ENERJİ HESABI” adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Akif ÖZBAY
Tez Danışmanı, Fizik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ
Tez Danışmanı, Mikro ve Nano Teknoloji Anabilim Dalı, TOBB ETÜ

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Fizik Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman ÖZÇELİK
Fizik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Akif ÖZBAY
Fizik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ
Mikro ve Nano Teknoloji Anabilim Dalı, TOBB ETÜ

Prof. Dr. Pervin ÜNAL CİVCİR
Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Doç Dr. Nevin AYTEMİZ
Kimya Anabilim Dalı, Süleyman Demirel Üniversitesi

Doç. Dr. Semran SAĞLAM
Fizik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet BAHAT
Fizik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Murat ÇAVUŞ

MEMBRAN PROTEİNLERİNE İYON VE LİGANT BAĞLANMASININ SERBEST ENERJİ HESABI

(Doktora Tezi)

Murat ÇAVUŞ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Temmuz 2013

ÖZET

Membran proteinleri, iyon kanalları, taşıyıcılar ve reseptörler, biyolojik olarak önemli proteinler arasındadır. Zira onlar hücrelerin çevreleri ile iletişimine izin verir. Dolayısıyla membran proteinleri hemen hemen bütün ilaçlara hedef durumundadır. Deneysel ve hesaplamalı bilimlerde son yıllarda ortaya çıkan gelişmeler membran proteinlerine olan ilgiyi daha da artırmıştır. Bu alanda mihenk taşı olan gelişme elbette membran proteinlerinin kristal yapısının elde edilmesi olmuştur. İlk olarak bakteriyel KcsA potasyum kanalının kristal yapısı elde edilmiş ve arkasından memelilere ait potasyum kanallarının kristal yapıları bulunmuştur. Yaklaşık bir on yıl sonra Glütamin Taşıyıcısının (GltPhT) kristal yapısı elde edilmiştir. Deneysel gelişmelere son olarak eklenen çalışma Na⁺ kanalının kristal yapısıdır (NavAb). Deneysel gelişmelere benzer, daha hızlı gelişmeler bilgisayar teknolojilerinde de görülmektedir. Paralel hesaplama algoritmalarının donanım teknolojilerindeki gelişmeleri izlemesi, moleküler modelleme ve simülasyon metotlarının benzer gelişmeler göstermesi membran proteinlerinde yapılan hesaplamalı çalışmaları yoğunlaştırmıştır.

Bu çalışmada membran proteinlerine örnek teşkil eden lösin (Leu) aminoasit taşıyıcısının ve NavAb iyon kanalının moleküler dinamik modellemesi yapılmıştır. Leu taşıyıcısında iyon bağlanma mekanizması serbest enerji metotları kullanılarak çalışılmıştır. Deneysel çalışmada verilen Na² bağlanma

pozisyonunun en derin potansiyelle, Na1 pozisyonunun ikinci derin ve Leu aminoasitinin en sığ potansiyelle bağlandığı gösterilmiştir. Açık bir Leu taşıyıcısına giren bir Na^+ iyonu ilk olarak Na2 bağlanma pozisyonunu dolduracak, arkasından ikinci Na^+ iyonu Na1 bağlanma pozisyonunu dolduracak ve en son olarak ta Leu aminoasiti bağlanacaktır. Deneysel çalışmalarda kapalı yapı bulunduğundan sadece iyon/substrat bağlanma süreci incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmını NavAb iyon kanalının moleküler dinamik modellemesi oluşturmuştur. Voltaj kapılı bakteriyel Nav kanalının kristal yapısı Payandeh tarafından 2011 yılında elde edildi. Voltaj kapılı sodyum kanalları aksiyon potansiyelini başlatması nedeniyle çok önemlidir. Bu kanalda yapı fonksiyon ilişkisinin anlaşılması için moleküler dinamik modelleme çalışması yapılmıştır. Serbest enerji metotları kullanılarak iyon bağlanmasının enerjisi çalışılmış, Na^+ iyonu için filtre içinde bağlanma pozisyonları ve bağlanma enerjileri elde edilmiştir. Deneysel verilerden Nav kanalının Cav kanalına benzer olduğu bilinmekte ve Nav kanalında Ca^{++} iyonu geçtiği gözlenmektedir. Bu çalışmada ayrıca Ca^{++} iyonunun Nav kanalında geçmesini anlamak için kanal filtresi boyunca Ca^{++} iyonu için PMF yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda Ca^{++} iyonunun Na^+ iyonu ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir bağlanma afinitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bunlardan yola çıkarak kanalda bir Ca^{++} iyonu varken Na^+ iyonunun kanal filtresinden geçişinin serbest enerji hesapları çalışılmış, Ca^{++} iyonunun kanalı tıkadığı gözlenmiştir.

Bilim Kodu : 202.1.018

Anahtar Kelimeler : LeuT, NavAb, moleküler dinamik, moleküler simülasyon, serbest enerji pertürbasyon, termodinamik integrasyon

Sayfa Adedi : 112

Tez Yöneticileri : Yrd. Doç. Dr. Akif ÖZBAY

: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ (II. Danışman)

**FREE ENERGY CALCULATION OF ION AND LIGAND BINDING TO
MEMBRANE PROTEINS**

(Ph. D. Thesis)

Murat ÇAVUŞ

**GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

July 2013

ABSTRACT

Membrane proteins, such as ion channels, transporters and receptors are biologically among the most important proteins because they allow the cells to communicate with their environments; they are the targets of most, and perhaps all, pharmaceuticals. Recent developments emerging in experimental and computational sciences in recent years increased the interest in membrane proteins significantly. Milestone of the development of this area, of course, has been to obtain the crystal structure of membrane proteins. Firstly crystal structure of a bacterial KcsA potassium channel was obtained and then the crystal structures of mammalian potassium channels were found. Nearly a decade later, the crystal structure of glutamate transporter (GltPhT) was obtained. The latest developments in the experimental study are obtaining of the crystal structure of Na channel (NavAb). Similar to experimental progress or even more rapid advances are seen in computer technologies. Developments of parallel computing algorithms in molecular modeling and simulation methods, following the hardware technologies, intensified the computational studies of membrane proteins.

In this study, molecular dynamics simulations of NavAb ion channel and leucine (Leu) transporter, which are examples of membrane proteins, were performed. Ion binding mechanism in the leucine transporters was studied by using free

energy methods. In the experimental study it was shown that Na2 binding site is found the deepest potential energy, and secondly deep potential energy is found in the Na1 binding site and the shallowest potential energy is found for the amino acid of Leu. Na ions entering into an open Leu transporter is going to occupy firstly the Na2 binding site and secondly the Na1 binding site and finally Leu is going to bind. Since closed structure exists, in experimental studies only ion/ligand binding process was investigated.

The second part of the study is molecular dynamics modeling of the NavAb ion channel. The crystal structure of the voltage-gated bacterial Nav channel was obtained in 2011 by Payandeh et al. Voltage-gated sodium channels is very important due to the onset of action potentials. Molecular dynamics modeling has been conducted to understand the structure-function relationship for this channel. Using free energy methods, energetics of ion binding is studied and the binding energies and positions were obtained for Na^+ ions in the filter. It has been known from the experimental data that Nav and Cav channels are similar and Ca^{++} ions are permeating in the Nav channels. A potential of mean force calculation is performed for Ca^{++} ion through the channel axis of the Nav. As a result of this study we observed Ca^{++} ions have a higher binding affinity than that Na^+ . Based on these findings, we studied the transport of Na^+ ion through the filter of the channel when there is Ca^{++} ion in it was studied with potential of mean force and it was observed that Ca^{++} ion blocks the channel.

Science Code : 202.1.018

Key Words : LeuT, NavAb, molecular dynamics, molecular simulation, free energy perturbation, thermodynamic integration

Page Number : 112

Supervisors : Assist. Prof. Dr. Akif ÖZBAY

: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ (Co-Supervisor)

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her konuda ilgi ve desteğini eksik etmeyen, engin tecrübesi ve yorumlarıyla bana yol gösteren danışman Hocalarım TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesinden Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ ve Gazi Üniversitesinden Yrd. Doç. Dr. Akif ÖZBAY’a,

Değerli yorumlarını ve engin tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, Sydney Üniversitesinden Doç Dr. Serdar KUYUCAK’a,

Değerli TİK Hocalarım Gazi Üniversitesinden Prof. Dr. Süleyman ÖZÇELİK ve Süleyman Demirel Üniversitesinden Doç. Dr. Nevin AYTEMİZ’e,

Doktora çalışmam boyunca gerek maddi gerekse teknik bilgisayar donanımını sağlayan TÜBİTAK’a,

Doktora çalışmalarım boyunca birlikte çalıştığımız tüm arkadaşlarıma,

Yaşamım boyunca iyi ve kötü her durumda desteklerini hissettiğim, hayata atılmamda, lisans ve lisansüstü çalışmalarımda maddi ve manevi olarak beni destekleyen aileme,

Doktora sürecimde desteklerini hiç esirgemeyen ikinci aileme,

Doktora aşamam boyunca hep yanımda olan ve her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim, Bozok Üniversitesinden Yrd. Doç. Dr. Hatice KANBUR ÇAVUŞ’a,

Doktora hayatımın sonlarında aramıza katılan ve hayatımıza renk katan oğlum, Asil İshak ÇAVUŞ’a teşekkürü borç bilirim.

Bu tez 107T710 numaralı “İyon Kanallarında Polarizasyon Etkisinin Araştırılması” isimli TÜBİTAK Projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTARCT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. MEMBRAN PROTEİNLERİNİN MODELLENMESİ.....	4
2.1. Proteinler	4
2.1.1. Küresel (Globüler) proteinler	10
2.1.2. Lifli (Fibröz) proteinler	11
2.1.3. Zar (Membran) proteinleri	11
3. MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ	14
3.1. Coarse Grained Simülasyon Yöntemi	15
3.2. Monte Carlo Simülasyon Yöntemi.....	17
3.3. Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi	18
3.3.1. Moleküler dinamik teori.....	19
3.3.2. Verlet algoritması.....	19
3.3.3. Leap-Frog algoritması	22
3.3.3. Kısıtlı moleküler dinamik.....	23
3.4. Potansiyel Terimin Tanımlanması.....	25

Sayfa

3.4.1. Periyodik sınır şartları	31
3.4.2. Ewald toplamı	35
4. SERBEST ENERJİ	37
4.1. Şemsiye Örnekleme (Umbrella Sampling-US) Metodu.....	39
4.2. Streed Moleküler Dinamik Metodu.....	41
4.2.1. Jarzynski eşitliği	42
4.3. Serbest Enerji Pertürbasyon Metodu	43
4.4. Termodinamik İntegrasyon Metodu	45
5. LÖSİN TAŞIYICISI	49
5.1. LeuT'nin Yapısı	50
5.2. LeuT Membran Protein Sisteminin Kurulması	51
5.3. Simülasyon Detayları ve Sistemin Dengeye Getirilmesi	53
5.4. Sodyum İyonlarının Bağlanma Bölgeleri.....	56
5.4.1. Sodyum 1 bağlanma bölgesi	56
5.4.2. Sodyum 2 bağlanma bölgesi	57
5.5. Leu Aminoasitinin Bağlanma Bölgesi	58
5.6. Serbest Enerji Hesaplamaları	59
6. NAVAB KANALI	67
6.1. NavAb Kanalının Yapısı ve Seçici Filtresi	68
6.2. Simülasyon Detayları ve Sistemin Dengeye Getirilmesi	70
6.3. NavAb Kanalına İyon Bağlanmasının Enerji Hesabı.....	76
6.3.1. Sodyum iyonu için PMF hesabı	76
6.3.2. Sodyum iyonu için FEP hesabı	83

	Sayfa
6.3.3. Kalsiyum iyonu için PMF ve FEP hesabı	86
6.3.4. Kanalda kalsiyum iyonu bulunduğunda sodyum iyonunun PMF hesabı.....	94
7. SONUÇ	96
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	111

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Aminoasitlerin genel moleküler yapısının gösterimi	5
Şekil 2.2. Aminoasitlerin moleküler yapısının gösterimi. Bir aminoasit, karbon (siyan), azot (mavi), hidrojen (beyaz), oksijen (kırmızı) ve kükürt (sarı) atomları içerebilir. Resim VMD kullanılarak hazırlanmıştır.....	6-7
Şekil 2.3. Sekonder yapının a) α heliks b) β tabakalı gösterimi.....	8
Şekil 2.4. PDB’de bulunan kristal yapıların hangi deneysel yöntemle bulundukları gösterilmektedir	9
Şekil 2.5. PDB’de bulunan kristal yapıların bazı organizmalara göre dağılımı.....	10
Şekil 3.1 KcsA potasyum kanal için atomistik modelin CG modeline dönüşümünde atom sayısındaki azalma görülmektedir	16
Şekil 3.2. MD simülasyon algoritması	20
Şekil 3.3. Bağ gerilmesi gösterimi	26
Şekil 3.4. Bağ gerilimi için Morse ve harmonik potansiyelin kıyaslanması	27
Şekil 3.5. Açık bükülmesi gösterimi	27
Şekil 3.6. İmproper torsiyon açısı gösterimi	28
Şekil 3.7. Torsiyon açısı gösterimi.....	29
Şekil 3.8 Lennard-Jones potansiyelinin şematik gösterimi	31
Şekil 3.9. Periyodik sınır şartının gösterimi	33
Şekil 3.10. Lennard-Jones potansiyeli için kesme uzaklığının belirlenmesi.....	34
Şekil 4.1. US metodunun şematik gösterimi. Pencere dikey çizgiler ile ayırt edilmiştir. Noktalı oklar her pencerenin orta noktasını göstermektedir. Mavi bir daire her simülasyon penceresi içindeki atomu temsil eder	40

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Bir FEP hesabının yakınsaması. (a) b durumunun konfigürasyonu, a durumunun karakteristik konfigürasyon kümesinin bir alt kümesi (b) a durumundan b durumuna doğru ara durumların karşılıklı olarak örtüşmesi (c) a ve b durumları için kinetik katkının özdeş olduğu durum.	44
Şekil 5.1. LeuT'nın aminoasit sekans dizilimi ve α helikslerin gösterimi	49
Şekil 5.2. LeuT'nın ikincil yapısının gösterimi.....	50
Şekil 5.3. LeuT yapısının gösterimi. Membran düzleminde 3 boyutlu görünümü	51
Şekil 5.4. LeuT yapısında eksik olan Asn-133 ve Ala-134 rezidülerinin protein yapıdaki yerleri kayıp ilmek olarak gösterilmiştir	52
Şekil 5.5. Kurulan LeuT sisteminin görünümü	53
Şekil 5.6. Sistemin yoğunluk-zaman grafiği	55
Şekil 5.7. Protein (gri) yapıda Na1 ve Na2 bağlanma bölgelerindeki Na ⁺ iyonları (sırasıyla kırmızı ve mavi) ve Leu aminoasitinin (sarı) görünümü	55
Şekil 5.8. Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu rezidüler.....	57
Şekil 5.9. Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu rezidüler.....	58
Şekil 5.10. Leu aminoasitinin farklı atomlarının etkileşimde bulunduğu rezidüleri.....	59
Şekil 5.11. (a) Simülasyon başlangıcında (b) Simülasyon sonunda (c) Simülasyon sonunda Na iyonu etrafındaki 10 Å'luk su kabuğu.....	60
Şekil 5.12. Leu aminoasiti için TI (enerji-zaman) grafiği	62
Şekil 5.13. Na2 bağlanma bölgesinde Na ⁺ iyonu bulunduğunda Na1 bağlanma bölgesindeki Na ⁺ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği	63
Şekil 5.14. Na2 bağlanma bölgesine Na ⁺ iyonu yerine su molekülü konularak Na1 bağlanma bölgesindeki Na ⁺ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği.....	63

Şekil	Sayfa
Şekil 5.15. Na1 bağlanma bölgesinde Na^+ iyonu bulunduğunda Na2 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği	63
Şekil 5.16. Na1 bağlanma bölgesine Na^+ iyonu yerine su molekülü konularak Na2 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği.....	64
Şekil 6.1. NavAb yapısının kanal kısmının görünümü.....	68
Şekil 6.2. NavAb yapısının kanal kısmının hidrofobikliğinin görünümü	69
Şekil 6.3. NavAb sisteminin görünümü	70
Şekil 6.4. Sistemin yoğunluk-zaman grafiği	72
Şekil 6.5. NavAb protein lipit sisteminin dengeye gelme işlemi sürecinde her bir protein zincirinin omurga yapısının atomlarının RMSD grafiği	73
Şekil 6.6. NavAb protein ligant sisteminin omurga atomlarının 200 ns'lik MD boyunca RMSD grafiği.....	74
Şekil 6.7. a) 200 ns'lik tüm simülasyon boyunca x, y ve z koordinatları, b) son 187 ns'lik simülasyon boyunca x, y ve z koordinatları.....	75
Şekil 6.8. Kanal içine giren iyonun x, y ve z koordinatlarının histogram eğrileri	75
Şekil 6.9. 7 farklı konuma yerleştirilen iyonun x, y, z eksenlerindeki iyon koordinatları	76
Şekil 6.10. a) Protein yapı ile birlikte z eksenini (75 Å) boyunca su moleküllerinin görünümü b) Su moleküllerinin 20 Å ile -12 Å aralığında görünümü c) PMF yapılacak bölgede bulunan sodyum iyonunun 20 Å'daki görünümü d) PMF yapılacak bölgede bulunan sodyum iyonunun -12 Å'daki görünümü.....	77
Şekil 6.11. 0,5 ns'lik süreler içerisinde simülasyon verilerinin PMF eğrileri	78
Şekil 6.12. Örneklem süresi artırılarak 0'dan 3,5 ns süresine kadar 0,5 ns'lik adımlarla artırılarak toplanan simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrisi.....	79

Şekil	Sayfa
Şekil 6.13. a) Thr175 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	80
Şekil 6.14. a) Leu176 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	81
Şekil 6.15. a) Leu176 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	81
Şekil 6.16. a) Glu177 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	82
Şekil 6.17. a) Glu177 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	82
Şekil 6.18. a) Ser178 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	82
Şekil 6.19. Forward ve backward enerji hesaplamaları için her λ değerine karşılık gelen ΔG enerji değerleri.....	84
Şekil 6.20. Sodyum iyonunun serbest enerji pertürbasyon grafiği.....	85
Şekil 6.21. NavAb kanalına kalsiyum iyonu konularak yapılan MD'de iyonun x, y ve z koordinatlarındaki durumu	86
Şekil 6.22. Kanal içinde bulunan kalsiyum iyonun x, y ve z eksenlerinin histogram eğrileri	87
Şekil 6.23. NavAb protein yapısında kalsiyum iyonu bulunduğunda protein omurga atomlarının 100 ns'lik MD boyunca RMSD grafiği	88
Şekil 6.24. Kalsiyum iyonu için 0,5 ns'lik süreler içerisinde simülasyon verilerinin PMF eğrileri.....	89
Şekil 6.25. Kalsiyum iyonu için örnekleme süresi artırılarak 0'dan 3,5 ns süresine kadar 0,5 ns'lik adımlarla artırılarak toplanan simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrileri	90

Şekil	Sayfa
Şekil 6.26. a) Thr175 ve Leu176 karbonil oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	91
Şekil 6.27. a) Glu177 yan zincir oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	91
Şekil 6.28. a) Glu177 yan zincir oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	92
Şekil 6.29. Ser178 yan zincir oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü	92
Şekil 6.30. Forward ve backward enerji hesaplamaları için her λ değerine karşılık gelen ΔG enerji değerleri.....	93
Şekil 6.31. Kalsiyum iyonunun serbest enerji pertürbasyon grafiği	94
Şekil 6.32. Kalsiyum iyonu filtre içinde bulunduğunda sodyum iyonu için 0,0-3,5 ns'lik simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrisi.....	94

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.1. 2A65 nolu protein yapının Fasta kodları	52
Çizelge 5.2. LeuT sisteminin dengeye gelme işleminde uygulanan kuvvet sabitleri ve kuvvet sabitlerinin uygulandığı süreler.....	54
Çizelge 5.3. Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu atomlar arasındaki mesafeler	57
Çizelge 5.4. Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu atomlar arasındaki mesafeler	58
Çizelge 5.5. Leu aminoasitinin koordinasyonda bulunduğu atomlar ile mesafeleri	59
Çizelge 5.6. LeuT taşıyıcısında TI yöntemiyle iyon ve ligant bağlanma enerjileri.....	65
Çizelge 6.1. Sistemi denge haline getirme işleminde uygulanan kuvvet sabitleri ve kuvvet sabitlerinin uygulandığı süreler.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
CG	Coarse Grained
FEP	Free Energy Perturbation (Serbest Enerji Pertürbasyon)
LeuT	Lösün Taşıyıcısı
MC	Monte Carlo
MD	Moleküler Dinamik
MM	Moleküler Modelleme
NSS	Nörotransporter Sodyum Simport
PDB	Protein Data Bankası
PME	Particle Mesh Ewald
PMF	Potential of Mean Force (Ortalama Kuvvet Potansiyeli)
RMSD	Root Mean Square Deviation
SMD	Streed Moleküler Dinamik
SOP	Self Organized Polymer
TI	Termodinamik İntegrasyon
TM	Transmembran
US	Umbralla sampling
VDB	Voltaj Duyarlı Bölge
WHAM	Weighted Histogram Analysis Method (Ağırlıklı Histogram Analiz Metodu)

1. GİRİŞ

Modern bilimin en büyük buluşlarından biri fiziksel düşüncenin hayata uygulanmasıdır [Schrodinger, 1945]. Canlı ve cansız madde arasındaki temel fark nedir? Evrenin başka bir yerinde hayat var mı? [Darling, 2001] gibi sorular bizim için ilgi çekicidir. Ancak somut olayların analizindeki ilerlemeler de şaşırtıcıdır [Nelson, 2004; Tuszynski ve Kurzynski, 2003]. Uygulamalı fizik teorilerini içeren süreçlerde de biz fizikçiler bilgimizi arttırır ve doğayı öğreniriz.

Bilindiği üzere biyofiziksel problemlere termodinamik kanunlar uygulanır [Haynes, 2008]. Yaşayan bir sistemin fiziksel bir açıklaması mümkünse bu noktada sistem termodinamiği içermelidir [Calzetta, 2009]. Ancak moleküler düzeyde olayları dikkate aldığımızda, ısı motorları ya da yıldızlar gibi makroskopik sistemlerin termodinamiği hakkında değil de küçük sistemlerin termodinamiği hakkında konuşmalıyız [Ritort, 2008]. Araştırmacılar küçük sistemlerin çevreleriyle yaptıkları iş ve ısı değişiminin nasıl olduğu gibi özellikleri incelemek için gerekli deneysel metotlardan 1990'ların başına kadar yoksunlardı [Bustamante ve ark., 2005]. Modern tekniklerin gelişmesi mikroskobik manipülasyonlar sayesinde olmuş ve bu sayede yeni deneyler geliştirilmiştir. Geçtiğimiz yirmi yılda, teorisyenler tarafından geliştirilmiş ve deneysel olarak test edilmiş dalgalanma teoremleri bulunmaktadır [Bustamante ve ark., 2005]. Küçük sistemlerin enerji dalgalanmaları ile ilgili gelişmiş deneylere olan ulaşılabilirlik ve bu sistemlerin hem enerji değişimlerine hem de istatistiksel sapmalarına çözüm getiren prensiplerin formülizasyonu mikroskobik sistemlerin eşsiz özelliklerine ışık tutmaya başlamıştır [Bustamante ve ark., 2005].

Sonuçta, fizikçiler küçük sistemlerin dengede olmayan termodinamik bir teorisi için temel olarak hizmet verebilecek yeni deneysel ve kuramsal araçları geliştirmişlerdir. Bu araçlar sayesinde de küçük sistemler hakkında bilgi kazanmışlar ve kazanmaya devam etmektedirler.

Deneysel ve teorik gelişmelerle birlikte son 25 yılda bilgisayar dünyasındaki gelişmeler araştırmaların artık bilgisayarlarda, simülasyonlarla yapılmasının önünü

açmıştır. Bilgisayar simülasyonları moleküler yapıları anlamak ve mikroskobik etkileşimler hakkında yeni ve daha derin fikirler edinmek için yararlı tekniklerdir. Simülasyonlarla makroskopik deneysel gözlemler birleştirilerek sistemlerin mikroskobik özellikleri tahmin edilebilir. Günümüzde, bilgisayar simülasyonları doğal sistemlerin matematiksel modellemesinin önemli bir parçası haline gelmiştir.

Atomik ölçekte biyolojik sistemleri çalışmak için moleküler modelleme (MM) yöntemleri kullanılır. MM yöntemleri kuantum mekaniği ve klasik mekaniği kapsamaktadır. MM kullanılarak moleküler sisteme ait yapısal ve fonksiyonel özellikleri anlamak ve tahmin etmek için minimizasyon işlemleri, dinamik simülasyonlar, konformasyon analizleri ve diğer bilgisayar tabanlı yöntemler kullanılır. Burada ilk adım, sistemde molekül içi ve moleküller arası etkileşimler için bir model seçimidir. Seçilen bu modeller sistemdeki atomların ve moleküllerin düzenlenmesine, enerjinin hesaplamasına ve atomlarının pozisyonları ile farklılık gösteren sistem enerjisinin nasıl belirleneceğine izin verir. İkinci adım, mümkün olan en kararlı yapıyı bulmak için enerji minimizasyonu yapmaktır. Son olarak, hesaplamaların sonuçları deneysel veriler ile karşılaştırılır. Simülasyon sonuçları deneysel sonuçlar ile karşılaştırıldığında uyumlu sonuçlar gözlenirse sistemin belirli özellikleri analiz edilebilir. Özetle, teori ve deney arasında yakın bir bağlantı vardır: Deneysel veriler mevcut oldukça hesaplama modelleri gelişir; hesaplamalar sonuçlandıkça yeni deneyler düzenlenir ve biyolojik teoriler geliştirilir.

Moleküler biyoloji ve modern biyokimyanın gelişiminde Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA yapısını keşfetmeleri büyük bir öneme sahiptir [Watson ve Crick, 1953]. Ardından Ramachandran, biyomoleküllerin atomik ayrıntılarını anlamak için bir hesaplama yaklaşımıyla potansiyeli gösterdiği ilk deneylerden birini 1963 yılında yapmıştır. Bu deneyde basit bir katı küre (hard sphere) modeli kullanarak, aminoasit ve proteinlerin temel yapı taşlarının konformasyonlarını gösteren tahmini bir model geliştirmiştir [Ramachandran ve ark., 1963].

MD yöntemleri ise ilk olarak katı kürelerin etkileşimlerini çalışmak için 1957 yılında geliştirildi [Alder ve Wainwright, 1957]. Daha sonra sıvı argon sistemini taklit etmek

için 1964 yılında Rahman [Rahman, 1964] tarafından MD kullanılmıştır. 1974 yılında Rahman ve Stillinger [Stillinger ve Rahman, 1974] 216 adet su molekülü içeren bir sistemin MD simülasyon çalışmasını yayınlamıştır. 1975 yılında MD, katlanmış bir küresel protein (sığır pankreatik tripsin inhibitörü) [Levitt ve Warshel, 1975] ile ilgili yapısal bilgi elde etmek için kullanılmıştır.

Membran proteinlerinden olan KcsA potasyum kanal proteininin kristal yapısının MacKinnon tarafından 1998 yılında keşfedilmesi ile [Doyle ve ark., 1998] moleküllerin modelleme süreci başlamış ve deneysel verilere paralel ve hatta daha hızlı gelişme göstermiştir. Günümüzde, MD simülasyon yöntemleri yaygın olarak DNA, protein-protein, protein-ligant ve ilaç tasarımı problemlerinin yapısal ve dinamik çalışmaları gibi özel amaçlar için kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında membran proteinlerinin modellenmesi üzerinde durulmuş ve membran proteinleri ikinci bölümde açıklanmıştır. Üçüncü bölümde simülasyon metotları üzerinde durulmuş, Coarse Grained ve Monte Carlo simülasyon yöntemi hakkında kısaca bilgi verilmiş ayrıca moleküler dinamik simülasyon yöntemi detaylıca anlatılmıştır. Dördüncü bölümde serbest enerji hesaplama metotları özetlenmiş, şemsiye örnekleme (umbrella sampling) metodu, streed moleküler dinamik metodu, serbest enerji pertürbasyon metodu ve termodinamik integrasyon metodu anlatılmıştır. Lösin taşıyıcısının yapısal özellikleri, iyon ve ligant bağlanma enerji hesaplamaları beşinci bölümde modelleme ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Altıncı bölümde yine modelleme ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri kullanılarak voltaj bağımlı sodyum kanalının yapı fonksiyon ilişkileri, iyon geçişinin enerji hesaplamaları, kanalın tıkanmasına neden olan kalsiyum iyonunun kanal içindeki durumu incelenmiştir.

2. MEMBRAN PROTEİNLERİNİN MODELLENMESİ

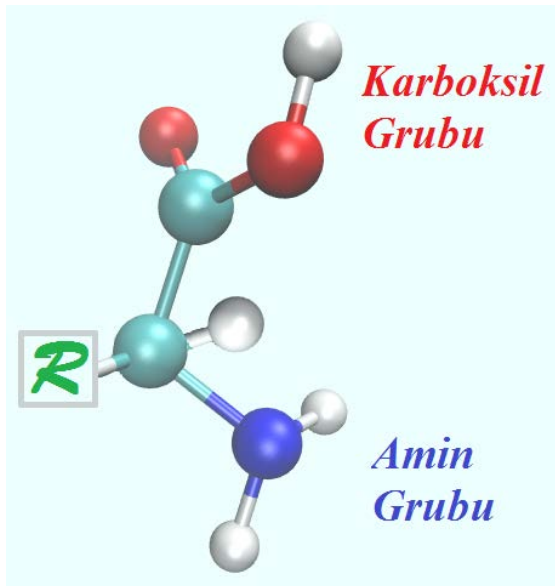
Geleneksel deneylerin bir tamamlayıcısı olarak bilgisayar simülasyonları yaygın olarak proteinler, DNA, RNA, membranlar ve deneysel olarak ele alınması zor olan küçük biyomoleküllerin fonksiyonel bileşenlerini anlamayı sağlamaktadır. Bununla beraber güvenilir hesaplama çalışmaları yapmak amacıyla, biyomolekülün yapısının yüksek bir atomik çözünürlükte olması ön koşuldur. Özellikle membran proteinlerinin moleküler yapı tayini hala genel olarak çözülmemiş bir problem olmasına rağmen, birkaç yapı son on beş yılda çözülebilir hale gelmiştir. Deneysel olarak tespit edilen kristal yapının yokluğunda, homoloji modelleme makul bir 3 boyutlu model elde etmek için rasyonel bir fırsat sağlayabilmektedir. Genellikle proteinlerin homoloji modellemesinin 3 boyutlu yapı tahmini için en doğru yöntem olduğu kabul edilmektedir ve yapı-tabanlı moleküler tasarım ve mekanizma araştırması gibi uygulamaların geniş bir yelpazesi için uygun modelleri üretmektedir [Khabiri, 2011].

MM'de gelişim çok hızlı oldu ve hala süregelen bilgisayarlardaki yazılım ve donanımsal ilerlemeler ile birlikte bu alan etki ve popülerlik kazanmaktadır. Artan bilgisayar işlem gücü, daha hızlı ve etkin sayısal algoritmalar ile hesaplamalı fizik/kimya karmaşık kimyasal ve biyolojik sorunları çözmek için çok verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Bir hesaplama yaklaşımında temel ve gerekli girdiler: Moleküllerin yapıları, atom yükleri ve bağ bilgileridir. Bu bilgi ile uygulanabilirlik sınırları tanımlanabilir ve yeni yöntemler geliştirilebilir. Bir sistemi temsil etmek için kullanılan modeller matematiksel tanımlamalardır (bazen görsel tanımlamalar). Bu modeller bize ab-initio teorisi ile belirlenen karmaşık matematiksel hesaplamaları yapmadan moleküler sistemin mikroskobik özelliklerini tanımlamak ve tahmin etmek için bir yol sunar.

2.1. Proteinler

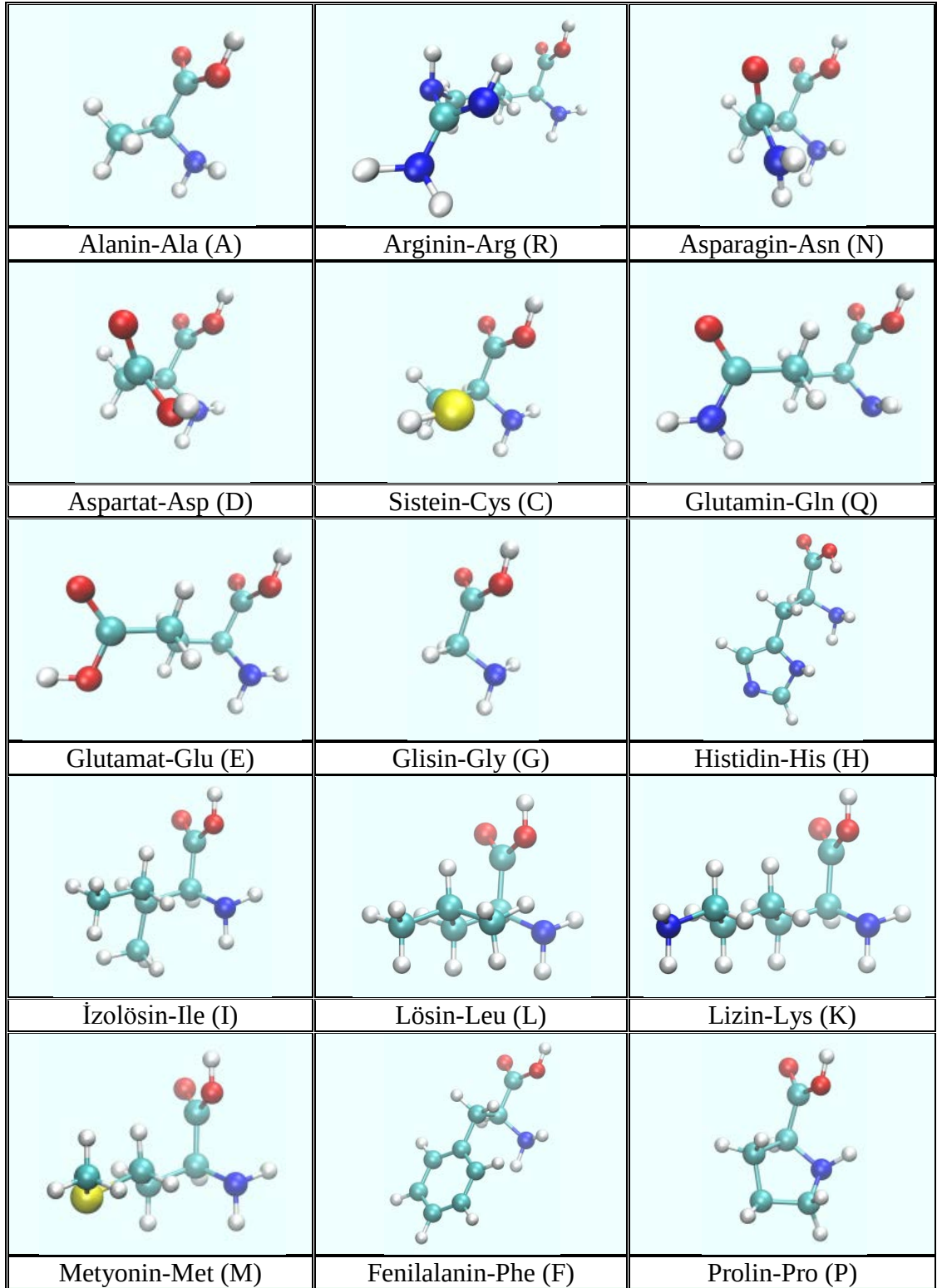
Proteinler birbirine peptit bağı ile bağlı aminoasitlerden oluşan katlanmış biyopolimerlerdir ve yaşayan organizmaların nano makineleridir [Buxbaum, 2007].

Proteinler tüm canlı organizmaların yapısı ve bileşimi için anahtardır ve hemen hemen her biyolojik fonksiyona (enzim, hormon, savunma vs.) katılırlar. Proteinlerin farklı kategorilerde birçok görevi vardır. Bunlar: (i) Kimyasalların taşınma ve depolanması, (ii) kas ve hücre zarları için yapı malzemesi olma, (iii) dış etkenlere karşı organizmanın savunması ve (iv) hücrenin yaşamını düzenleyen kimyasal reaksiyonların çoğunu katalize etmektir. Proteinler karmaşık yapısal ve işlevsel fonksiyonlarına rağmen atomik düzeyde oldukça sadedirler ve sadece beş farklı atom tipinden (N, O, H, C, S) oluşan aminoasitlerin bir zinciridirler. Proteinleri farklılaştıran bu atomların farklı düzenlenmeleri yani zincir halkalarındaki farklılıktır. Aminoasitler; bir polipeptit omurgası boyunca amin, karboksil ve aminoaside ismini veren R (yan zincir) fonksiyonel gruplarından oluşur (Şekil 2.1).

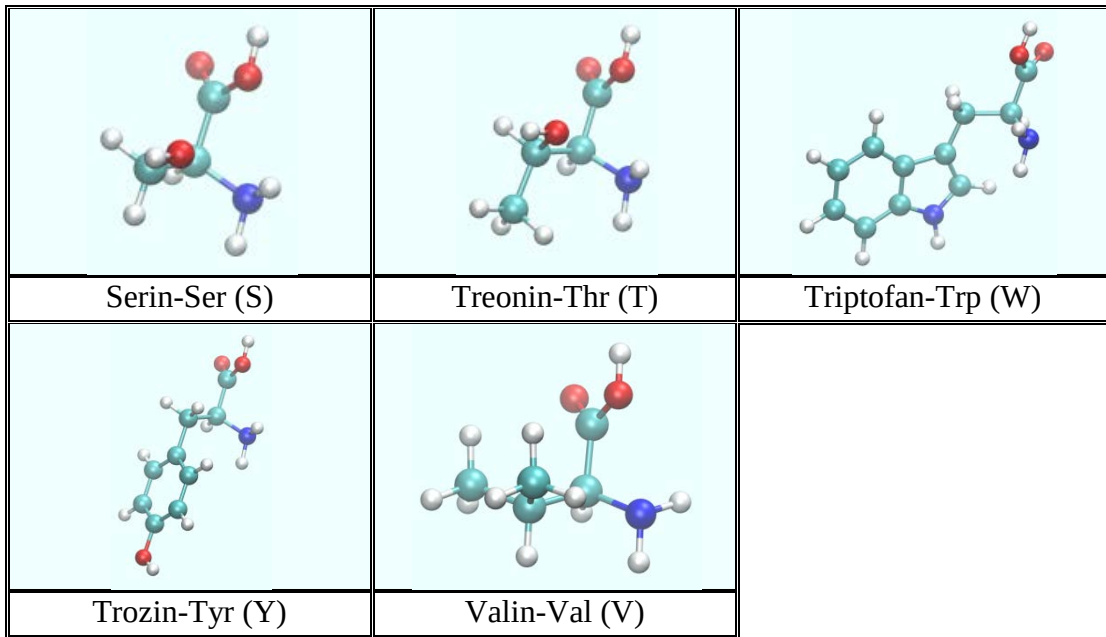


Şekil 2.1. Aminoasitlerin genel moleküler yapısının gösterimi

Doğada bağlı olduğu yan zincir tipine göre her biri farklı özelliklerde yirmi çeşit aminoasit bulunur. Tüm aminoasitlerin nötral halleri Şekil 2.2’de görüldüğü üzere iki kısımdan oluşur: Birincisi 20 aminoasit için özdeş olan omurga (backbone) kısmı, ikincisi ise her tip aminoasit için farklı olan yan zincirlerdir (side chain). Aminoasitler arasındaki bağlantıların hepsi aynı kimya ve temel geometriye sahiptir. Tüm aminoasitleri bağlayan peptit bağı, bir azot atomu ile bir karbon atomunun kovalent bağ yapmasıyla oluşur (1 mol H_2O açığa çıkar).



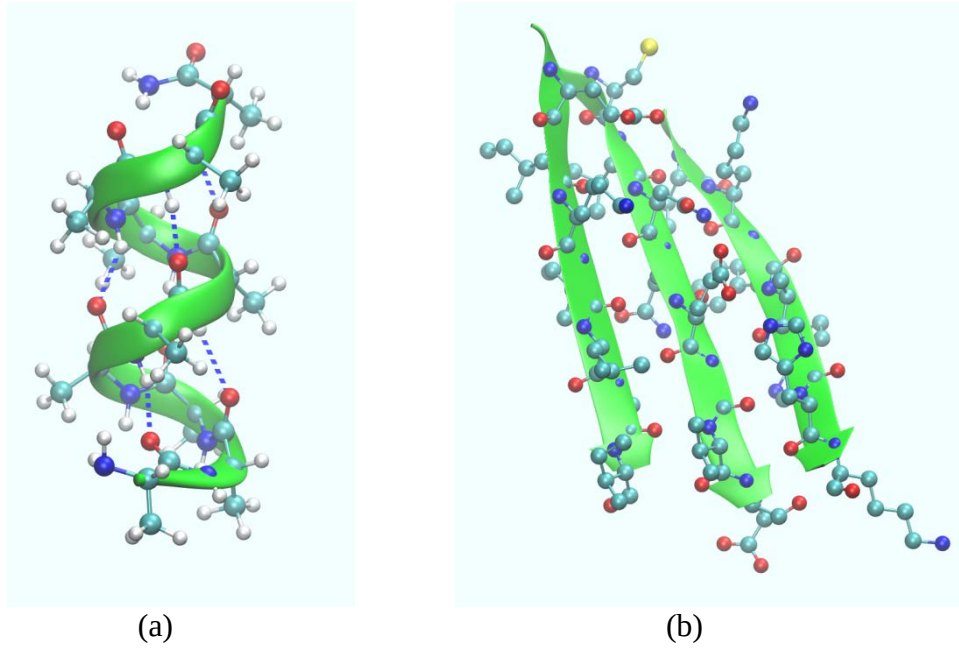
Şekil 2.2. Aminoasitlerin moleküler yapısının gösterimi. Bir aminoasit, karbon (siyan), azot (mavi), hidrojen (beyaz), oksijen (kırmızı) ve kükürt (sarı) atomları içerebilir. Resimler VMD kullanılarak hazırlanmıştır [Humphrey ve ark., 1996]



Şekil 2.2. (Devam) Aminoasitlerin moleküler yapısının gösterimi. Bir aminoasit, karbon (siyan), azot (mavi), hidrojen (beyaz), oksijen (kırmızı) ve kükürt (sarı) atomları içerebilir. Resimler VMD kullanılarak hazırlanmıştır [Humphrey ve ark., 1996]

Proteinler üç boyutlu yapıları itibarıyla dört farklı konfigürasyonda bulunabilirler. Primer yapı; bir proteinin yalnızca aminoasit moleküllerinin peptit bağlarıyla yan yana gelip zincir oluşturmalarından ibarettir [Buxbaum, 2007]. Sekonder yapı; primer yapıdaki zincirin hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimi ile kararlı bir duruma gelen ve düzenli tekrarlanan daha karmaşık bir durumdur. Sekonder yapı DNA zinciri gibi α -heliks (Şekil 2.3a) olarak adlandırılan şekline geçebilir. Bu durumda zincir bükülmeye başlar ve karbonil grubu (COOH) ile amin grubu (NH) arasında hidrojen bağı oluşur. Hidrojen bağı fiziksel olarak kuvvetli bir bağ değildir ve dışarıdan verilen herhangi bir fiziksel etki veya ısı ile koparılabilir. Protein yapının sekonder formunun β tabakalı (Şekil 2.3b) adı verilen diğer bir konfigürasyonu daha vardır.

Bu konfigürasyonda primer zinciri meydana getiren aminoasitler heliks şekline girip kıvrılmalar yapmak yerine akordiyon şeklini alırlar. Proteinler ayrı ayrı α heliks ve β tabakalı konfigürasyonuna sahip olabildiği gibi her iki konfigürasyonu da içerebilirler.



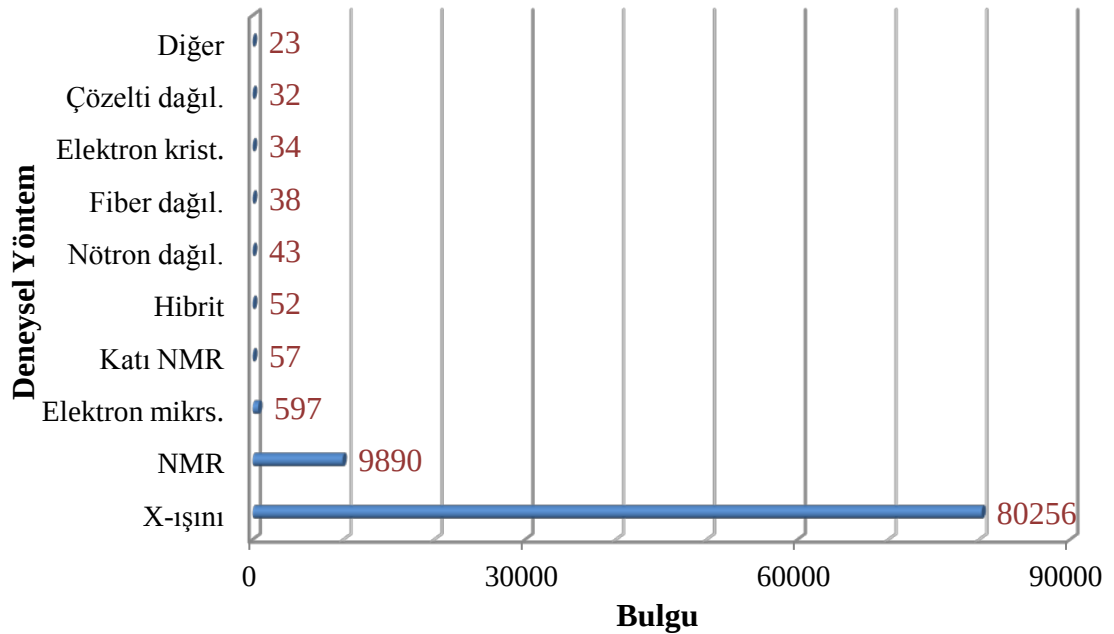
Şekil 2.3. Sekonder yapının a) α heliks ve b) β tabakalı gösterimi

Tersiyer yapı; bu durumda proteinin yapısı daha da karmaşık bir hal alır. Aminoasitlerin yan zincirleri arasında oluşan bağlar ile protein şeklini kazanmaya başlar. Tersiyer yapı sekonder yapının kıvrılmış 3 boyutlu halidir denilebilir. Tersiyer yapıda α heliks ve β tabakalı yapının her ikisi de bulunabilir. Bunlara ilaveten bazı bölgeler, primer ve kangal adı verilen daha basit ve farklı konfigürasyonlara sahip olabilir. Protein yapının yan zincirleri arasındaki bağlar hidrojen, iyonik, disülfid ve hidrofobik (su sevmeyen) bağlar olabilir. Kuaterner yapı; protein yapıların en karmaşık şekline sahip olan bu konfigürasyonda proteinler şekillerini, alt birimlere bağlı olan radikaller ve diğer gruplara bağlı diğer alt gruplar arasındaki bağlar ile kazanır. Protein zincirleri meydana getiren aminoasitlere bağlı yan grupların kendileri de alt birimlere ayrılırlar. Kuaterner yapıyı meydana getiren yapı ise, bu alt gruplar arasında meydana gelen iyonik veya hidrojen bağları ile şekillenir.

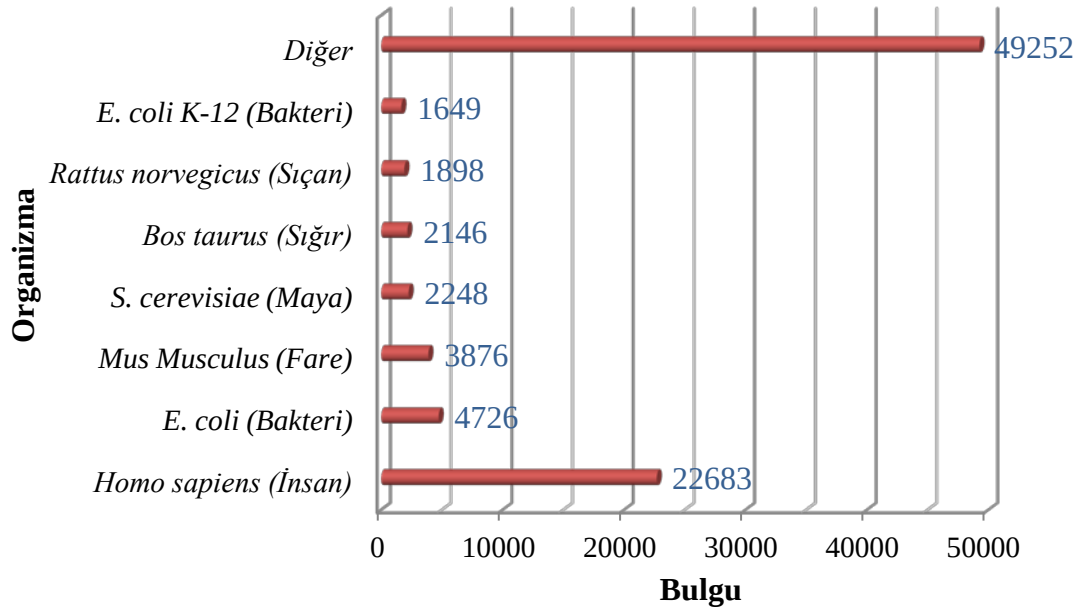
Kuaterner yapıya sahip proteinler oldukça karmaşık olmasına rağmen enzimler tarafından titizlikle meydana getirilmiş mükemmel moleküllerdir. Enzimlerin en ilginç görevleri de şüphesiz protein sentezlerinde üstlendikleri görevlerdir. Birincil enzimler primer yapıyı meydana getirdikten sonra devreye ikincil enzimler girer ve

primer dizisini sanki matematik hesabı yapmayı biliyorlarmış gibi belirli sıralar atlayarak birbirine bağlamaya başlarlar. Örneğin birinci aminoasidin yan grubunun, 4 aminoasit atlayarak 5. aminoaside bağlaması gibi. Devreye farklı farklı enzimler girerek en sonunda proteini tersiyer ve kuaterner yapısına kavuştururlar.

Protein yapılar, deneysel olarak X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve elektron mikroskobu gibi yöntemler ile tespit edilebilir [Yada ve ark., 1988]. Şekil 2.4'te Protein Data Bank (PDB) web sitesinden alınan verilerle gösterilen grafikte kristal yapıları bulunmuş protein yapıların hangi deneysel yöntemlerle bulundukları görülmektedir. Burada kristal yapıların % 88'inin X-ışını kristalografisi % 10'unun NMR ile % 2'sinin elektron mikroskobu ve diğer yöntemlerle bulunduğu gösterilmektedir. Bir proteindeki atom koordinatları alınarak, protein daha sonra bilgisayar simülasyonunda kullanılabilir. Şekil 2.5'te ise yine PDB'den alınan verilere göre kristal yapıların hangi organizmalara ait oldukları görülmektedir.



Şekil 2.4. PDB'de bulunan kristal yapıların hangi deneysel yöntemle bulundukları gösterilmektedir



Şekil 2.5. PDB’de bulunan kristal yapıların bazı organizmalara göre dağılımı

Genellikle üçüncül yapılarla ilişkili olarak proteinler üç ana sınıfa ayrılabilirler: Küresel (globüler) proteinler, lifli (fibröz) proteinler ve zar (membran) proteinleri. Hemen hemen bütün küresel proteinler suda çözünür ve çoğu enzimdir. Lifli proteinler çoğunlukla yapısaldırlar ve zar proteinleri ise genellikle reseptör olarak görev yaparlar. Ayrıca zar proteinleri suda çözünen küçük molekül ya da ligantların hücre zarından geçmeleri için kanal veya taşıyıcı oluştururlar.

2.1.1. Küresel (Globüler) proteinler

Küresel proteinler; suda çözünen, küçük küresel molekülleri oluşturan ve çözünen proteinlerin büyük bir kısmını da oluşturan proteinlerdir. Küresel proteinler genellikle tersiyer yapıya ve bazı durumlarda ikincil ve kuaterner yapıya da sahiptirler. Düzenli ikincil yapılar genellikle yarı küresel proteinden daha az yer kaplar. Enzimler, taşıyıcı proteinler ve reseptör proteinler küresel proteinlerdir. Kaslardaki miyoglobin ve karboksipeptidaz enzimi küresel proteinlere örnektir.

2.1.2. Lifli (Fibröz) proteinler

Lifli proteinler genellikle ikincil yapı formunda bulunurlar ve ince uzun yapıya sahip moleküllerdir. Lifli proteinler çözünmezler ve vücutta yapıcı ya da destekleyici bir rol oynarlar. Aynı zamanda kas ve siliyer proteinleri gibi vücudun hareket etmesini sağlayan yapılarda bulunurlar. Lifli dokuların bir özelliği de genellikle muntazam bir şekilde tekrarlanan yapıya sahip olmalarıdır. Örnek vermek gerekirse; boynuz, kıl, yün, saç ve tırnaklarda bulunan keratin; bağ doku, kemik, kıkırdak ve tendonlarda bulunan, organizma proteinlerinin yarısından çoğunu oluşturan kollajen; ligament ve diğer destek dokularda bulunan elastin; ipek fibroin, önemli lifli proteinlerdir. Keratin, bir sistein dimeri olan sistin bakımından zengindir. Normalde α heliks yapısında ve yedi aminoasit sonra yinelenen bir yapıya sahiptir, fakat ıslak durumda β tabakalı yapısını alır.

2.1.3. Zar (Membran) proteinleri

Hücre zarında bulunan proteinlerin bir kısmı zar boyunca kanallar oluştururlar ve iyon kanalları olarak adlandırılırlar. İyon kanalları, iki katmanlı yağ tabakasına gömülü proteinlerden oluşan hücre zarında bulunan su dolu boşluklardır. İyon kanallarının iki kısmı vardır: Hücre zarındaki lipid moleküllerine bağlanan yağ-dostu kısım ve kanalın iç kısmını oluşturan su-dostu kısım. Proteinin bu durumu sayesinde suda çözünmüş olan maddelerin hücre içine ve dışına hareketi için bir yol oluşur.

İyon kanalları sinirler, kaslar ve sinapslarda aksiyon potansiyelleri üreterek, algılama hareketinden çeşitli görevleri gerçekleştirmek için gerekli hareketlere kadar birçok alanda canlı organizmalara yardım ederler [Hille, B., 2001]. Bu amaca ulaşmak için kanal, birkaç milisaniyelik bir süre boyunca açıldığında iyonların binlercesini iletmeye ihtiyaç duyar. İyon kanalları (birkaç Å yarıçapa sahip) oldukça dardır ve bu nedenle iyonlar tek sıra halinde hareket ederler. Biyolojik iyon kanallarını membran duvarında sadece bir delik olmaktan ayıran bir diğer üstün özellik, onların seçicilik özelliğidir. Diğer bir deyişle, iyon kanalları belli türlerde iyonları iletmek için tasarlanmıştır.

İyon kanallarının darlığı ve seçiciliği iyon kanallarının önemini vurgular ve özelliklerini incelemek için doğru tanımlanması gerekmektedir. Kanal proteinleri binlerce atomdan meydana gelir, onu çevreleyen lipid ve elektrolit içerdiği de düşünüldüğünde sistem çok büyük bir hal alır [Kuyucak ve Baştuğ, 2003].

Hücre zarına yerleşmiş olan bir kısım proteinler de taşıyıcı olarak davranırlar. Taşıyıcı proteinler hücre içine nelerin girip çıktığını düzenlemeye yardımcı olurlar. Taşıyıcı proteinlerin de tıpkı protein kanallarında olduğu gibi iki özel kısmı bulunur: Hücre zarındaki lipid moleküllerine bağlanan yağ-dostu kısım ve kanalın iç kısmını oluşturan su-dostu kısım.

Taşıyıcı proteinler belirli moleküllere yapışırlar ve sadece bunları hücre içine getirirler. Bu görevlerini yerine getirirken şekillerinde bir değişiklik olur ve bazen maddeleri hücre zarından geçirmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Hücre zarının kendisinde delikler yoktur. Bu yüzden, lipid çift katlı tabakadan oluşan hücre zarından direkt olarak geçemeyen su, protein, nükleik asit ve bazı küçük moleküller, bu taşıyıcı proteinler yoluyla hücre içine girerler.

Taşıyıcı proteinlerin üç boyutlu aminoasit dizilimleri nedeniyle, küçük bir dar geçit yapmaları kolay olur. Böylece bu boşluğa sığan belirli büyüklükteki maddelerin bu kanaldan geçmesi mümkün olur. Ancak sadece büyüklük burada geçiş için yeterli değildir; hücre zarı sadece hücrenin ihtiyacı olan, içeri alınması gereken maddeleri olarak seçici-geçirgen bir özellik sergiler.

Taşıyıcı proteinler iyon kanallarına benzerdir ancak bunlarda iyon geçişi daha yavaştır. Taşıyıcılar kullandıkları enerji kaynağına göre sınıflandırılır; birincil aktif taşıyıcılar ATP hidroliz reaksiyonundan elde edilen serbest enerjiyi kullanırlar, ikincil aktif taşıyıcılar ise iyonların hareketine karşılık bir substratın diğer yönde hareketinin birleştirilmesi ile membran potansiyelinde depolanan enerjiyi kullanırlar [Baştuğ ve Kuyucak, 2012].

Bu çalışmanın beşinci bölümünde yukarıda bahsedilen taşıyıcılara örnek olarak bir membran taşıyıcısı olan lösin taşıyıcısından bahsedilecektir. Lösin taşıyıcısı hücre zarı boyunca yerleşmiştir ve hücre dışından içine sodyum iyonu ve lösin aminoasitini taşır. Ökaryotik organizmalarda, bu proteinler nöral sinyal için çok önemli bir rol oynamaktadır ve fonksiyonel bozukluğu ise birçok sinirsel hastalığın nedenidir [Torres ve ark., 2003; Hahn ve ark., 2002; Masson ve ark., 1999; Owens ve ark., 1994]. Altıncı bölümde ise bir iyon kanalı olan NavAb kanalından söz edilecektir. NavAb kanalları fizyolojide merkezi bir rol oynamaktadır. Ayrıca elektrik sinyalleri ve sinir sistemindeki bilgileri düzenlerler [Hodgkin ve Huxley, 1952; Hille, 2001; Payandeh ve ark., 2011]. NavAb kanallarının bozulması kalıtsal epilepsi, migren gibi hastalıklara neden olur [Ryan ve Ptacek, 2010].

3. MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ

Bilgisayar simülasyonları moleküler yapıları anlamak ve mikroskobik etkileşimler hakkında daha derin bilgiler edinmek için geliştirilmiş faydalı tekniklerdir. Simülasyonlar bilgisayarlarla kurgulanan deneylerdir. Gerçek deneylerde ölçümü mümkün olmayan fiziksel nicelikler bilgisayar simülasyonlarında gösterilebilir. Simülasyon yöntemleri yazılım ve donanımsal tekniklere paralel bir gelişme göstermiştir. Burada moleküler modelleme için sıklıkla kullanılan simülasyon tekniklerine kısaca değindikten sonra bu çalışmanın omurgasını oluşturan MD simülasyonları detaylıca verilecektir.

Atomik ölçekteki yapıların simülasyonlarında kullanılan metotlardan biri Monte Carlo (MC) simülasyonlarıdır [Metropolis ve ark., 1953]. MC tekniği; ekonomi, nükleer fizik gibi pek çok alanda var olan problemleri çözmek üzere olasılık istatistiğinin ve rastgele sayıların kullanımına dayanan istatistiksel yöntemlerin genel adıdır. Sistemin küme ortalamasına dayanan MC simülasyonu sistemin zamandan bağımsız denge özelliklerini araştırmak için güçlü bir yöntemdir [Mones, 2011]. Sistemin fiziksel ve kimyasal özellikleri rastgele hareket eden parçacıklar üzerinden istatistiksel ortalamaları ile elde edilir [Metropolis, 1987; Binder, 1987].

MD simülasyonları ise dinamik davranışları izlemek için fırsat sağlar. Çeşitli MC metotlarına ilaveten, MD simülasyonu atomik ölçekte çözümler üreten farklı bir simülasyon yöntemidir. MD simülasyonu malzeme bilimi ve yoğun madde fiziğinin problemlerine uygulanabilen en uygun sayısal yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Sistemin dinamik özellikleri parçacıkların konum ve hızlarının zaman ile nasıl değiştiğinin bilinmesi ile bulunabilir. MD simülasyonları bu bilgiyi ve hatta deneysel olarak ölçülemeyen dinamik değerleri de tam olarak verir [Şengül, 2008].

MD simülasyonunda N parçacıklı sistem için başlangıç konfigürasyonu (hız ve konumlar) oluşturulur ve sistemin toplam potansiyel enerjisi hesaplanarak her atoma etkiyen kuvvet elde edilir. Newton denklemleri parçacıkların küçük bir zaman aralığı sonrasında konum ve hızlarını bulmak üzere nümerik olarak çözülür. Yeni

konfigürasyon için toplam potansiyel enerji ve kuvvetler hesaplanır ve ikinci zaman aralığı sonundaki konfigürasyonun belirlenmesi için tekrar Newton denklemleri çözülür. Bu süreç istenen sayıda konfigürasyona ulaşıncaya kadar sürdürülür. Bu işlem atom sayısının artmasıyla karmaşık ve uzun süre gerektiren bir süreç olmaktadır.

MD yönteminde zaman problemini aşmak için bazı araştırmacılar protein ve RNA moleküllerinin doğru biyolojik yapısını, biyomoleküllerin katlamasını ve bağlanma mekanizmalarını bulmak için CG simülasyon yöntemleri kullanmaktadırlar [Clementi ve ark., 2000; Shea ve Brooks, 2001; Lipscomb, 2012]. Böyle bir yaklaşımda birkaç atom birleştirilerek (tipik olarak dört) tek bir parçacık gibi ele alınır [Nielsen ve ark., 2004]. Böylece parçacık sayısı, süre ve uzunluk ölçülerinde azalma olur.

Bu yöntemleri kısaca inceleyelim.

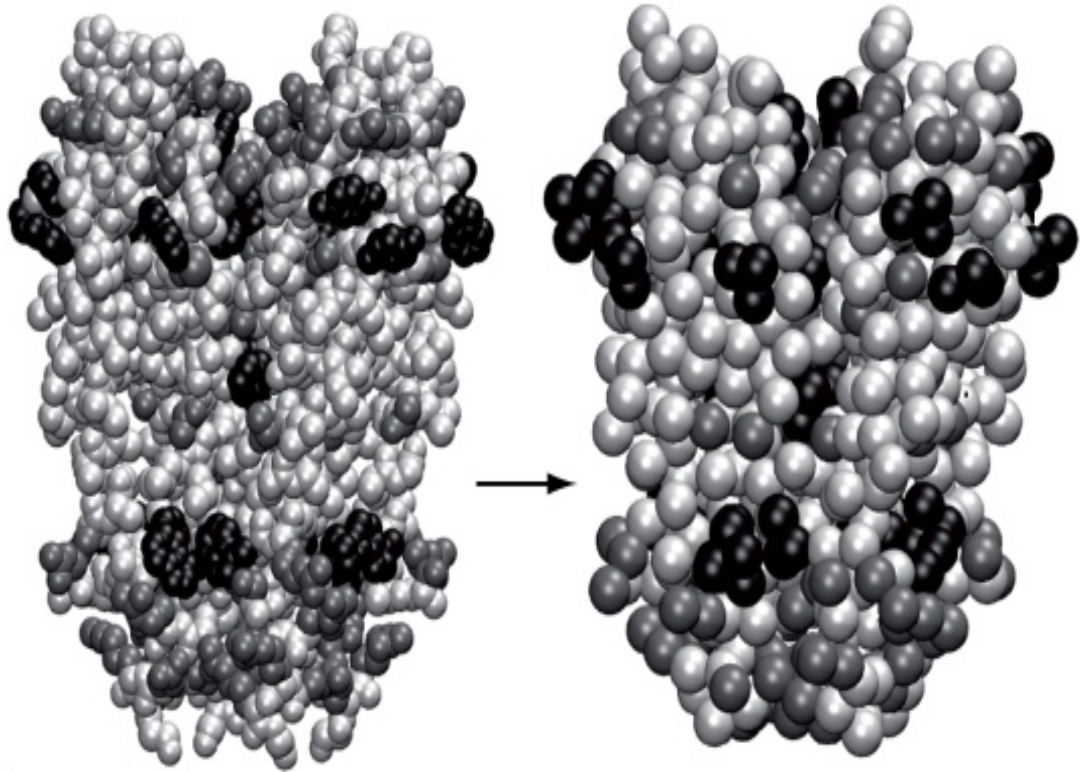
3.1. Coarse Grained Simülasyon Yöntemi

MD simülasyonu yapılırken istenen doğruluk derecesine göre sistem simüle edilebilir. Eğer detaylı bir model isteniyorsa, kuantum seviyesinde bir biyomolekülün modellenmesi ve moleküler yapısı içinde her bir elektronun davranışının simüle edilmesi gerekmektedir. Ne yazık ki, böyle bir simülasyon oldukça karmaşık ve uzun süreli bilgisayar çalışmaları gerektirir. Bu durum sistemlerin boyutunu ve simüle edilebilir süreyi sınırlar. Kuantum mekaniksel simülasyonlar, boyut olarak yaklaşık 100 atom ve zaman ölçeği olarak femto veya piko saniyelik ölçeklerde sınırlanır [Hills ve Brooks, 2009; Pincus ve ark., 2008].

Kuantum mekanik moleküler dinamik simülasyonları ile yaşanan hesaplama sorunları, her atomun yüklü ya da yüksüz bir boncuk ile temsil edildiği atomik düzeydeki bir sistemin simülasyonu ile aşılabilmektedir. Bu, kuantum seviyesinde simüle edilebilir moleküllerin sayısını büyük ölçüde artırır. Tek bir protein zinciri, ortalama olarak 400 amino asit uzunluğundadır ve katlanması bir milisaniyeden daha

uzun zaman alır. Örneğin; 24 çekirdekli bir bilgisayarda 50 000 atomlu bir sistemin 1 ms atomistik simülasyonunu yapmak, yaklaşık olarak 5000 saat (yaklaşık 210 gün) sürmektedir.

CG metodunda birkaç atom birleştirilerek (tipik olarak dört) tek bir parçacık gibi ele alınır [Nielsen ve ark., 2004]. Böylece parçacık sayısı azalırken aynı zamanda daha uzun süre simülasyon yapmak mümkün olur. Bu, protein-lipit etkileşimleri gibi büyük ölçekli sistemleri simüle etmeye de imkan verir. Bu durumdaki, problem ise bütün sistemin atomlarla tanımlanmasının gerekli olup olmadığına ya da CG yöntemle sistemin açıklanmasının yeterli olup olmadığına karar verilmesidir [Christen ve Van Gunsteren, 2006; Chang ve ark., 2005; Shi ve ark., 2006].



Şekil 3.1. KcsA potasyum kanalı için atomistik modelin CG modeline dönüşümünde atom sayısındaki azalma görülmektedir [Biggin ve Bond, 2008]

CG simülasyonlarının önce lipid, deterjan [Smit ve ark., 1990; Murtola, 2004; Stevens, 2003; Shelley, 2001; Goetz ve Lipowsky, 1998; Whitehead ve ark., 2001],

DNA [Tepper ve Voth, 2005], protein [Tozzini, 2005] ve peptit [Nielsen ve ark., 2004; Venturoli ve ark., 2005; Lopez ve ark., 2004] dinamiklerinin modellenmesinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Daha sonrasında lipit sistemleri için CG modelleri geliştirilmiştir [Marrink, 2004]. Bu lipit sistemleri de son zamanlarda membran proteinleri ile uygulama bulmuştur [Bond ve Sansom, 2006; Bond ve ark., 2006; Shih, 2006].

Etkili bir CG simülasyon modeli, Self Organized Polymer (SOP) modelidir. Buradaki her bir rezidü ya da nükleotid sırasıyla protein ve RNA için aminoasit merkezli ya da nükleotit merkezli tek bir boncuk ile temsil edilir (Şekil 3.1). Böylece simüle edilecek parçacıkların toplam sayısı azaltılır [Hills ve Brooks, 2009; Pincus ve ark., 2008]. Son çalışmalar, SOP modeli kullanılarak biyomoleküllerin MD simülasyonlarının dikkate değer bir doğrulukla, biyomoleküllerin deneysel olarak ölçülen mekanik özelliklerini hesaplayabildiğini göstermiştir [Guthold ve Cho, 2011; Zhmurov ve ark., 2010; Zhmurov ve ark., 2011].

3.2. Monte Carlo Simülasyon Yöntemi

MC terimi genellikle ilgili sistemde yeni yapılandırmaları oluşturmak için stokastik yöntemler kullanan tüm simülasyonlar için geçerlidir. Moleküler simülasyonlarda ve özellikle protein simülasyonlarında MC önemli örneklemeler sağlar. Genellikle MC simülasyonları şu şekilde ilerler: Bir sistemde parçacıkların bir başlangıç konfigürasyonundan başlar ve parçacıkların konfigürasyon değişimlerinden de MC hareketine geçilir. Bu hareket, kabul kriterlerine (konfigürasyonlar simülasyonda bir istatistik mekanik küme dağılımından örneklenir) bağlı olarak kabul ya da reddedilir. Bir hareketin kabul veya reddinden sonra, ilgili bir özelliğin değeri hesaplanır ve birçok hareketten sonra bu özelliğin ortalama değeri elde edilebilir. İstatistiksel mekanik uygulama ile bu şekilde ilgili sistemin dengede termodinamik özelliklerini hesaplamak mümkündür. MC simülasyonları için gerekli ve önemli bir koşul ise kullanılan şemanın ergodik olmasıdır, yani konfigürasyon uzayının erişilebilir her

noktasından sonlu sayıda MC hareketinin bir dizisinin herhangi bir noktasına ulaşılabilir olmasıdır.

MC simülasyonları MD simülasyonlarının aksine, Newton'un hareket denklemlerini çözme kısıtlamalarından bağımsızdır. Bu özgürlük tercih edilen istatistiksel mekanik küme içinde deneme konfigürasyonlarının oluşturulmasında ve hareketin tasarlanmasında kolaylık sağlar. Bu hareketler basit olmamasına rağmen, denge özelliklerini örneklemede 10^{10} kat veya daha fazla hızlanmaya yol açabilir. Özel MC hareketleri, belirli bir probleme yaklaşımda esnek modeller sağlayan simülasyonlarla kombine edilebilir. Buna ek olarak, MC yöntemleri, büyük CPU kümelerini kullanabilir ve paralel bilgisayarlarda çalıştırılabilirler.

Newton'un hareket denklemlerini çözmediğinden geleneksel MC simülasyonundan dinamik bilgi elde edilemez. Çözücü içindeki proteinlerin simülasyonunda MC yöntemindeki en önemli zorluklardan biri büyük ölçekli hareketlerin iletilmesidir. Çözücü parçacıklarının hareketi olmaksızın proteinin iç koordinatlarını değiştiren herhangi bir hareket, büyük olasılıkla atomların örtüşmesine neden olabilir.

3.3. Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi

MD simülasyon tekniği, atomlardan oluşan bir sistemin dengesi ve dinamik özelliklerini hesaplamak için kullanılır. MD simülasyonları ile ideal gazlar gibi basit sistemlerin yanı sıra canlı hücreler gibi karmaşık sistemlerin davranışlarını da tahmin edebiliriz. MD simülasyonunda, her atom için genel bir kuvvet hesaplanır ve klasik hareket denklemleri zaman içinde sistemi bir sonraki adıma (trajektörü) taşımak için kullanılır. İstatistiksel mekanik ve termodinamik kanunlar kullanılarak, sistemin makroskobik özellikleri hesaplanabilir. Bu bağlamda, MD teorik ve deneysel yöntemler arasında bir köprü görevi görür. Aslında, MD simülasyonuna "*bilgisayarlarda deneysel olarak çalışma*" da denilebilir [Allen ve Tildesley, 1987; Frenkel ve Smith, 1996]. MD simülasyonları deneysel yöntemlerin uygulanmasının zor olduğu karmaşık sistemlerin analizleri için özellikle önemlidir.

3.3.1. Moleküler dinamik teori

Moleküler dinamik simülasyon sistemleri, klasik hareket eşitliklerini kullanırlar. Sistemdeki tüm atomların hareketleri Newton'un ikinci yasası ile belirlenir:

$$\vec{a}(t) = \frac{\vec{F}(t)}{m} \quad (3.1)$$

Burada $\vec{F}(t)$, t zamanında her bir atom üzerindeki toplam kuvvettir, m atomun kütlesi ve a atomun ivmesidir. v_i atom hızı ve r_i atomun konumu kullanılarak a_i aşağıdaki gibi ifade edilir.

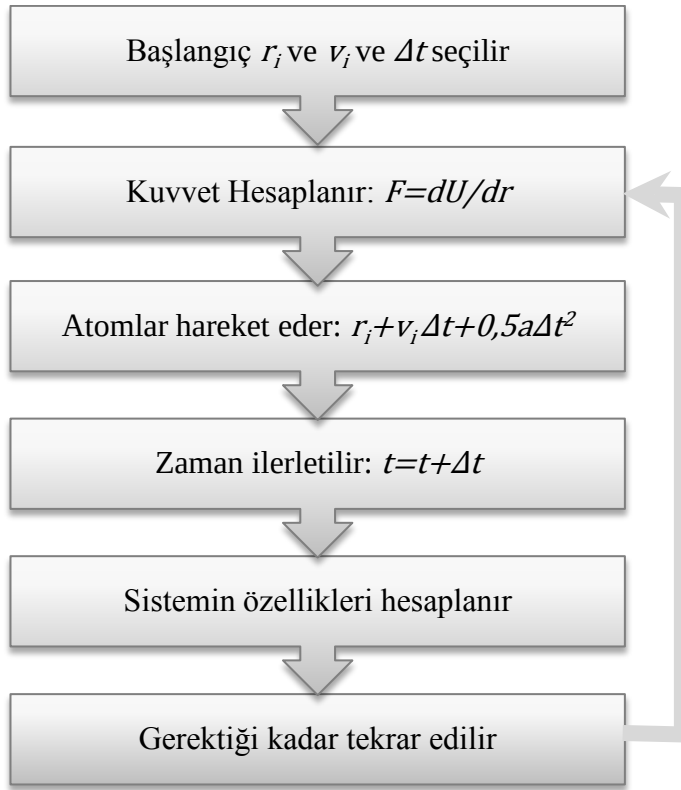
$$\vec{a}_i = \frac{\partial \vec{v}_i}{\partial t}; \vec{v}_i = \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t}; \vec{a}_i = \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad (3.2)$$

Bu denklemler zaman integrasyon algoritması ve küçük zaman adımları kullanılarak çözülebilirler. Verlet ve Leap-Frog algoritması genel olmakla birlikte integrasyon algoritmalarının birçok formu vardır [Hockney, 1974; Xu ve Voth, 2005; Vakkasoglu ve ark., 2006; Han ve ark., 2006; Xu ve Voth, 2006; Xu ve ark., 2007; Henry, 2009].

3.3.2. Verlet algoritması

MD simülasyonunda, tüm atomlar üzerindeki kuvvetler hesaplanır ve sonra simülasyon için belirlenen zaman adımında bütün atomların konumlarını ötelemek için kullanılır. Şekil 3.2'deki şemada görüldüğü üzere sistemin örnekleme istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar üretmek için yeterince uzun bir süre devam eder.

Kuvvet hesaplamasından sonra en önemli adım, atom pozisyonlarını ilerletmek için hızlı ve doğru bir integrasyon algoritması kullanmaktır. Böyle bir algoritma, zamanda tersinir olmalıdır. Yani eğer algoritma zamanda tersinir ise, sistem başlangıç durumuna geri dönebilir. Literatürde mevcut birkaç MD simülasyon algoritması vardır [Allen ve Tildesley, 1987; Frenkel ve Smith, 1996].



Şekil 3.2. MD simülasyon algoritması

En çok kullanılan algoritmalar t zamanında atomların pozisyonlarını bir Taylor açılımına dayandıran Verlet algoritmasıdır:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 + \dots \quad (3.3)$$

$$\vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 - \dots \quad (3.4)$$

Burada $\vec{r}$ atomların konumunu, Δt simülasyonun zaman adımını, $\vec{v}$ hızı ve $\vec{a}$ ivmeyi verir. Pratikte, hızlar pozisyonları ilerletmek için kullanılmaz. Ayrıca, uygun kısa bir zaman adımı seçilerek, Eş. 3.3 ve Eş. 3.4'deki terimler taraf tarafa toplanarak ve yüksek mertebeden türevler göz ardı edilerek hızların etkisi yok edilir ve Eş. 3.5 elde edilir.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \vec{a}(t)\Delta t^2 \quad (3.5)$$

Eş. 3.5'te Δt^4 dereceden hata payı içermektedir. Bu nedenle, genel olarak, küçük bir zaman adımı seçildiğinde önemli bir algoritma hatası azaltılabilir. Bu uygun bir zaman adımı seçmek için çok önemlidir ve yüksek mertebeden terimlerin göz ardı edilebilmesi için zaman adımı yeterince küçük seçilmelidir.

Eş. 3.5'te, bir t zamanında mevcut konum, $t - \Delta t$ zamanında eski konum ve geçerli andaki kuvvet biliniyorsa $t + \Delta t$ zamanında yeni bir pozisyon tahmin edilebilir. Verlet algoritması Δt ve $-\Delta t$ zamanlarında tersinirdir. Bu algoritmanın bir diğer avantajı kararlı enerji korunumu sunuyor olmasıdır. Hızlar açıkça atom pozisyonunu iletirmek için kullanılmaz, ancak bunlar hali hazırda kinetik enerji gibi özellikleri elde etmek için hesaplanabilir.

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t+\Delta t) - \vec{r}(t-\Delta t)}{2\Delta t} \quad (3.6)$$

Eş. 3.6 için hata mertebesi Δt^3 'dür. Verlet algoritmasının hareket denklemlerini çözmek için hız kullanan birkaç alternatif versiyon vardır. En sık kullanılanlar Hız-Verlet ve Leap-Frog'dur. Hız-Verlet algoritmasının iki adımı vardır:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t^2 \quad (3.7)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}\Delta t[\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \Delta t)] \quad (3.8)$$

Eş. 3.7 ve Eş. 3.8, normal Verlet algoritmasının eşdeğer formları olduğunu gösterir. Bu algoritmada, ilk adım olarak, yeni bir atom pozisyonu hesaplanır ve daha sonra yarım zaman adımında hızlar aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanır:

$$\vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2}\vec{a}(t)\Delta t \quad (3.9)$$

Bir sonraki adım $t + \Delta t$ 'de kuvvet ve ivme hesaplamaktır ve daha sonra hızlar Eş. 3.10 kullanılarak bulunur.

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{1}{2}\vec{a}(t + \Delta t)\Delta t \quad (3.10)$$

Bu algoritma teknik olarak bazı avantajlara sahiptir. Örneğin, simülasyon hücresinde sadece hızların ölçeklenmesi ile NVE (sabit parçacık sayısı, hacim ve enerji) kümesinden NVT (sabit parçacık sayısı, hacim ve sıcaklık) kümesine kolaylıkla geçiş yapılabilir.

3.3.3. Leap-Frog algoritması

Verlet algoritmasının başka alternatifleri de mevcuttur. Taylor açılımının basit bir şekilde dördüncü ve sonraki terimlerin alınmaması hatalıdır, tersinir değildir ve alan korumalı değildir. Taylor açılımına dayalı farklı, basit bir yöntem daha pratiktir. Leap-Frog algoritması yarım zaman adımlarında hızları hesaplar ve onları yeni sistemin yörüngesini tahmin etmek için kullanır. Bu algoritma Verlet algoritmasından elde edilebilir:

$$\vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t)}{\Delta t} \quad (3.11)$$

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}(t + \Delta t) - \vec{r}(t)}{\Delta t} \quad (3.12)$$

Eş. 3.11 ve Eş. 3.12 birleştirilerek, yeni atom pozisyonları bulunabilir:

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \Delta t \vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \quad (3.13)$$

Ayrıca, Eş. 3.14 hızları güncellemek için kullanılabilir:

$$\vec{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \Delta t \frac{\vec{F}(t)}{m} \quad (3.14)$$

Leap-Frog algoritması Verlet algoritması ile tam olarak aynı yörünge denklemleri üretir. Ancak, Leap-Frog algoritmasında, hızlar ve pozisyonlar aynı anda

bilinmemektedir. Sonuç olarak, kinetik ve potansiyel enerjiler farklı zamanlarda tanımlanabilir ve herhangi bir zaman adımında toplam enerji hesaplanamaz.

3.3.4. Kısıtlı moleküler dinamik

İdeal olarak herhangi bir MD simülasyonu çok uzun sürer çünkü biyolojik sistemlerdeki olayların zaman skalaları çok küçüktür ve yavaş süreçler bu şekilde araştırılabilir. Ancak, hareket denklemleri ile ilgili hatalar nedeniyle ve bu hatayı azaltmak için, zaman adımını en aza indirmek gerekmektedir. Uygulamada zaman adımını, sistemde en hızlı hareketin zaman ölçeğinden daha kısa olacak şekilde makul bir seçim yapılmalıdır. Genellikle, en hızlı hareket bir molekül içinde bağ gerilmesidir. Zaman skalası problemini çözmek için çeşitli yöntemler vardır [Tuckerman ve ark., 1992]. Birinci yaklaşımda, sırasıyla, sistemin hızlı ve yavaş hareketler için kısa ve uzun zaman adımı kullanan çoklu zaman adımları esas alınmaktadır. Başka bir alternatif ise kısıtlı (constraint) dinamikler kullanılarak sistemde hızlı hareketleri dondurmaktır. Sistemde atomik hareket sınırlandırarak en sık kullanılan yaklaşımlar *shake* [Ryckaert ve ark., 1977] ve onun hızlı versiyonu *rattle*'dir [Andersen, 1983]. *Shake* algoritmasında hareket denklemleri her zamanki gibi çözülür, ancak her atoma ekstra bir kısıtlama kuvveti eklenir:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i + \vec{g}_i \quad (3.15)$$

Burada $\vec{F}_i$ ve $\vec{g}_i$ sırasıyla gerçek ve kısıtlı kuvvetleridir. Sonuç olarak, Verlet algoritması, bu ekstra kuvvetleri içeren bir düzenlemeye (modifiye edilmeye) ihtiyaç duyar, değiştirilmesi gerekir.

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \Delta t \vec{v}_i(t) + \frac{\Delta t^2}{m_i} \vec{g}_i(t) \quad (3.16)$$

Burada $\vec{r}_i(t + \Delta t)$ kısıtlama olmadığı durumda konum terimidir. Böyle bir düzen tüm bağ uzunluklarını sabitlemek için kullanılabilir çünkü sistemde bağ gerilmeleri en hızlı hareketlerdir ve klasik MD simülasyonlarında bağ ayrışma veya bağ ilişkisi

içermeyen süreçler düşünülmez. Bu kısıtlama kuvveti bağ yönelimi boyunca işaretlenmelidir ve burada Newton'un üçüncü yasasına ihtiyaç duyulur.

$$\vec{g}_i(t) = \sum_j \lambda_{ij} \vec{r}_{ij} \quad (3.17)$$

Burada $\lambda_{ij} = \lambda_{ji}$ eşitliği söz konusudur ve i ilgili atomu ve j ise i . atoma bağlı atomu temsil eder. Tanımlanmamış zamana bağlı Lagrange çarpanı λ_{ij} ile gösterilir. Eş. 3.16 ve Eş. 3.17 birleştirilerek

$$\begin{aligned} \vec{r}_i(t + \Delta t) = \\ \vec{r}_i(t) + \sum_{h \neq j} \frac{\Delta t^2}{m_h} \lambda_{hi} \vec{r}_{hi}(t) + \frac{\Delta t^2 (m_i + m_j)}{m_i m_j} \lambda_{ij} \vec{r}_{ij}(t) - \sum_{k \neq i} \frac{\Delta t^2}{m_k} \lambda_{jk} \vec{r}_{jk}(t) \end{aligned} \quad (3.18)$$

elde edilir. Burada h indeksi, j atomu dışında tüm atomlarla ilgilidir ve j atomu i atomuna bağlanmaz. k indeksi i atomu dışında tüm atomlarla ilgilidir ve i atomu j atomuna bağlanır. $\vec{r}_i(t + \Delta t)$ terimi kısıtlama olmadığı durumda bağlıdır. Eş. 3.18'in her iki tarafının karesi alınırsa aşağıdaki Eş. 3.19'u elde ederiz.

$$|\vec{r}_i(t + \Delta t)|^2 = |\vec{r}_{ij}(t)|^2 = d_{12}^2 \quad (3.19)$$

Burada d_{12} bağ uzunluğudur. Sonuç olarak, λ_{ij} 'yi çözmek için karesel kuadratik eşitliklerin bir serisinin çözülmesi gerekmektedir. Eş. 3.19 sayısal olarak çözülmüştür ve çözümleri Eş. 3.17'de kullanılır. Böyle bir algoritma açısıl hareketleri dahil etmek için kolayca genişletilebilir [Ryckaert ve ark., 1977].

Shake algoritması Verlet algoritmasına iyi bir alternatif sağlar, çünkü sonraki algoritma sadece pozisyonları ve ivmeleri içerir. *Shake* algoritması düzenlenerek, *rattle* olarak bilinen onun hız tabanlı bir sürümünü üretmek mümkündür. Pratik olarak, *rattle*'da iki adıma ihtiyaç duyulur. İlk olarak, bir kısıtlama terimi Eş. 3.7'ye eklenmelidir.

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}'_i(t + \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i} \vec{g}_i^r(t) \quad (3.20)$$

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}'_i(t + \Delta t) + \frac{\Delta t}{2m_i} \vec{g}_i^r(t) \quad (3.21)$$

Benzer şekilde, bu eşitlikler iteratif olarak çözülürler. Yarı zamanlı adımlarda hızlar Eş. 3.21'in ikinci bölümü kullanılarak daha sonra hesaplanmıştır. İkinci adımda, hızlar daha gelişmiştir:

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}'_i(t + \Delta t) + \frac{\Delta t}{2m_i} \vec{g}_i^v(t + \Delta t) \quad (3.22)$$

Genel olarak *shake* ve *rattle* hızlı serbestlik derecelerinin hareketini sabitlemek için basit bir yaklaşım olarak kullanılır [Akhshi, 2013].

3.4. Potansiyel Terimin Tanımlanması

Kuvvet, atom pozisyonu ile ilgilidir ve potansiyelin gradyantine eşittir. Bu nedenle sistem ve onun atom pozisyonuna olan bağımlılığının potansiyeli olarak bilinir ve kuvvet kolayca hesaplanabilir. Sistemin potansiyeli genellikle iki terime ayrılmıştır:

$$V(r) = V(r)_{bağ\ yapan} + V(r)_{bağ\ yapmayan} \quad (3.23)$$

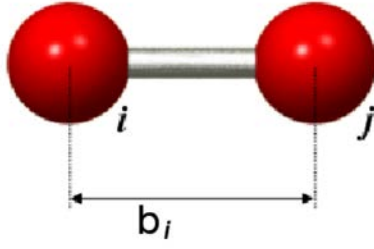
Burada ilk terim molekül içi yani bağ yapan atomlar arası potansiyeldir ve ikinci terim moleküller arası yani bağ yapmayan atomlar arası potansiyeldir. Molekül içi potansiyel bir molekülün içinde birbirleri ile bağlantılı olan atomlar arasındaki potansiyel olarak tanımlanır. Bağ gerilme, açı bükülme, torsiyon ve improper torsiyon gibi terimlerden oluşur.

$$V(r)_{bağ\ yapan} = V_s + V_b + V^{tr} + V^{itr} \quad (3.24)$$

Bağ gerilme potansiyelleri genellikle basit harmonik potansiyellerle tanımlanır:

$$V_s = \sum_i \frac{1}{2} k_{b_i} (b_i - b_{0i})^2 \quad (3.25)$$

Burada b_i ve b_{0i} sırasıyla iki etkileşim atomu arasındaki anlık mesafe ve onların arasındaki denge uzaklığıdır (Şekil 3.3). b_i 'nin b_{0i} denge değeri etrafında salındığı farz edilir.

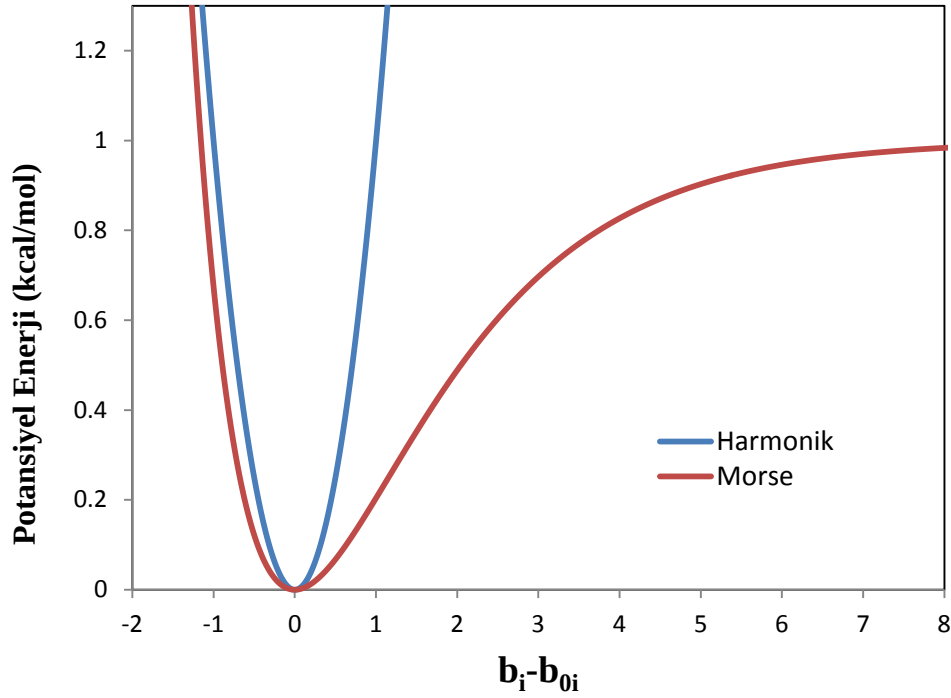


Şekil 3.3. Bağ gerilmesi gösterimi

Sonuç olarak, iki atom, denge mesafesi ile karşılaştırıldığında daha yakın veya daha uzak olduğu zaman, yüksek enerji görülecektir. Harmonik potansiyel “keskin” bir potansiyel modeli olduğu için, denge mesafesi civarındaki uzaklıklarda doğru potansiyeli üretmesi beklenmektedir. Aslında daha doğru bir potansiyel formu Morse potansiyelidir [Davankov, 1997] ve aşağıdaki gibi ifade edilir:

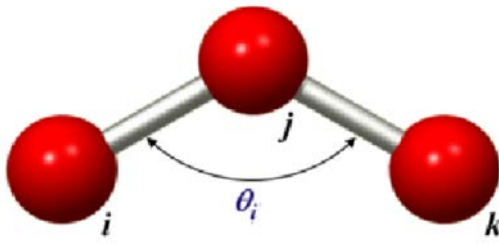
$$V_s = D_e [1 - e^{-\alpha(b_i - b_{0i})}]^2 \quad (3.26)$$

Burada D_e bağ ayrışma enerjisidir ve α potansiyel genişliğinin tersidir. Şekil 3.4’te Morse ve harmonik potansiyelin kıyaslanması görülmektedir. Prensip olarak, Morse potansiyeli moleküler germe modelleri için, en doğru potansiyel biçimlerinden biridir. Ancak Morse potansiyeli hesapsal olarak daha pahalıdır çünkü üstel bir terim içerir. Harmonik modelin avantajı basit ve hesaplamada etkili olmasıdır. Genel olarak Şekil 3.4’te gösterildiği gibi, harmonik bir potansiyel yeterince doğrudur çünkü atomlar denge konumlarından belirgin olarak sapmazlar. Bazı durumlarda, kübik ve kuadratik terimler doğruluğu artırmak için harmonik potansiyele eklenirler.



Şekil 3.4. Bağ gerilimi için Morse ve harmonik potansiyelin kıyaslanması

Şekil 3.5'te görüldüğü gibi bağ açısı potansiyeli, denge değeri etrafında molekül içinde üç ardışık atom arasındaki bağ açısını tutan potansiyel olarak tanımlanır ve basit harmonik potansiyel ile ifade edilebilir:



Şekil 3.5. Açı bükülmesi gösterimi

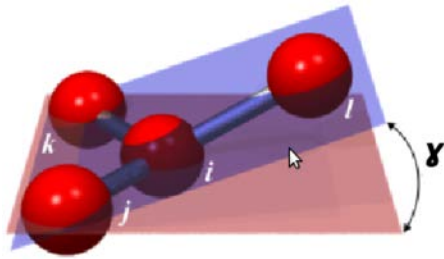
$$V_b = \sum_i \frac{1}{2} k_{\theta_i} (\theta_i - \theta_{0i})^2 \quad (3.27)$$

Burada k_{θ_i} , θ_i ve θ_{0i} sırasıyla açı bükülme kuvvet sabiti, açı ve denge açısıdır. Bağ bükülmesinde genelde her bağ açısı denge değeri etrafında küçük bir salınım sergiler ve basit bir harmonik potansiyel bu durumu karşılar.

Eş. 3.28’de moleküller arası potansiyeldeki üçüncü terim, düzlemsel hareketin dışı için enerji maliyetini temsil eder. Böyle bir terim simülasyon sırasında düzlemsellik ve asimetriyi korumak için düzlemsel moleküller ve asimetri merkezleri için çok gereklidir. Genellikle basit harmonik davranış moleküllerdeki improper torsiyon (Şekil 3.6) modelinde de kullanılır.

$$V^{itr} = k_{\gamma_i}^{(itr)} (\gamma_i - \gamma_{0i})^2 \quad (3.28)$$

Burada $k_{\gamma_i}^{(itr)}$, γ_i ve γ_{0i} sırasıyla improper kuvvet sabiti, düzlem açının dışı ve denge değerine karşılık gelir.



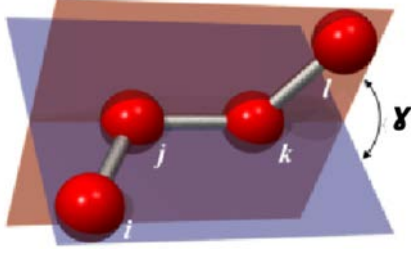
Şekil 3.6. Improper torsiyon açısı gösterimi

Bağ gerilme, açı bükülme ve improper torsiyon basit bir harmonik potansiyel fonksiyonu kullanılarak modellenilebilir olsa da, bir torsiyonel potansiyelin davranışı çok karmaşıktır. Dönüş için enerji maliyeti genellikle daha önce bahsedilen hareketin modlarından daha düşüktür. Öte yandan, bu düşük bariyer hareketleri atomik pozisyonlardaki önemli değişiklikler ile ilişkilidir. Bu yüzden, yüksek enerjili engeller ve küçük genlikli hareketlere ait diğer potansiyellerin aksine, burada büyük genlikli hareketlerle düşük enerji engelli modeller gereklidir. Dönme enerji engellerinin genellikle sin veya cos terimleri kullanarak modellenmesi önerilen tekrarlı davranışlar sergiler.

Şekil 3.7’de görüldüğü üzere torsiyon açısı, potansiyel bir bağ etrafında dönme olarak tanımlanır.

$$V^{tr} = k_{\gamma_i}^{(tr)} [1 + \cos (\eta \gamma_i - \delta_i)] \quad (3.29)$$

Burada $k_{\gamma_i}^{(tr)}$ terimi kuvvet sabiti, η minimum sayısı, γ_i , düzlem açının dışı ve δ_i torsiyon açısı ile ilişkili faz kaymasıdır.



Şekil 3.7. Torsiyon açısı gösterimi

AMBER [Pearlman ve ark., 1995], GROMACS [Bekker ve ark., 1993] OPLS [Jorgensen ve ark., 1996] ve CHARMM [MacKerell ve ark., 1998] gibi kuvvet alanlarının çoğu bağ yapan atomlar arası potansiyeli bu dört terimle sınırlandırır.

Bağ yapmayan atom çiftleri arasında tanımlanan etkileşim potansiyeli, çözünen-çözücü, çözücü-çözücü, çözünen-iyon ve çözücü-iyon etkileşimlerini içerir. Bu terimler biyolojik sistemlerin hesapsal çalışmaları için çok önemlidir. Çünkü makro moleküler çevreden çok fazla etkilenirler. Böylece bağlı olmayan atomların etkileşimleri başarılı biyomoleküler hesaplar için önemlidir. Bu terimlere atıfta bulunarak fonksiyonunun matematiksel ifadesi oldukça basit olabilir. Moleküller arası potansiyeller iki ayrı terimin toplamı olarak tanımlanabilir: Elektrostatik ve Lennard Jones potansiyelleri.

$$V(r)_{bağ\ yapmayan} = V^{elec} + V^{LJ} \quad (3.30)$$

Elektrostatik potansiyel Coulomb kanunu ile tanımlanır.

$$V^{elec} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \quad (3.31)$$

Burada ϵ_0 dielektrik boşluğun sabiti, ϵ_r relatif dielektrik sabitidir.

Bazı durumlarda yük, simülasyon sırasında değişebilir ancak genellikle, bu yükler MD simülasyonu boyunca sabit tutulur. Elektrostatik potansiyel herhangi bir molekül içi potansiyelle paylaşmaksızın bir molekül içinde atomlarla veya ayrı moleküllerin tüm atomları arasında hesaplanır.

Şekil 3.8’de görüldüğü gibi Lennard-Jones potansiyeli bir itme çekme teriminden oluşan dik bir potansiyel eğrisidir.

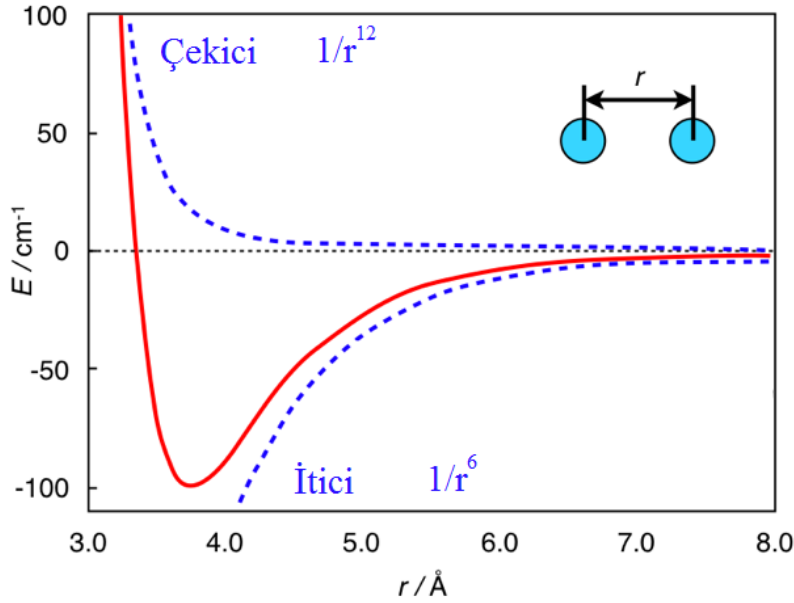
Van der Waals etkileşimleri, Pauli Dışarlama İlkesi göz önüne alınarak atomların dalgalanma polarizasyonlarındaki korelasyonlar tarafından üretilir [Battisti, 2012]. Bu kuvvetler bağ yapan atomlar arasındaki kuvvetler ile karşılaştırıldığında nispeten daha zayıftır ama biyolojik yapının fiziksel ve kimyasal olarak şekillenmesinde temel bir rol oynamaktadırlar.

$$V^{LJ} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3.32)$$

ϵ_{ij} potansiyelin derinliği, σ_{ij} potansiyel enerji sıfır olduğunda atomlar arası mesafe ve r_{ij} iki atomu arasındaki mesafedir. Bu parametreler gerçek bir potansiyel enerji üretmek için herhangi bir molekül içinde herhangi bir atoma özgüdür. Genellikle bu parametreler difüzyon katsayıları ve deneysel kızılötesi (IR) frekansları [Karger ve ark., 1990] gibi deneysel verilere fit edilerek parametrize edilir. Dikkat edilmesi gereken bir nokta, bu parametrelerin sadece bir atom için tanımlı değil, bir atom tipi diğer atom tipleri ile etkileşime girdiğinde onlar için de tanımlanmasıdır. Yani Eş. 3.33 ve Eş. 3.34’te verilen ϵ_{ij} ve σ_{ij} ’yi üretmek için atomlarla etkileşen ϵ ve σ kombinasyonuna ihtiyaç vardır. Genellikle Lorentz-Berthelot karıştırma kuralları [Allen ve Tildesley, 1987] atomik Lennard-Jones parametrelerini birleştirmek için kullanılır.

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \quad (3.33)$$

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (3.34)$$



Şekil 3.8. Lennard-Jones potansiyelinin şematik gösterimi

3.4.1. Periyodik sınır şartları

Gerçek kimyasal sistemler molar büyüklüklerle verilen moleküllerden oluşmaktadır. Ancak, veri depolama veya CPU hızındaki sınırlamalar gibi teknik konular nedeniyle bilgisayar simülasyonlarında molekül sayısı sınırlanır. Genellikle MD simülasyonları atom sayısı yüzlerce atomdan yüz binlerce atoma kadar değişir. Atomlar genellikle simülasyon hücresi adı verilen bir alanda sınırlı tutulurlar. Simülasyon hücresi, küp, küre veya altıgen gibi farklı şekillerde kabul edilebilir.

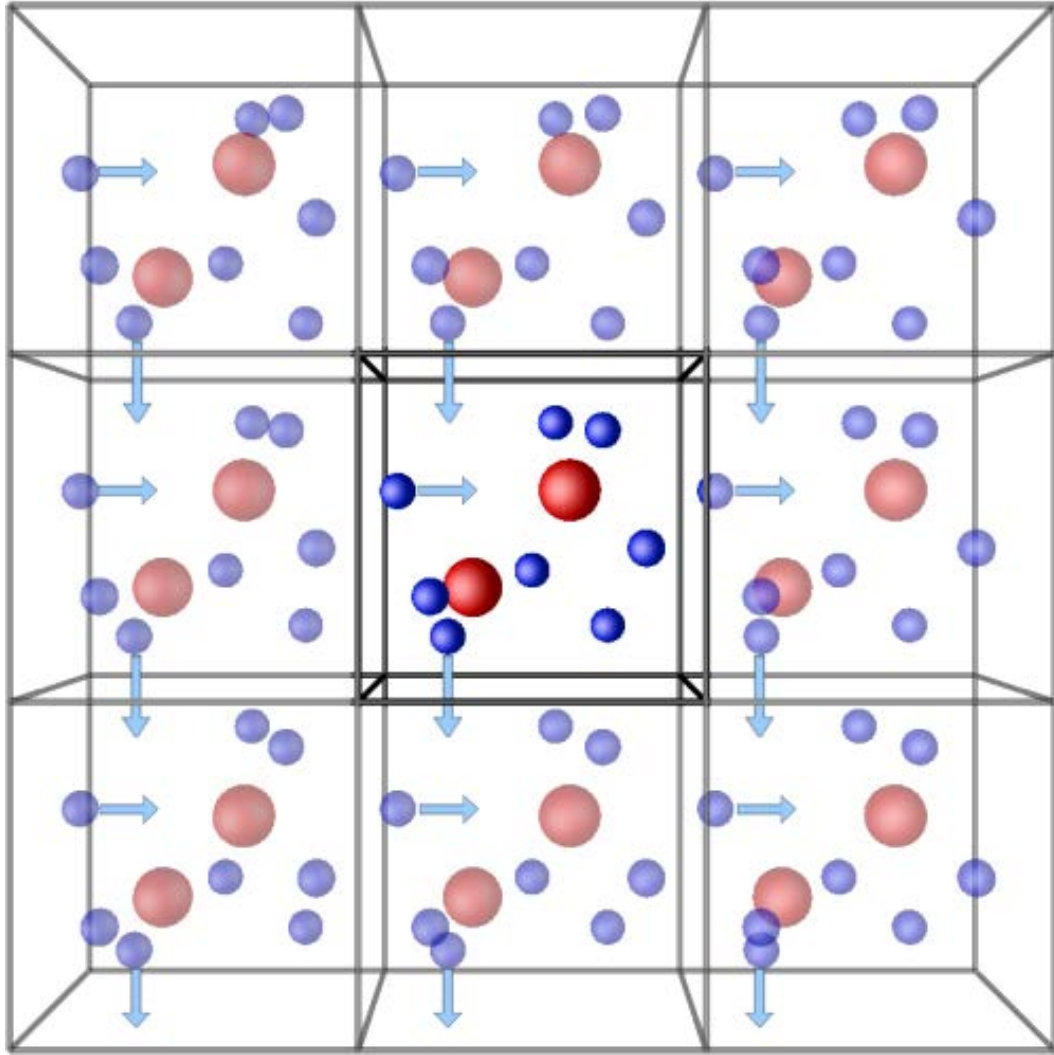
Bir simülasyon hücresinde az sayıda atom olduğu düşünüldüğünde atomların büyük bir kısmı hücrenin yüzeyinde konumlanmıştır [Born ve Von Karman, 1912]. Bu simülasyon hücresinin sınırlarında yapay etkilere neden olur çünkü yüzey atomları yığındaki (bulk) atomlar gibi benzer kuvvetlere karşı deneyimli değildir. Gerçek

sistemler için, atomlarının sayısı çok daha büyüktür ve yığın atomlarına göre yüzey atomlarının oranı sıfıra yakındır.

Bu nedenle, gerçek bir sistem için yüzey etkilerinin minimal olması gerekir. Oysaki simülasyon hücresi için etkiler sistemin toplam özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilir. Bu sorunun üstesinden gelmenin bir yolu simülasyon hücresinin boyutunu artırmaktır. Bununla birlikte hesaplamalar yavaşlar ve çoğu zaman hesaplama mümkün olmaz. İkinci yöntem ise, simülasyon hücresi üzerinde periyodik bir sınır şartı uygulanmasıdır.

Bu yöntemde, her bir simülasyon hücresi üç boyutta sonsuz uzayda genişler. Sonuç olarak, sonsuz 3 boyutlu bir kafes oluşturulacaktır. Herhangi bir atom simülasyon sırasında kendi simülasyon hücresi dışına hareket ederse, onun periyodik görüntüsü karşı taraftan simülasyon hücresine doğru hareket edecektir [Allen ve Tildesley, 1987; Frenkel ve Smith, 1996]. Bu durumun 3 boyutlu görünümü Şekil 3.9'da gösterilmektedir. Orijinal simülasyon hücresi olarak merkez kutuyu varsayarsak ve eğer bir atom sağ taraftan hücreden ayrılırsa, onun sol simülasyon hücresinden imajı eklenmiş olacaktır. Bu bağlamda, simülasyon hücresi pratikte sonsuzdur ve her atom yığın çevreyi hisseder. Periyodik sınır koşullarını uygulamak için, özel durumlar kuvvet hesaplamaları ile birlikte alınmalıdır.

Örneğin, bir simülasyon hücresindeki bir atom başka bir simülasyon hücresindeki kendi görüntüsü ile etkileşimde olmamalıdır. Ayrıca, sonsuz bir kafes içinde sonsuz sayıda atom mevcuttur ve pratik olarak atom etkileşimlerinin tümünün dikkate alınması imkansızdır. Bu sorunları çözmek için, simülasyon hücresindeki atom-atom etkileşimini düzenlemeye ihtiyaç duyarız. Burada, atomların etkileşim yolu hakkındaki fiziksel bilgimizi kullanmamız gerekir. Örneğin, Lennard-Jones etkileşimleri keskin kısa mesafeli etkileşimler olarak bilinmektedir.

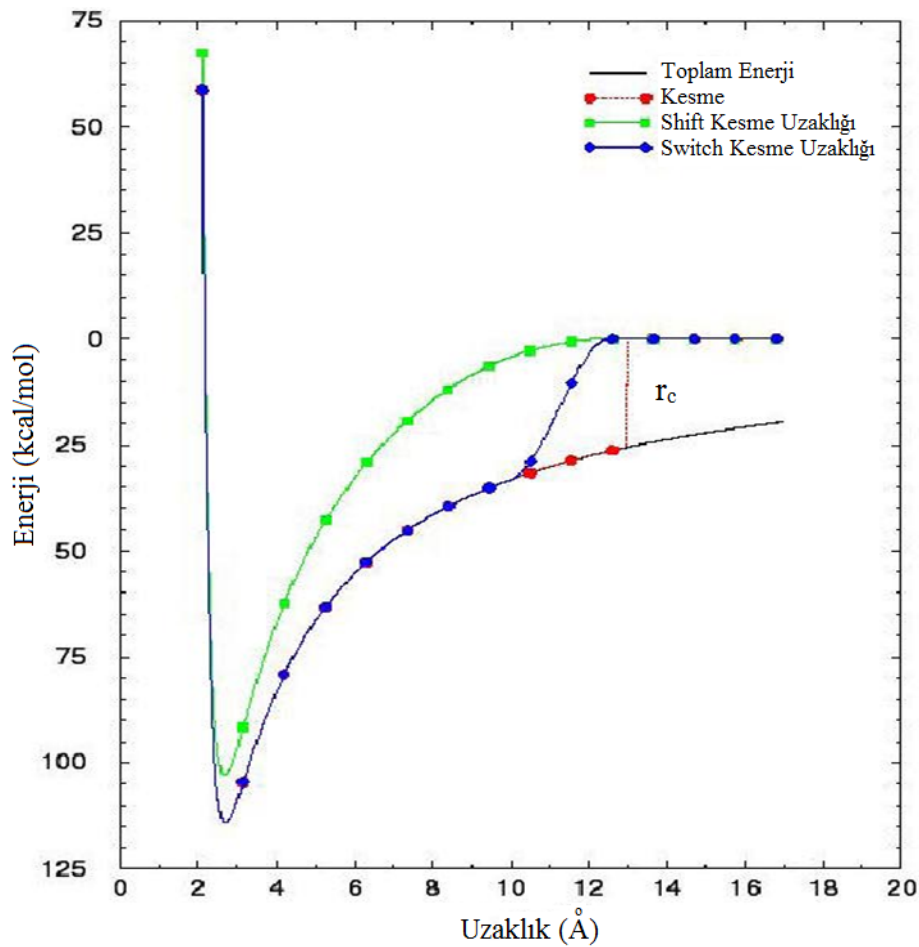


Şekil 3.9. Periyodik sınır şartının gösterimi

Şekil 3.10’da, iki atom için atomlar arası potansiyel gösterilmektedir. Atomlar arası mesafeler küçük olduğunda bu potansiyel oldukça iticidir ve yüksek bir pozitif potansiyel enerji ile sonuçlanır. Mesafe artırılarak potansiyel enerji negatif çekici bölgeye düşer. Bu bölge genellikle yaklaşık 3 – 4 ile 8 – 10 Å arasında değişir.

Görülebileceği gibi, potansiyel enerji eğrisi hemen hemen sıfır enerjide bir platoya ulaşır. Böyle bir mesafede iki atom arasındaki etkileşim neredeyse sıfırdır. Yani aralarında yaklaşık 10 Å bulunan iki atom, birbirlerini “hissetmezler”. Sonuç olarak, Lennard-Jones kuvvet hesaplamaları için 10 Å’dan daha yakın olan atom çiftleri arasındaki etkileşim dikkate alınır. Kısa mesafeli etkileşimlerin yok olduğu bir

mesafenin ötesi kesme yarıçapı (cut-off) olarak bilinir. Bir MD simülasyonunda, atom çiftleri arasındaki atom mesafeleri ilk olarak hesaplanır. Onlar kesme yarıçapı içine düşerse, kuvvet hesaplanacaktır. Bir kesim yarıçapının iki önemli koşulu sağlaması gerekir. İlk olarak, kesme yarıçapı yeterince büyük olmalıdır böylece sadece önemsiz etkileşimler göz ardı edilir. İkincisi, kesme yarıçapı kendi görüntüleri ile atomlar arasındaki etkileşimi önlemek için simülasyon hücre uzunluğunun yarısından daha küçük olmalıdır.



Şekil 3.10. Lennard-Jones potansiyeli için kesme uzaklığının belirlenmesi

Bu düzeltme gerçekten yararlı olsa da, başka sorunlara yol açabilir. Şekil 3.10'da görülebileceği gibi, kesme yarıçapı sırasıyla r_c den daha küçük veya daha büyük uzaklıklarda atomlar arası potansiyellere sebep olur. Matematiksel olarak, bu r_c 'de bir süreksizliğe neden olur. Güç potansiyelin türevi olduğundan r_c 'de sonsuza

atlayacaktır. Bu sorunu aşmak için, potansiyel terimin yeniden tanımlanması gerekmektedir:

$$U^{kesme-kayma}(r_{ij}) = U^{LJ}(r_{ij}) - U^{LJ}(r_c) \quad r_{ij} \leq r_c \quad (3.35)$$

$$U^{kesme-kayma}(r_{ij}) = 0 \quad r_{ij} > r_c \quad (3.36)$$

Bu potansiyel fonksiyonu ile sistemin hem potansiyeli hem de kuvveti sorunsuz bir şekilde değişecektir. Bu etki belirli bir değer ile sistemin bütün potansiyelinin kaymasına benzerdir.

3.4.2. Ewald toplamı

Elektrostatik etkileşimlerin davranışları oldukça karmaşıktır ve bu durumda, bir kesme yarıçapının getirilmesi tutarsız sonuçlar üretebilir. Ewald algoritması [Frenkel ve Smit, 1996; Darden ve ark., 1993] periyodik sistemlerin, özellikle elektrostatik enerjilerin, etkileşim enerjilerini hesaplayan bir yöntemdir. Sıvı simülasyonlarına uzun yıllar başarılı bir şekilde uygulanan bu algoritma makro moleküler simülasyonlar için referans durumundadır. Temel fikir yük yoğunluğunun modifikasyonudur. Eş. 3.37 yük yoğunluğu δ -fonksiyonların toplamıdır ve yük yoğunluğunun katkısı enerjiyi $1/r$ değerinde azaltır.

$$U = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N q_i \phi(r_i) \quad (3.37)$$

Ewald algoritmasında her yük q_i bir yük yoğunluğu dağılımı ile çevrilidir. Bu yük dağılımı bulutu toplam yük q_i 'yi büyük miktarda değiştirir. Bu yeni durumda, büyük bir mesafede elektrostatik potansiyel sadece bulut tarafından taranmamış q_i teriminden kaynaklanmaktadır ve bu terim hızlı bir şekilde sifıra gider. Buna uygun olarak elektrostatik enerji iki bölüme ayrılmıştır: (a) Bir kesme uzaklığı tanımlayan kısa mesafeli hesaplar kısmı (b) Poisson denklemi kullanılarak hesaplanabilen Fourier uzayında tanımlanan uzun mesafeli kısım.

Bu yöntemin avantajı gerçek uzaydaki etkileşimler uzun mesafeli olduğunda Fourier uzayındaki toplamın hızlı yakınsıyor olmasıdır. Elektrostatik enerjiler kısa ve uzun mesafeli etkileşimlerden oluştukları için en verimli hesaplama etkileşim potansiyeli gerçek uzayda kısa mesafeli etkileşim toplamı ve Fourier uzayında uzun mesafeli etkileşim toplamı olarak iki parçaya ayrıldığında gerçekleşir.

4. SERBEST ENERJİ

Serbest enerji, dinamik süreçlerin anlaşılmasında rol oynayan en önemli veridir. Moleküler dinamik simülasyonları atom düzeyinde sistemin dinamik davranışları hakkında çok faydalı bilgiler sağlar. Simülasyon trajektörü veri analizleri; bağ, açı ve torsiyon açılarının yanı sıra atomlar arasındaki hidrojen bağları gibi birçok yapısal özellikleri açıklayabilir. Sistemin tam olarak anlaşılması için kimyasal süreçlerin serbest enerji davranışlarının incelenmesi gerekir. MD simülasyonları sistem mekanizması ve dinamikleri ile ilgili yararlı bilgiler sağlayabilir, ancak deneysel karakteristiklerin büyük bir kısmı sistemin serbest enerji bilgilerden anlaşılabilir. Serbest enerji hesaplamaları genel olarak protein katlanma, protein-protein etkileşimleri ve protein-ligant bağlanmalarının yanı sıra, iyon kanalları ya da taşıyıcılardan iyon taşınma olayları gibi birçok fenomende enerji değerlerinin araştırılması için kullanılır. Sistemin serbest enerjisi, verilen bir durumda sistemin nasıl bulunduğunu tanımlayabilir. Daha uygun bir deyişle herhangi iki durum arasındaki serbest enerji farkı hesaplanır. Belirli bir reaksiyon koordinatının bir fonksiyonu olarak çeşitli durumlar arasındaki serbest enerji farkı ortalama kuvvet potansiyeli (potential of mean force-PMF) olarak adlandırılır. Tipik olarak, bir PMF profili birden fazla yerel minimuma ek olarak genel bir minimuma sahip olabilir. Çeşitli sistemlerde serbest enerjiyi elde etmek için şuan farklı yaklaşımlar mevcut olmasına rağmen bazı büyük biyolojik sistemlerde serbest enerjinin doğru tahmini oldukça zordur.

Sistemin durum değişikliği ile ilgili serbest enerji farkının bilinmesi sayesinde, kararlı durumların kurulması mümkündür. Kararlı durumların termodinamik özellikleri, durumlar arasındaki geçişlerin kinetikleri ve kararlı durumların dış koşullardan nasıl etkilendiğinin anlaşılması da mümkündür. Serbest enerji hesaplamaları, simülasyonu yapılan sistemlerin, atomik düzeyde pertürbasyonu ve yapısal analizi sağlaması nedeniyle yapı fonksiyon bağının kurulmasında anahtar rol üstlenir.

Termodinamik serbest enerji, entropi-sıcaklık terimleri ile elde edilen sistemin enerjisinin bir fonksiyonudur, böylece kapalı bir sistem içinde meydana gelen sıcaklık kaynaklı olayların kapasitesini belirler. Helmholtz fonksiyonu F veya Gibbs fonksiyonu G olarak ifade edilen serbest enerji, belki de en önemli termodinamik niceliktir ve biyokimyasal sistemlerin modern çalışmalarında merkezi bir kavramdır. Aslında birçok fiziksel özellik sistemin serbest enerjisine doğrudan ya da dolaylı olarak bağlı kimyasal veya biyokimyasal bakış açısıyla ilgilidir. Kanonik kümede (NVT) serbest enerji Helmholtz serbest enerjisi A , ile verilir. İzotermal-izobarik kümede (NPT kümesi) serbest enerji Gibbs serbest enerjisi G , ile verilir. Helmholtz serbest enerji Eş. 4.1'deki gibi tanımlanır:

$$A = U - TS \quad (4.1)$$

Burada U iç enerjidir (kinetik ve potansiyel enerjinin toplamı) T sıcaklık ve S entropidir. Gibbs serbest enerjisi de benzerdir ama pV (basınç ve hacim) terimi eklenmiştir [Chipot ve Pohorille, 2007]

$$G = A + pV \quad (4.2)$$

Birçok durumda Gibbs ve Helmholtz serbest enerjileri, türevlerin sonuçlarıyla ilişkili olarak ve genellikle sayısal değerlerinde (özellikle sistem boyutu arttıkça) birbirleriyle değiştirilebilir.

Bu çalışmada kullanılan moleküler simülasyonlarda serbest enerjinin hesaplanmasını iki ana başlık altında toplayabiliriz. Bunlar yola bağımlı ve yoldan bağımsız metotlardır. Yola bağımlı metotlar mutlak bağlanma enerjisinin hesaplanması için kullanılır. Yola bağımlı metotlar:

- a. Umbrella Sampling (şemsiye örnekleme) Metodu
- b. Streed Moleküler Dinamik Metodu

Yoldan bağımsız metotlar rölatif bağlanma enerjisinin hesaplanması için kullanılır. Mutlak serbest enerji hesaplaması ile bu yöntem kullanılabilir ancak özellikle yüklü iyonlar için oldukça zordur. Yoldan bağımsız Metotlar:

- a. Serbest Enerji Pertürbasyon Metodu
- b. Termodinamik İntegrasyon Metodu

4.1. Şemsiye Örnekleme (Umbrella Sampling-US) Metodu

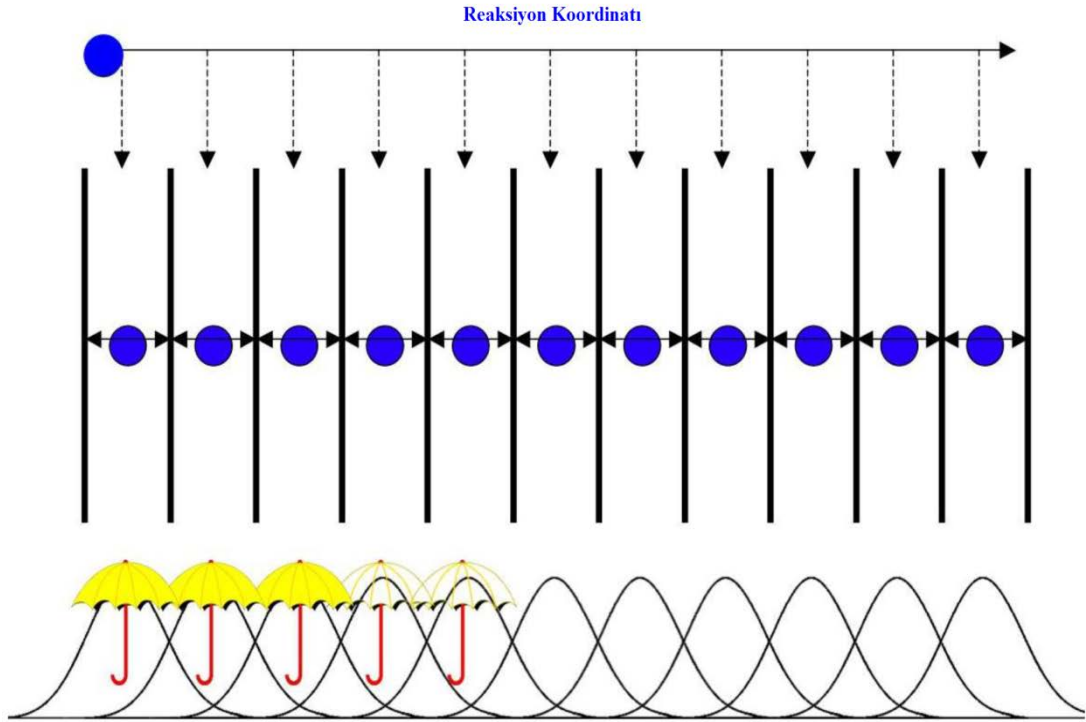
Önceden tanımlanmış reaksiyon koordinatları boyunca uygulanan bir simülasyon metodudur. Bu metot bir harmonik potansiyel enerji terimi içeren Hamiltonyen düzenlenerek uygulanır [Straatsma ve ark. 1986].

$$H'(\lambda) = H(\lambda) + \frac{1}{2}k_i(\lambda - \lambda_i)^2 \quad (4.3)$$

Burada $H(\lambda)$, potansiyel enerji fonksiyonu veya sistemin Hamiltonyenidir, λ reaksiyon koordinatının akım değeridir. λ_i ve k_i sırasıyla her umbrella i 'nin merkezi ve kuvvet sabitidir.

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere bu metotta, reaksiyon koordinatları boyunca umbrella potansiyelinin farklı yerleşimlerinde çok sayıda simülasyon çalıştırılır. Her simülasyonun λ örnek değerleri kaydedilir ve uygulanan potansiyel enerji ile temsil edilen popülasyon değerleri ortaya çıkarılır. Bu işlem yapılırken kullanılan algoritma genellikle Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemi (Weighted Histogram Analysis Method-WHAM)'dir.

WHAM algoritmasındaki adımlar için Şekil 4.1 incelenirse durum daha kolay anlaşılabilir. Simülasyonlarda kısıtlama terimi konulan atomların koordinatlarının reaksiyon yönündeki bileşenlerinin histogramları çıkartılır.



Şekil 4.1. US metodunun şematik gösterimi. Pencereleler dikey çizgiler ile ayırt edilmiştir. Noktalı oklar her pencerenin orta noktasını göstermektedir. Mavi daireler her simülasyon penceresi içindeki atomu temsil eder [Akhshi, 2013]

Dikkate alınan atom grupları hiçbir potansiyel etkisinde değilse çıkan histogramın/popülasyonun (aynı zamanda yoğunluk dağılımı olarak da adlandırılır) tepe noktası maksimumda bulunan bir Gauss dağılımı verir. Şekil 4.1’de bu dağılımlar görülmektedir. Fakat biyolojik molekülde umbrella potansiyelini koyduğumuz noktanın potansiyeli sıfırdan farklı olduğundan beklenen Gauss dağılımının maksimumu konulan pozisyonun potansiyeline bağlı olarak kayma gösterecektir. Yapılan WHAM analizinde ilk olarak eklenen harmonik potansiyel (biasing potansiyel olarak da adlandırılır) çıkartılmak suretiyle yoğunluk dağılımı potansiyelden arındırılır (aynı zamanda unbiasing olarak adlandırılır). Unbiased yoğunluk dağılımlarının birleştirilmesinden elde edilecek toplam yoğunluk dağılımı serbest enerji profilinin exponansiyelidir, logaritma almak suretiyle serbest enerji profili elde edilir.

Dağılımların her bir penceresi birleştirilerek potansiyel enerji eğrilerini oluşturmak gerekir. Bu basit bir işlem değildir çünkü her bir dağılımın enerjileri mutlak değildir. WHAM, bitişik pencerelerin simülasyonlarını örneklenen bölgelerde üst üste getirerek potansiyeli ölçeklemeye çalışır. Böylece reaksiyon koordinatı boyunca örneklenen uzay bölgesinde komşu simülasyonların özellikle üst üste binmesinde WHAM kullanmak zorunluluğu doğar. Ne yazık ki, örtüşmenin bu bölgeleri harmonik kısıtlamanın doğası gereği genellikle en az örneklenmiştir ve bu nedenle kesim noktaları hata içerebilir. Sonuç olarak, bu yöntem eğer dikkat edilmez ise PMF boyunca hataları biriktirir ve yanlış potansiyel eğrileri verebilir.

US yönteminin başarılı bir uygulaması için gerekli koşul, son derece uygun reaksiyon koordinatı ve biased potansiyeli seçimine bağlı olarak yeterli örneklemelerdir. İdeal bir biasing potansiyeli reaksiyon koordinatı boyunca düzgün örneklemeler sağlamalıdır. Bir serbest enerji profilinin şekli hakkında önceden bilgi varsa, serbest enerjinin negatifi biasing potansiyeli olarak kullanılabilir. Ne yazık ki, PMF profili çoğu durumda önceden bilinmemektedir ve biasing potansiyellerinin diğer formları kullanılmalıdır. Dolayısıyla tipik olarak, reaksiyon koordinatı boyunca her pencerede bir harmonik biasing potansiyeli uygulanır.

4.2. Streed Moleküler Dinamik Metodu

Streed Moleküler Dinamiği (SMD), biyomoleküler sistemlerin elastik özelliklerini (binding-unbinding) dinamik olarak inceleyen bir yaklaşımdır. Simülasyonlar, atomistik detayları koruyarak “unbinding” ya da “unfolding” sürecinde moleküler etkileşimlerin detaylarını ortaya koymakta ve böylece bu süreçlerin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında kısa bir zamanda önemli bilgiler vermektedir. SMD yönteminin US metoduna karşı üstünlüğü sistemin dengede olma şartının olmamasıdır. US metodunun uygulandığı sistemlerin dengede olması ve sistemin adyabatik olarak değişmesi gerekirken SMD uygulamasında sistem değişikliği daha hızlıdır. Dolayısıyla daha büyük konformasyon değişikliğine sebep olma olasılığı yüksektir.

SMD potansiyel profilinin enerji görünümünü tespit etmeye yarayan US ile kullanılan WHAM analiz yöntemi serbest enerji pertürbasyon metodu ile de yakından ilgilidir. US, genellikle daha küçük konformasyon değişiklikleri veya kimyasal bileşenlerin değişikliklerini içeren bir yöntemdir. US yönteminde doğru sonuçları elde etmek için oldukça yavaş bir şekilde değişiklikler uygulanır ve bu yüzden çok büyük bilgisayar kaynağı gerektirir. SMD simülasyonlarında da zayıf kuvvetler uygulandığında, zaman içinde değişimler çok yavaş olur ve US'e eşdeğer olur. Örneğin bir ligand bir enzimden çekildiğinde veya proteinin terminali unfoldingi başlatmak için gerdirildiğinde yani büyük değişimler başlatıldığında ve kuvvetler zaman içinde hızlı bir şekilde değiştirildiğinde sistemin dengeden önemli ölçüde sapacak olması bu yöntemin dezavantajıdır.

NAMD programında [Kale ve ark., 1999] SMD metodu çalışmaktadır. Bu amaçla SMD yapılan atom ya da atom grubunun merkezi yay sabiti k olan sanal bir yaya bağlanır ve yayın diğer ucu sabit bir v hızı ile çekilir. Atom ya da atom grubunun çekildiği yönde olması gerektiği koordinat ve bulunduğu koordinat arasındaki mesafeden o noktada yapılan iş hesap edilir. Bu işler Jarzynski metodu yardımı ile üstel olarak toplanıp serbest enerji elde edilir. Aşağıda Jarzynski metodu kısaca verilmiştir.

4.2.1. Jarzynski eşitliği

SMD dengede olmayan kuvvetleri kullanmasına karşın serbest enerji bir denge özelliğidir. Jarzynski eşitliği dengede olmayan bir simülasyondan serbest enerjiyi elde etme imkanı sağlar [Jarzynski, 1997]. Bir sistemde λ bir sürecin değişim parametresi olarak alınırsa $t = 0$ anında λ_0 ve t zamanında λ_t olur. Termodinamiğin ikinci yasası sistemde yapılan ortalama işin, $\langle W \rangle$, Helmholtz serbest enerjisinin ilk ve son durumları arasındaki farkından daha küçük olamayacağını belirtir.

$$\Delta F = F(\lambda_t) - F(\lambda_0) \leq \langle W \rangle \quad (4.4)$$

Ancak, Jarzynski iki durum arasındaki serbest enerji farkının iş ile ilişkili olacağını aşağıdaki eşitlik ile göstermiştir.

$$e^{-\beta\Delta F} = \langle e^{-\beta W} \rangle \quad (4.5)$$

Burada $\beta = 1/k_B T$ ve k_B Boltzmann sabiti, T sıcaklıktır.

4.3. Serbest Enerji Pertürbasyon Metodu

Serbest Enerji Pertürbasyon (free energy perturbation-FEP) teoremi hesaplamalı kimya alanına bilgisayarların girişinden uzun bir süre önce Zwanzig'e kadar uzanır [Zwanzig, 1954]. Pertürbasyon teorisi, tam olarak çözümlenemeyen bir problemin, bu probleme bağlı kesin olarak çözülebilen başka bir problemden yola çıkılarak yaklaşık bir çözüm elde etmek için matematiksel metotlar içeren teoridir. Kesin olarak çözümlenebilen problemin matematiksel tanımına küçük bir terim eklenerek eldeki problem formüle edilebiliyorsa, pertürbasyon teorisi uygulanabilir. Hedef sistemin hamiltonyeni, referans sisteminin hamiltonyeninin ve pertürbasyon teriminin toplamı ile temsil edilir.

FEP çatısı içinde, a ve b gibi iki alternatif durum arasındaki serbest enerji farkı aşağıdaki gibi ifade edilir [van Gunsteren, 1989; Zwanzig, 1954; Mark, 1998; Beveridge, 1989]

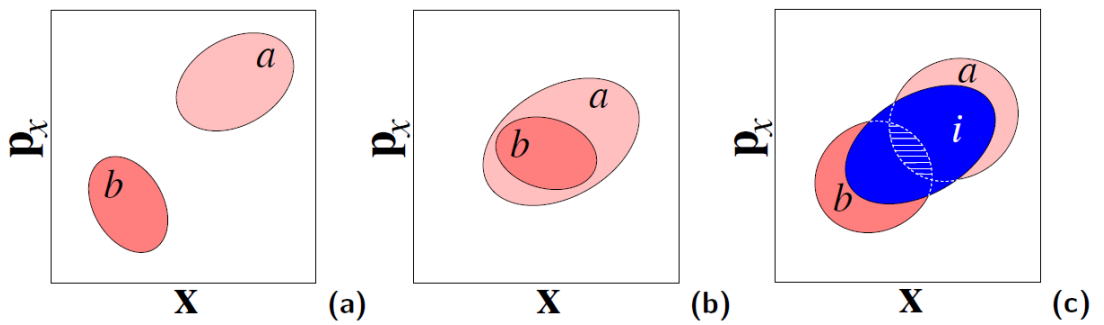
$$\Delta A_{a \rightarrow b} = -\frac{1}{\beta} \ln \langle \exp\{-\beta[H_b(x, p_x) - H_a(x, p_x)]\} \rangle_a \quad (4.6)$$

Burada $\beta = 1/k_B T$, k_B Boltzmann sabiti, T sıcaklıktır. $H_a(x, p_x)$ ve $H_b(x, p_x)$ sırasıyla a ve b durumlarında tanımlanan Hamiltonyenlerdir. $\langle \dots \rangle_a$ referans a durumunda ilk konfigürasyon temsili boyunca küme ortalamasını ifade eder.

Hedef durum b 'nin düşük enerji konfigürasyonunu ifade eden Eş. 4.6'nın yakınsaması aynı zamanda referans a durumunun da konfigürasyonudur. Bu nedenle sonuç, ilişkili kümelerin uygun bir şekilde örtüşmesidir (Şekil 4.2).

İki termodinamik durum arasındaki dönüşüm, a durumundan b durumuna doğru iyi tanımlanmış yol boyunca ara durumları, aralarında fiziksel olmayan bir dönüşüm serisi ile yer değiştirir. Bu yol genel uzunluk parametreleri ile karakterize edilir (Hamiltoniyeni oluşturan λ) ve bu yüzden serbest enerji a durumu ve b durum arasındaki bu parametrenin sürekli bir fonksiyonudur [King, 1993; Kirkwood, 1935; Beveridge, 1989; Mark, 1998].

Eğer a ve b durumlarının temsil ettiği kümeler tamamen farklıysa Eş.4.6 yakınsamayacaktır. Şekil 4.2a'da keskin bir zıtlık olursa, b durumunun konfigürasyonu, a durumunun karakteristik konfigürasyon kümesinin bir alt kümesi formundadır. Şekil 4.2b'de, Şekil 4.2a'da oluşan zorluklar, a durumundan b durumuna doğru ara durumların karşılıklı olarak örtüşmenin tanımlanması ile hafifletilebilir. Şekil 4.2c'de pratikte a ve b durumları için kinetik katkının özdeş olduğu kabulü düşünülmelidir.



Şekil 4.2. Bir FEP hesabının yakınsaması. (a) b durumunun konfigürasyonu, a durumunun karakteristik konfigürasyon kümesinin bir alt kümesi (b) a durumundan b durumuna doğru ara durumların karşılıklı olarak örtüşmesi (c) a ve b durumları için kinetik katkının özdeş olduğu durum

$$\Delta A_{a \rightarrow b} = -\frac{1}{\beta} \sum_{i=1}^N \ln \langle \exp \{ -\beta [H(x, p_x; \lambda_{i+1}) - H(x, p_x; \lambda_i)] \} \rangle_i \quad (4.7)$$

Burada, N ara durumların sayısıdır ya da Şekil 4.2’de görüldüğü gibi ilk ile son durumlar arasındaki penceredir.

4.4. Termodinamik İntegrasyon Metodu

Serbest enerji değişiminin hesaplanmasında kullanılan diğer bir yöntem termodinamik integrasyon (TI) metodudur. TI, izotermal ve izobarik koşullar altında ve $\lambda = 0$ ’dan $\lambda = 1$ ’e kadar bir geçişten kaynaklanan serbest enerji değişiminin, elde edilebilir işin en fazla miktarına eşdeğer olduğu gerçeğini kullanır [Beveridge, 1989].

$$\Delta G_{0 \rightarrow 1} = W_{0 \rightarrow 1} \quad (4.8)$$

İş, reaksiyon koordinatı λ ile ilgili potansiyel enerji fonksiyonunun negatif gradyantinin integre edilmesiyle hesaplanabilir:

$$W(\lambda) = \int_0^1 \left\langle \frac{-\partial \mathcal{H}}{\partial \lambda} \right\rangle \partial \lambda = \int_0^1 \langle \vec{F}(\lambda) \rangle \partial \lambda \quad (4.9)$$

Burada, λ bir konumsal koordinat olduğundan $\left\langle \frac{-\partial \mathcal{H}}{\partial \lambda} \right\rangle = \langle \vec{F}(\lambda) \rangle$, reaksiyon koordinat boyunca ilgili nesne üzerine sistem tarafından uygulanan ortalama kuvvettir. λ ile ilgili olarak serbest enerjinin türevi nispeten yumuşak ve lineer olduğunda, termodinamik integrasyon genellikle daha çok etkilidir. Bu durumda interpolasyon doğru olma eğilimindedir ve yüksek hassasiyetli sonuçlar elde etmek için daha az veri noktaları ve dolayısıyla simülasyonları gereklidir. λ ile ilgili potansiyel enerjinin türevi simülasyon boyunca hesaplanmalıdır.

Böylece, bir reaksiyon koordinatı boyunca hareket eden bir nesne üzerine uygulanan kuvvetleri kaydederek, bu işlem için serbest enerji değişiklikleri hesaplanabilir. Verilen serbest enerji fonksiyonu $A(\lambda)$, çok basit bir şekilde hesaplanan bir integralin bir başlangıç durumu $\lambda = 0$ ve bir son durumu $\lambda = 1$ arasındaki farktır.

$$\Delta A = \int_0^1 [\partial A(\lambda)/\partial \lambda] d\lambda \quad (4.10)$$

Burada

$$A(\lambda) = -kT \ln Z(\lambda) \quad (4.11)$$

ve $Z(\lambda)$

$$Z(\lambda) = \int \dots \int \exp[-\beta E(X^N, \lambda)] dX^N \quad (4.12)$$

şeklindedir. Bazı düzenlemelerle Eş. 4.13 bulunur.

$$A(\lambda)/\partial \lambda = \langle \partial E(X^N, \lambda)/\partial \lambda \rangle_\lambda \quad (4.13)$$

Burada λ alt indisi, λ olasılık fonksiyonu üzerinden ortalama bir küme olduğunu belirtir.

$$P(X^N, \lambda) = \frac{\exp[\beta E(X^N, \lambda)]}{\int \dots \int \exp[-\beta E(X^N, \lambda)]} \quad (4.14)$$

Yani, X^N konfigürasyonundaki sistemin bulunma olasılığı başlangıç ve son geçiş durumu arasındaki bir λ konumuna bağlıdır [Beveridge, 1989]. Sonuç olarak

$$\Delta A = \int_0^1 \langle \partial E(X^N, \lambda)/\partial \lambda \rangle_\lambda d\lambda \quad (4.15)$$

elde edilir. Moleküler simülasyonda Eş. 4.15'in, bazı termodinamik ilişkilerin kullanılmasıyla başlangıç ve son durumların arasındaki integrasyonunun doğrudan nümerik değerlendirilmesi termodinamik integrasyon olarak adlandırılır. λ , özellikle moleküler topografideki değişim terimlerinde çoğu makul yollarda başlangıç ve son durumlar arasındaki analitik sürekliliği belirlemek için kullanılabilir. Bu düşünce

serbest enerji simülasyonlarının kimyasal uygulamalarında genel bir kullanıma sahiptir. Özel ama sık karşılaşılan $E(X^N, \lambda)$ durumu için λ lineerdir.

$$E(X^N, \lambda) = (1 - \lambda)E_0(X^N) + \lambda E_1(X^N) \quad (4.16)$$

$$E(X^N, \lambda) = E_0(X^N) + \lambda \Delta E(X^N) \quad (4.17)$$

Burada

$$\Delta E(X^N) = E_1(X^N) - E_0(X^N) \quad (4.18)$$

şeklindedir. Sonra

$$\partial E(X^N, \lambda) / \partial \lambda = \Delta E(X^N) \quad (4.19)$$

ve

$$\Delta A = \int_0^1 \langle \Delta E(X^N) \rangle_\lambda d\lambda \quad (4.20)$$

dikkate alınmalıdır ki, $\Delta E(X^N)$ şu durumda λ 'dan bağımsız olmasına rağmen küme ortalaması, $P(X^N, \lambda)$, hala λ dağılımına bağlıdır. Çeşitli $\langle \Delta E(X^N) \rangle_\lambda$ için kesikli değerler veren, 0-1 aralığında kesikli λ değerlerinin üstüste gelmesiyle ilişkili bir seri simülasyon kurulur. λ üzerinde yardımcı integrasyon nümerik olarak gerçekleşir ve Eş. 4.20'deki integrasyon

$$\Delta A = \sum_{i=1}^N \langle \Delta E(X^N) \rangle_i \Delta \lambda_i \quad (4.21)$$

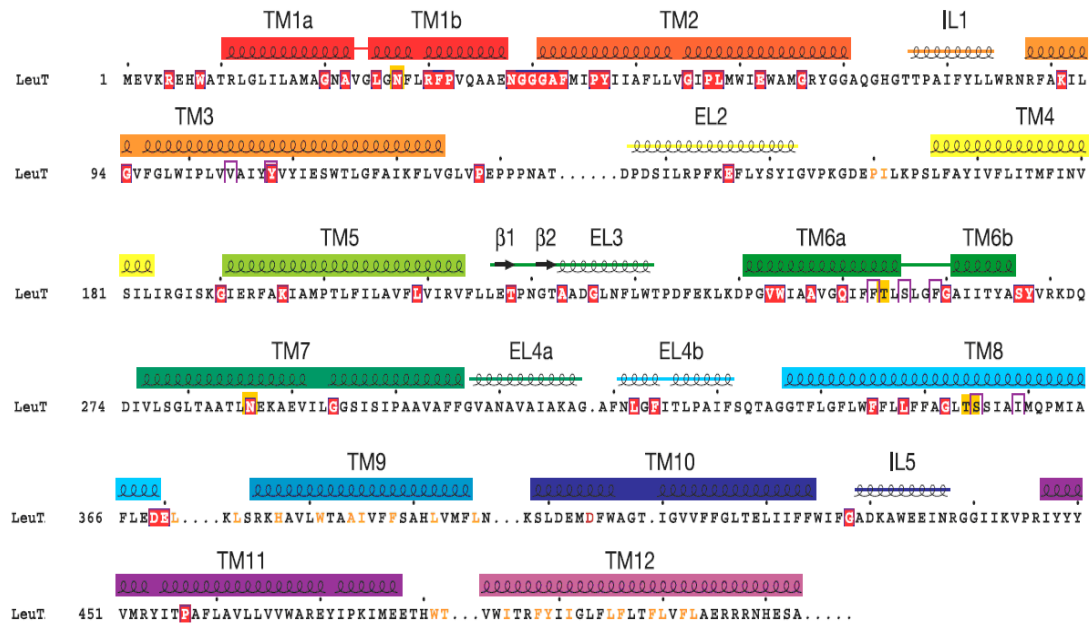
şeklinde toplamayla yer değiştirir. Burada i adım numaralarını sayar.

TI metodunda serbest enerji hesabı nümerik toplamaya dönüştüğünden bu metot yakınsama elde edilene kadar sürdürülebilir. Pratikte yapılan TI hesaplarında

Gaussian integrasyon metodunda 7λ değeri kullanılarak yukarıdaki toplama elde edilir. Enerji değerinin yakınsayıp yakınsamadığı daha kolay kontrol edilebilir. FEP metodundaki enerji değerlerinin yakınsayıp yakınsamadığı da yine TI hesabı ile test edildiğinden FEP hesabından daha inanılır ve pratik bir metottur.

5. LÖSİN TAŞIYICISI

Nörotransmitter taşıyıcılar birçok fizyolojik sürece katılırlar. Lössin taşıyıcısı (LeuT) hücre membranından çeşitli organik substratların ulaşımını sağlayan ve bu geçişi iyonların elektrokimyasal potansiyelini kullanarak yapan transmembran proteinler sınıfına ait bir hücre zarı taşıyıcısıdır. Ökaryotik organizmalarda, bu proteinler nöral sinyaller için çok önemli bir rol oynar ve bunların bozuklukları birçok sinirsel hastalıkların nedeni olarak görülmektedir. Özel bir öneme sahip monoamin (serotonin, dopamin ve norepinefrin) taşıyıcıları, nörotransporter sodyum simport (NSS) ailesindendir ve beyinde sinyalden sonra biyogenik monoaminlerin geri alınımını sağlarlar [Celik ve ark., 2008]. Monoamin taşıyıcılarının fizyolojik bozuklukları; depresyon, obsesif kompulsif, parkinson ve epilepsi gibi hastalıkları ortaya çıkarabilir [Torres ve ark., 2003; Hahn ve ark., 2002; Masson ve ark., 1999; Owens ve ark., 1994]. Hücre zarından NSS'ler tarafından monoaminlerin taşınımı iyonik gradient ile sağlanır.



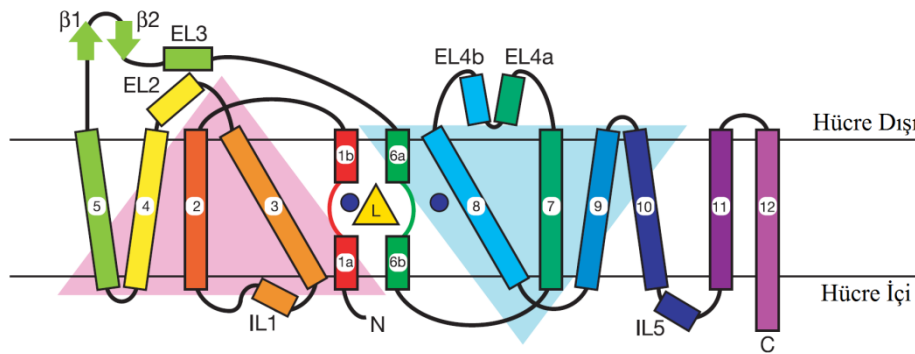
Şekil 5.1. LeuT'nin aminoasit sekans dizilimi ve α helikslerin gösterimi

Taşıyıcı mekanizmaları ve substrat/inhibitör seçiciliğinin moleküler ayrıtısı, aslında detaylı yapısal bilgilerin eksikliğinden dolayı yeterince anlaşılmamıştır. *Aquifex*

aeolicus bakterisine ait LeuT'nin X-ışını kristal yapısı 2005 yılında Yamashita ve arkadaşları tarafından çözülmüştür [Yamashita ve ark., 2005]. LeuT'nin aminoasit sekans dizilimi Şekil 5.1'de görülmektedir.

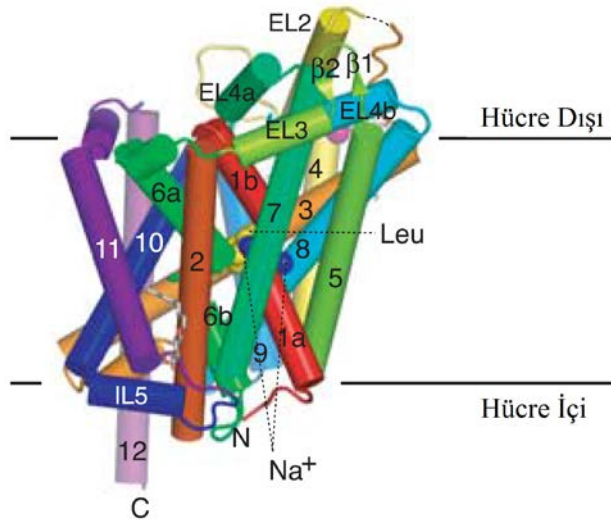
5.1. LeuT'un Yapısı

LeuT'nin kristal yapısının, kristallografik iki eksenli bir dimer olduğu bilinmektedir [Yamashita ve ark., 2005]. Her monomer 70 Å uzunluğunda ve 48 Å çapındadır ve 12 adet transmembran (TM) heliksel bölgeden oluşmaktadır (Şekil 5.2). TM1-TM5 ve TM6-TM10 bölgeleri arasında ters bir tekrar motifi bulunmaktadır. *Aquifex aeolicus*, LeuT'nin izole edildiği bakteri, yavaş bir nakil sırasında oda sıcaklığında Leu aminoasidi için güçlü bir bağlanma afinitesi gösteren, bir termofilik organizmadır [Celik ve ark., 2008].



Şekil 5.2. LeuT'nin ikincil yapısının gösterimi

Her monomerde bir aminoasit (Leu) ve iki sodyum iyonu kapalı yapıdaki farklı alanlara bağlanır (Şekil 5.3). Leu aminoasitinin bağlanma bölgesinin en göze çarpan özelliği Leu α amin ve α karboksil grupları ile TM1 ve TM6 bölgelerindeki ana zincir atomları arasında bağ olmasıdır. Özellikle, TM1a ve TM6a sonundaki negatif yükler Leu amin grubuna yakın ve TM1b sonundaki pozitif yükler de karboksil grubuna yakındır. Ayrıca, Leu bağlama bölgesi tamamen susuz olup, en yakın su molekülü ile Leu karbon atomu uzaklığı 9 Å kadardır [Yamashita ve ark., 2005].



Şekil 5.3. LeuT yapısının gösterimi. Membran düzleminde 3 boyutlu görünümü

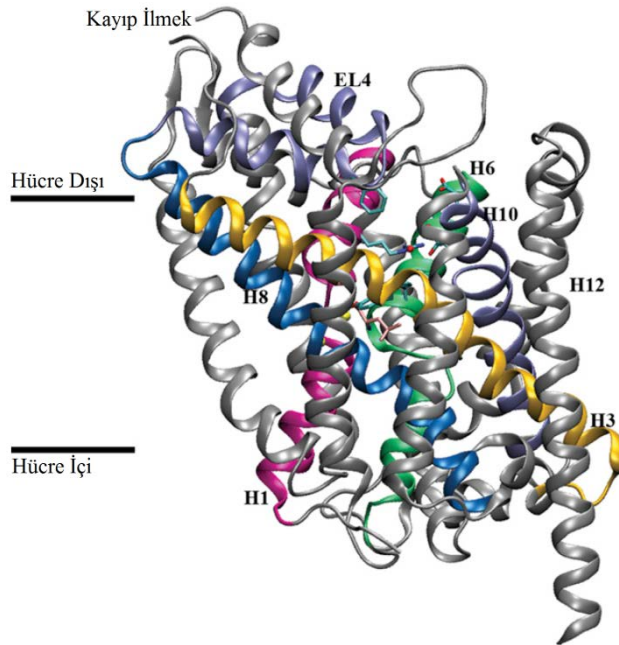
5.2. LeuT Membran Protein Sisteminin Kurulması

LeuT'nın başlangıç konfigürasyonu olan 2A65 kodlu protein yapısı, proteinlerin koordinatlarının depolandığı PDB'den indirildi. 2A65 kodlu yapı incelendiğinde 5-132 ve 135-515 rezidüleri protein yapısını, rezidü 601 Leu aminoasitini, 701-705 rezidüleri 5 adet deterjan molekülünü, 751-752 rezidüleri 2 adet sodyum iyonunu, 753 rezidüsü klor iyonunu ve 801-1010 rezidüleri 210 adet su molekülünü oluşturmaktadır. PDB'den indirilen 2A65 nolu proteinin Fasta sekans kodları eksik olan Asn-133 ve Ala-134 rezidülerinin (Şekil 5.4) tamamlanması için I-TASSER programında kullanılmıştır. Çizelge 5.1'de Fasta sekans kodları gösterilmektedir. Burada kırmızı renk ile gösterilen N ve A sırasıyla Asn-133 ve Ala-134 rezidülerini göstermektedir.

Yan zincirlerin eksik olan atomları ve hidrojen atomlarını tamamlamak için VMD [Humphrey ve ark., 1996] programının psfgen eklentisi kullanılmıştır. Ayrıca protein ve lipid moleküllerinin parameteleri için Charmm 22 Cmap düzeltmeli topology dosyası kullanılmıştır.

Çizelge 5.1. 2A65 nolu protein yapının Fasta kodları

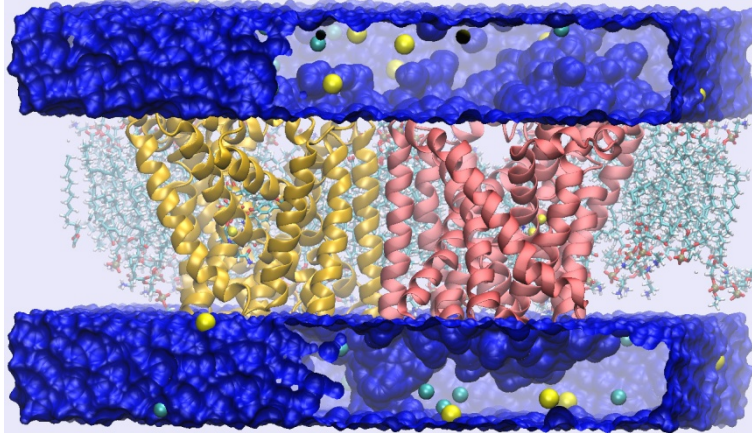
```
>2A65 SEKANS
MEVKREHWATRLGLILAMAGNAVGLGNFLRFPVQAAENGGAFFMIPYIIAFLLVGI
PLMWIEWAMGRYGAQGHGTTTPAIFYLLWRNRFKILGVFGLWIPLVVAIYYVYI
ESWTLGFAIKFLVGLVPEPPPNATDPSILRPFKEFLYSYIGVPKGDEPILKPSLFAYI
VFLITMFINVLSIRGISKGIERFAKIAMPITLFI LAVFLVIRVFLLETPNGTAADGLNFL
WTPDFEKLKDPGVWIAAVGQIFFTSLGFGAIIITYASYVRKDQDIVLSGLTAATLNE
KAEVILGGSISIPAAVAFFGVANAVAIKAGAFNLGFITLPAIFSQTAGGTFLGFLWF
FLLFFAGLTSSIAIMQPMIAFLEDELKLSRKHAVLWTA AIVFFSAHLVMFLNKSLE
MDFWAGTIGVVFVGLTELIIFFWIFGADKAWEENRGGIIVPRIYYYVMRYITPAFL
AVLLVWAREYIPKIMEETHWTVWITRFYIIIGLFLFLTLVFLAERRRNHESAGTLV
PR
```



Şekil 5.4. LeuT yapısında eksik olan Asn-133 ve Ala-134 rezidülerinin protein yapıdaki yerleri kayıp ilmeç olarak gösterilmiştir

Protein lipit sisteminin oluşturulma işleminde, VMD [Humphrey ve ark., 1996] programının membran kısmından lipit bilayer olarak “palmitoyl-oleoyl phosphatidyl ethanolamine” (POPE) lipitleri seçilerek $90 \times 120 \text{ Å}$ boyutunda xy düzleminde bir lipit bilayer oluşturuldu ve protein bu lipit yapı içine gömüldü. Ardından sistemin hücre içi ve hücre dışı kısımlarına su eklendi. Son olarak $0,2 \text{ Mol/l}$ 'lik fizyolojik konsantrasyona uygun olarak soydum ve klor iyonları eklenerek yapı biyolojik hücre zarı modeli haline getirildi [Celik ve ark., 2008]. Bu işlemler sonucunda protein

ligant sistemi, 15270 adet su molekülü, 157 adet lipid zinciri, 25 Na ve Cl çifti olmak üzere toplamda 81955 atomdan oluşan ve boyutu $90 \times 120 \times 85 \text{ Å}^3$ olan nötral bir yapıdadır. Sistemin tamamının bir görüntüsü Şekil 5.5'te verilmiştir.



Şekil 5.5. Kurulan LeuT sisteminin görünümü

5.3. Simülasyon Detayları ve Sistemin Dengeye Getirilmesi

Protein ligant sistemi kurulduktan sonra öncelikle yapının dengeye gelmesi gerekmektedir. Bu işlem sırasında taşıyıcının omurga ve diğer ağır atomlarına harmonik kuvvetler (konstraintler) uygulandı. Buradaki amaç proteinin lipid ve su atomlarıyla birlikte adapte olması ve sistemin NPT simülasyon koşullarını sağlamasıdır. Protein üzerindeki harmonik kuvvetler belirli zaman aralıklarında azaltıldı ve k kuvvet sabiti $0,1 \text{ kcal/mol/Å}^2$ olana kadar simülasyon devam ettirildi. Çizelge 5.2'de MD simülasyon zamanı; K_{bb} protein yapının omurga atomlarına; K_{noh} yine protein yapının hidrojen atomu hariç yan zincir atomlarına; $K_{ion\&LeuT}$ iyonlara ve Leu aminoasidine x, y ve z yönünde uygulanan kuvvet sabitini gösterirken P , C214 ve C314(z) lipidin fosfor, 214 ve 314 numaralı karbon atomlarına z yönünde uygulanan kuvvet sabiti değerini göstermektedir. Çizelge 5.2'de görüldüğü üzere sistem yavaş yavaş serbest bırakıldı ve toplamda 4,1 ns' lik simülasyon yapıldı. Bu süre zarfında sistem sıcaklığı $300^\circ K$ ve basınç 1 atm 'ye getirildi.

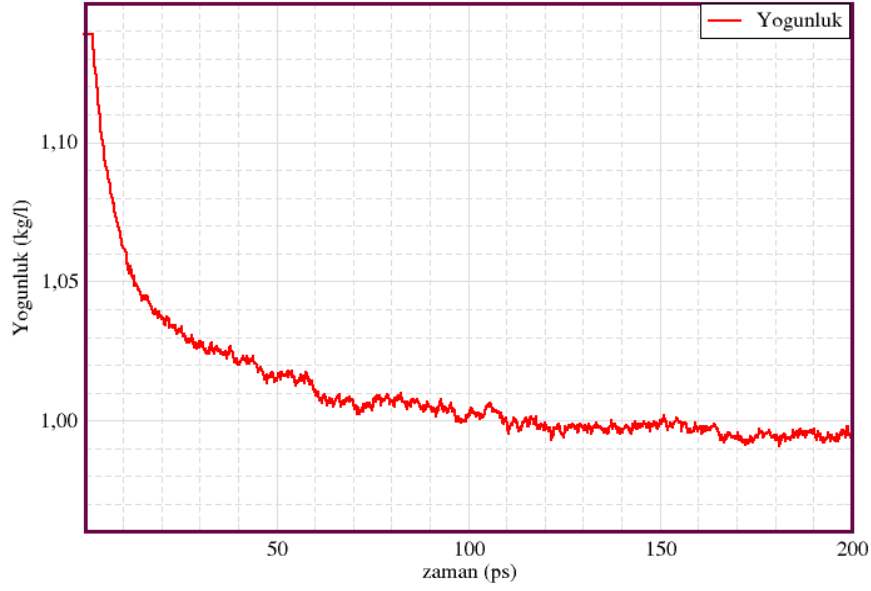
Tüm simülasyonlar Cmap kuantum mekaniksel düzeltme terimini içeren Charmm22 kuvvet alanı (force field) kullanılarak moleküler dinamik programı NAMD 2.7 ile yapıldı. Başlangıçta 20 ps minimizasyon işlemi yapıldı. Bu işlem kötü etkileşim uzaklıkları (bad contact) olarak adlandırılan uzaklıkları ortadan kaldırmaktadır. Protein ligant yapısının dengeye gelme işleminde yukarıda da bahsedildiği üzere 4,1 ns'lik simülasyon yapıldı. Protein ligant sistemi dengeye getirildikten sonra 5 ns boyunca kısıtlama kuvveti olmaksızın simülasyon devam ettirildi. Bu süreçte uzun menzilli elektrostatik potansiyelin hesaplanması için Particle Mesh Ewald (PME) algoritması kullanan NPT topluluğunda periyodik sınır şartlarında uygulandı. Langevin Piston metodu, 50 fs piston bozulumu ve 100 fs piston periyodu ile 1 atm basınç sağlamak için kullanılmıştır. Van der Walls etkileşimlerinde kesme mesafesi 12 Å ve kayma mesafesi 10 Å'da tutuldu.

Çizelge 5.2. LeuT sisteminin dengeye gelme işleminde uygulanan kuvvet sabitleri ve kuvvet sabitlerinin uygulandığı süreler

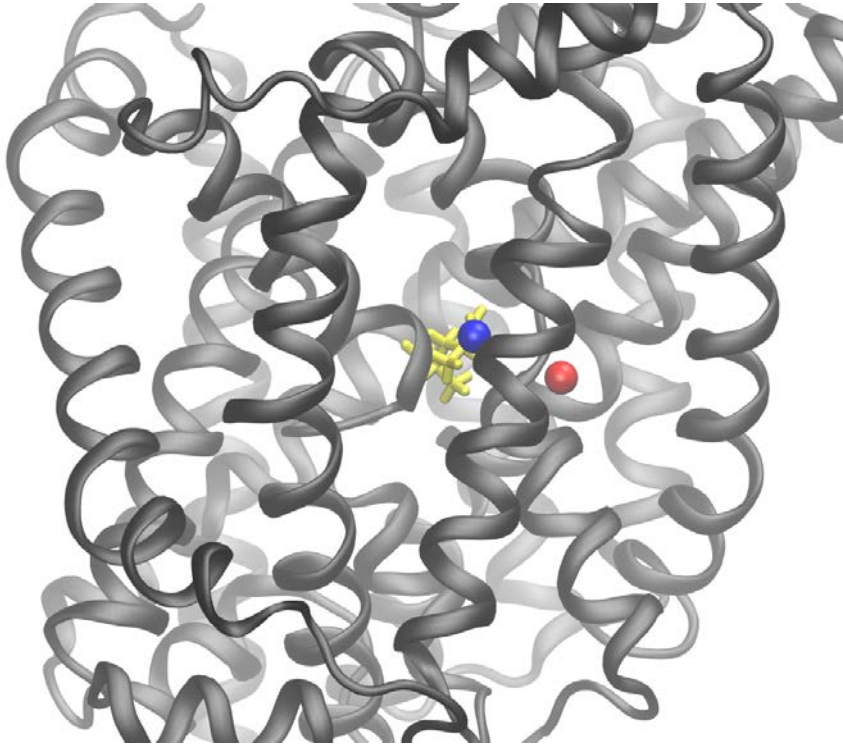
MD Zamanı (fs)	K_{bb} (kcal/mol/Å ²)	K_{noh} (kcal/mol/Å ²)	$K_{ion\&LeuT}$ (kcal/mol/Å ²)	P, C214 ve C314 (z) (kcal/mol/Å ²)
500000	100	50	5,0	3,0
300000	100	50	5,0	3,0
300000	75,0	33	5,0	3,0
300000	50,0	25	5,0	1,0
300000	25,0	12	3,0	0,5
300000	12,0	6,0	1,0	0,2
300000	6,00	3,0	0,5	0,1
300000	3,00	1,0	0	0,1
500000	1,00	0	0	0,1
500000	0,50	0	0	0,1
500000	0,10	0	0	0,1

Sistemi oluşturan protein ve lipid atomlarının yoğunluğu suyun yoğunluğundan çok farklı olmadığından toplam yoğunluğun yaklaşık 1,0 kg/l olduğunda sistemin NPT koşullarında dengeye geldiğini söylememiz mümkündür. Şekil 5.6'da yoğunluğun zamana bağlı değişimi verilmekte ve yaklaşık 1,0 kg/l olduğunda artık değişmediği

görülmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi sistemin dengeye geldiğini söylememiz mümkündür.



Şekil 5.6. Sistemin yoğunluk-zaman grafiği



Şekil 5.7. Protein (gri) yapıda Na1 ve Na2 bağlanma bölgelerindeki Na⁺ iyonları (sırasıyla kırmızı ve mavi) ve Leu aminoasitinin (sarı) görünümü

Protein lipit sistemi dengeye getirildikten sonra, 10 *ns* MD simülasyonu yapıldı. Burada sistemin kararlılığı, bozulup bozulmadığı incelendi. Bunu anlamak için protein kristal yapıda bulunan 2 adet sodyum iyonunun ve Leu aminoasitinin bağlanma yerleri incelendi (Şekil 5.7). Hesaplanan koordinasyon değerleri 10 *ns*'lik trajektöri verisinin ortalaması olarak alındı.

5.4. Sodyum İyonlarının Bağlanma Bölgeleri

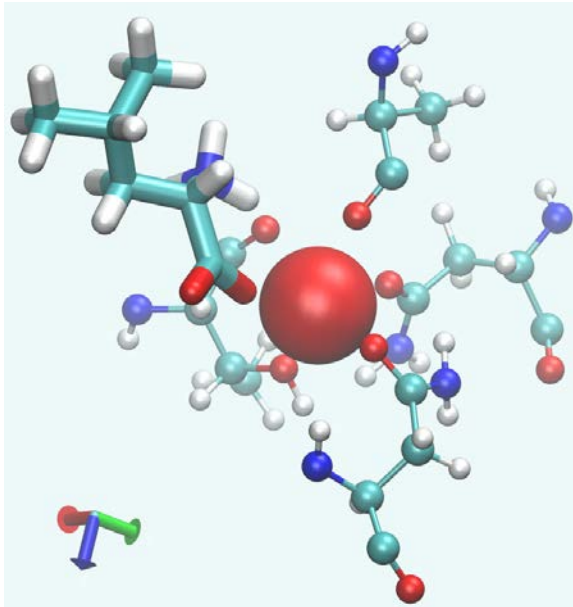
LeuT yapısının kararlı olabilmesinde Leu aminoasitinin bağlanmasında ve TM1 ve TM6 yapısının çözülmemesinde iki sodyum iyonunda anahtar bir rol üstlenmektedir. Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonunun oktahedral bir koordinasyonu bulunmaktadır. Bu koordinasyon Leu aminoasitinin karboksil oksijeni, Ala22 (TM1) ve Thr254 (TM6) rezidülerinin karbonil oksijenleri, Asn27 (TM1) ve Asn286 (TM7) rezidülerinin yan zincir karbonil oksijenleri ve Thr254 (TM6) rezidüsünün hidroksil oksijeni tarafından sağlanmaktadır. Na2 bağlanma bölgesi TM1 ve TM8 arasındaki bölgede Na1 bağlanma bölgesinden yaklaşık 7,0 Å ve bağlı Leu aminoasitinin alfa karbonundan da 5,9 Å uzaklıktadır. Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonunun trigonal bi-pramidal koordinasyonu, Gly20 (TM1), Val23 (TM1) ve Ala351 (TM8) rezidülerinin karbonil oksijenleri ve Thr354 (TM8) ve Ser355 (TM8) rezidülerinin hidroksil oksijenleriyle sağlanır. Özellikle hem Na1 hem de Na2 bağlanma bölgelerindeki Na⁺ iyonları için koordinasyon, proteinlerdeki kısmi yükler ile bağlı Leu aminoasitinin karboksil grubu tarafından oluşturulur.

5.4.1. Sodyum 1 bağlanma bölgesi

Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonunun protein içinde 6 tane koordinasyon etkileşimi vardır. Bunlar yukarıda belirtilmiş ve Şekil 5.8'de gösterilmiştir. Kristal yapıda verilen ve MD hesaplamaları sonucunda bulunan atomlar arası uzaklık Çizelge 5.3'de verilmiştir. Çizelge 5.3'de de görüldüğü gibi Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu için kristal veriler ve MD sonucunda elde edilen değerler birbiriyle oldukça uyumludur.

Çizelge 5.3. Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu atomlar arasındaki mesafeler

<i>Etkileşmeler</i>		<i>Kristal Data (Å)</i>	<i>Simülasyon (Å)</i>
Na ⁺	ALA22-O	2,27	2,74
	ASN27-OD1	2,19	2,28
	THR254-O	2,34	2,40
	THR254-OG1	2,30	2,32
	ASN286-OD1	2,54	2,53
	LEU601-OT1	2,38	2,29



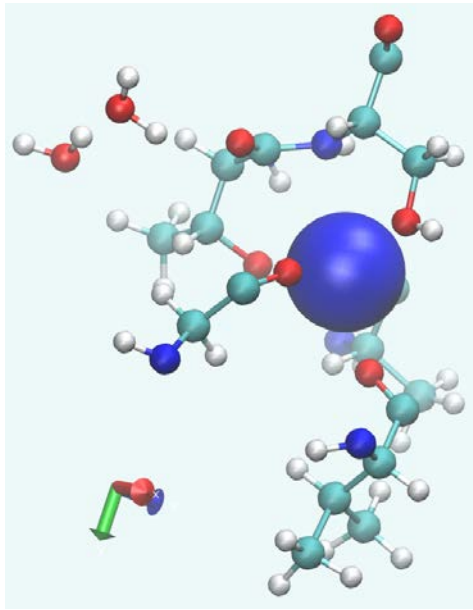
Şekil 5.8. Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu rezidüler

5.4.2. Sodyum 2 bağlanma bölgesi

Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonunun protein içinde 5 adet koordinasyon etkileşimi vardır. Bunlar yukarıda belirtilmiş ve Şekil 5.9’da gösterilmiştir. Kristal yapıda ve MD hesaplamaları sonucunda atomlar arası uzaklık Çizelge 5.4’de verilmiştir. Çizelge 5.4’de de görüldüğü gibi Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu için kristal veriler ve MD sonucunda elde edilen değerler birbirleriyle oldukça uyumludur.

Çizelge 5.4. Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu atomlar arasındaki mesafeler

	<i>Etkileşmeler</i>	<i>Kristal Data (Å)</i>	<i>Simülasyon (Å)</i>
Na ⁺	GLY20-O	2,27	2,74
	VAL23-O	2,19	2,28
	ALA351-O	2,34	2,40
	THR354-OG	2,30	2,32
	SER355-OG	2,54	2,53



Şekil 5.9. Na2 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile koordinasyonda bulunduğu rezidüler

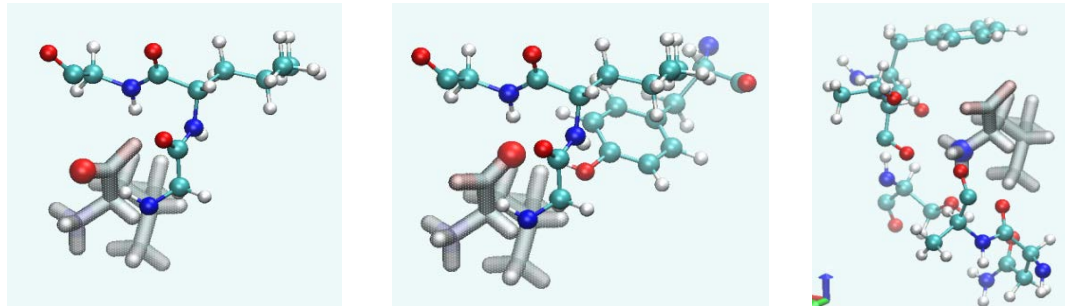
5.5. Leu Aminoasitinin Bağlanma Bölgesi

Leu aminoasitindeki amin grubu, Ala22 (TM1), Phe253 (TM6) ve Thr254 (TM6) rezidülerinin ana zincirindeki karbonil oksijenlerle ve Ser256 (TM6) rezidüsünün yan zincirindeki hidroksil grubuyla koordine olmaktadır. Leu aminoasitinin karboksil grubu, Na1 bağlanma bölgesindeki sodyum iyonu ile Leu25 (TM1) ve Gly26 (TM1) rezidülerinin amit azotu ve Try108 (TM3) rezidüsünün hidroksil grubu ile koordine olmaktadır. Try108 rezidüsünün hidroksili ile Leu25 rezidüsünün ana zincir amit azotu bir hidrojen bağı oluştururlar. Öyleki bu etkileşim TM1 bölgesi yakınındaki düzensiz yapının kararlı durmasına yardımcı olur. Şekil 5.10'da görüldüğü üzere Leu

aminoasidinin protein içinde 13 tane koordinasyon etkileşimi vardır. Kristal yapıda ve MD hesaplamaları sonucunda atomlar arası uzaklık Çizelge 5.5'te verilmiştir. Çizelge 5.5'te görüldüğü gibi Leu aminoasiti için kristal veriler ve MD sonucunda elde edilen değerler birbirleriyle oldukça uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 5.5. Leu aminoasitinin koordinasyonda bulunduğu atomlar ile mesafeleri

<i>Etkileşmeler</i>		<i>Kristal Data (Å)</i>	<i>Simülasyon(Å)</i>
LEU601-N	ASN21-O	3,69	3,55
LEU601-N	ALA22-O	2,99	3,06
LEU601-OT1	GLY24-N	3,73	3,68
LEU601-OT2	GLY24-N	3,78	3,84
LEU601-OT1	LEU25-N	4,58	4,49
LEU601-OT2	LEU25-N	3,12	3,05
LEU601-OT1	GLY26-N	3,42	3,53
LEU601-OT2	GLY26-N	2,77	2,87
LEU601-OT2	TRY108-OH	2,66	2,69
LEU601-N	PHE253-O	2,77	2,78
LEU601-N	THR254-O	3,06	2,93
LEU601-N	SER256-OH	2,75	2,79
LEU601-OT1	Na ⁺ iyonu	2,38	2,29



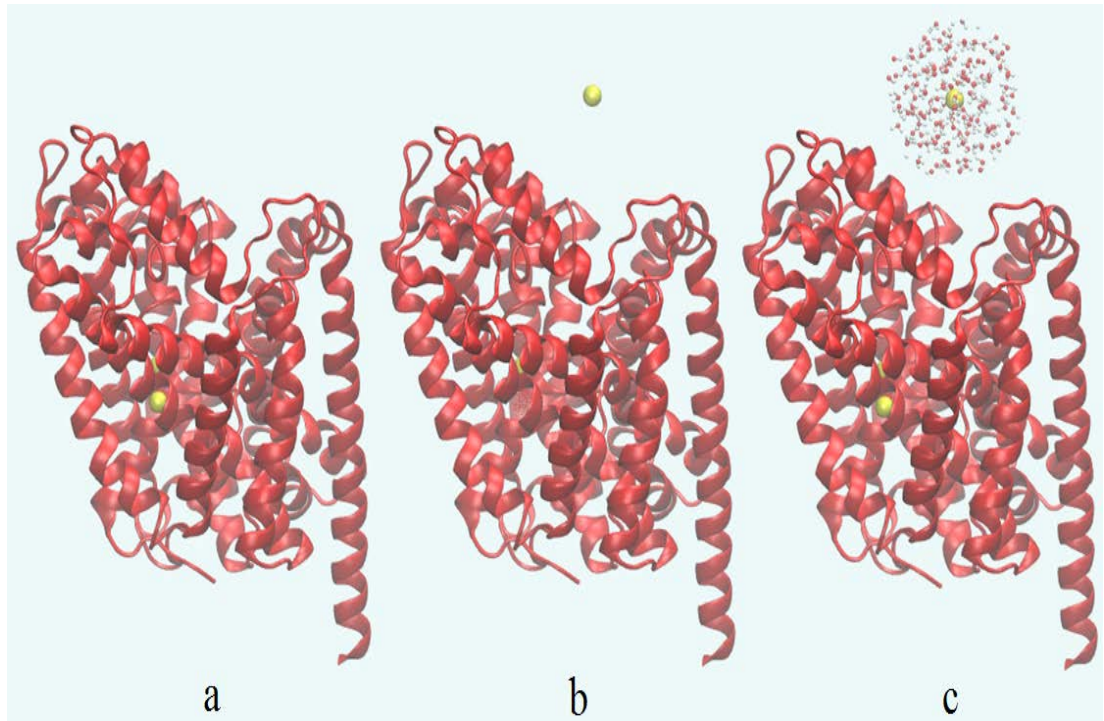
Şekil 5.10. Leu aminoasitinin farklı atomlarının etkileşimde bulunduğu rezidüleri

5.6. Serbest Enerji Hesaplamaları

Sodyum potasyum pompasının nasıl çalıştığı bilinirken taşıyıcılardaki iyon taşınım mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı iyon ve ligantın taşıyıcıya bağlanma mekanizmasını enerji hesapları ile anlaşılır yapmaktır. Bu amaçla iyon ve ligant için serbest enerji hesapları yapıldı. İyon ve ligantın bağlanma

mekanizmasının anlaşılması için bu iyon ve ligantın proteine hangi yoldan bağlandığının bulunması gerekmektedir. Bu türden hesaplar iyon kanalları için bir boyutlu reaksiyon koordinatlarında PMF hesabı yaparak defalarca yapıldı. Lakin buradaki durum iyon kanallarından oldukça farklıdır ve iyon yolunun 3 boyutlu uzayda aranması oldukça zor bir iştir. Ayrıca yola bağlı bir PMF hesabı yapılabilmesi için yapının açık formunda bilinmesi gereklidir. Buna karşın iyonun ve ligantın bağlanma pozisyonu gayet iyi bilinmektedir. Dolayısıyla iyonun yığın (bulk) ve bağlanma pozisyonu arasındaki enerji farkını serbest enerji hesabıyla kolayca belirlememiz mümkündür.

Serbest enerjinin gerek metodik gerekse pratik MD simülasyonunda nasıl hesap edildiği Bölüm 3 ve Bölüm 4'te oldukça detaylı bir şekilde verilmiştir. Bu kesimde LeuT için yaptığımız serbest enerji hesaplarını özetleyeceğiz. Serbest enerji hesaplamasında sistem şu şekilde işlemektedir.



Şekil 5.11. (a) Simülasyon başlangıcında (b) Simülasyon sonunda (c) Simülasyon sonunda Na iyonu etrafındaki 10 Å'luk su kabuğu

Na^+ iyonu Na1 bağlanma pozisyonunda bulunmaktadır. Protein dışında farklı bir yerde etrafında 10 Å'lık bir su kabuğu bulunan ve başka bir iyon tarafından etkilenmeyen bir bölge seçildi. Simülasyon başlangıcında Na1 bağlanma pozisyonunda Na^+ iyonu varken simülasyon sonunda su molekülüne dönüşmüş, başlangıçta yukarıda seçilen bölge içerisindeki bir su molekülü Na^+ iyonuna dönüştürülmüştür. Böylelikle Na1 bağlanma pozisyonundaki bir iyonun sistem dışına çıktığında oluşan enerji farkı bulunmuş olacaktır. Bununla Na1 pozisyonuna bağlanan bir iyonun bağlanma enerjisini elde ederiz (Şekil 5.11).

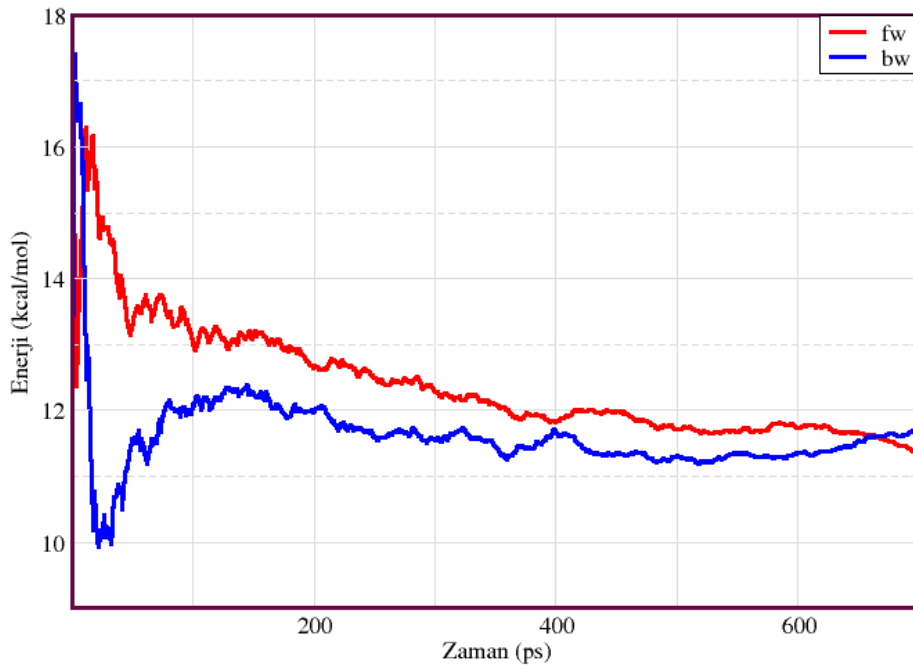
Serbest enerji hesaplaması:

1. Her iki sodyum iyonu da bağlanma pozisyonunda iken Leu aminoasiti (ligant) için;
2. Na2 bağlanma bölgesinde Na^+ iyonu bulunduğunda Na1 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için;
3. Na2 bağlanma bölgesine Na^+ iyonu yerine su molekülü konularak Na1 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için;
4. Na1 bağlanma bölgesinde Na^+ iyonu bulunduğunda Na2 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için;
5. Na1 bağlanma bölgesine Na^+ iyonu yerine su molekülü konularak Na2 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için olmak üzere toplam 5 farklı durum için yapıldı.

Serbest enerji hesabı TI metodu ile yapıldı. TI metodunun serbest enerji hesabındaki avantajı istenildiği kadar simülasyona devam etme olanağını sağlamasıdır. FEP ya da TI yapmak arasında çok bir zaman farkı yoktur. TI metodu ile 5 farklı durum için iyon/ligant bağlanma enerji grafikleri Şekil 5.12-5.16'da gösterilmektedir.

Şekil 5.12'de kırmızı ile gösterilen eğri bağlanma pozisyonundaki ligantın sulara dönüşürken yığındaki suların liganda dönüştüğü durumdaki enerjiyi vermektedir (forward adımı). Benzer durum Şekil 5.13-5.16'da da geçerlidir. Burada kırmızı ile gösterilen eğri bağlanma pozisyonundaki iyonun suya dönüşürken yığındaki suyun iyonla dönüştüğü durumdaki enerjiyi vermektedir (forward adımı). Mavi renkli

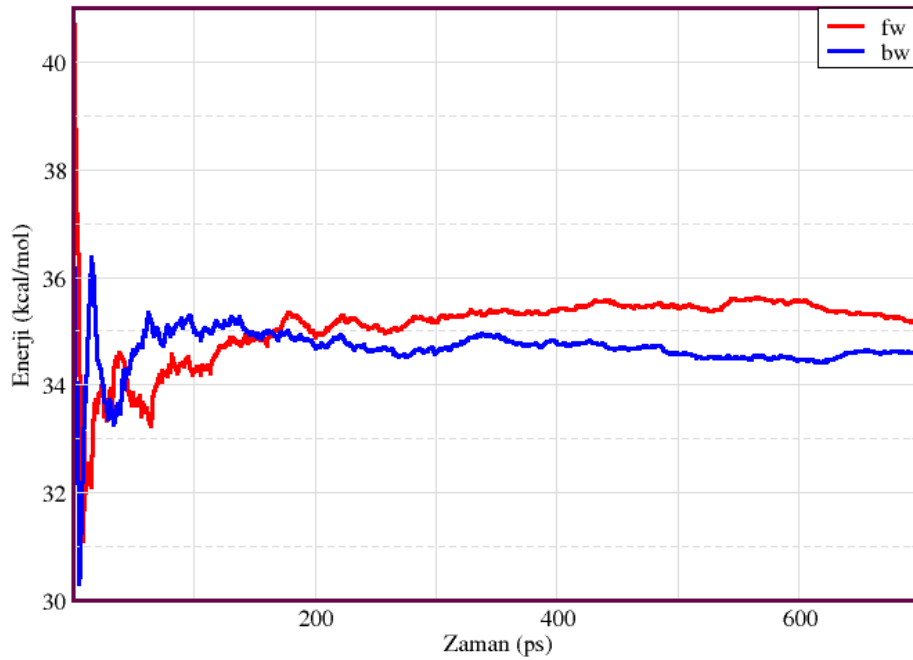
eğrilerde ise tam tersi durum geçerlidir. Şekil 5.12 için yığındaki ligant sulara dönüşürken bağlanma bölgesindeki sular liganta dönüşmektedir. Yine benzer durum Şekil 5.13-5.16'da da geçerlidir. Burada yığındaki iyon suya dönüşürken bağlanma pozisyonundaki su iyonla dönüşmektedir (backward adımı). Dolayısıyla bu türden hesaplamalar ancak TI metoduyla yapılabilir.



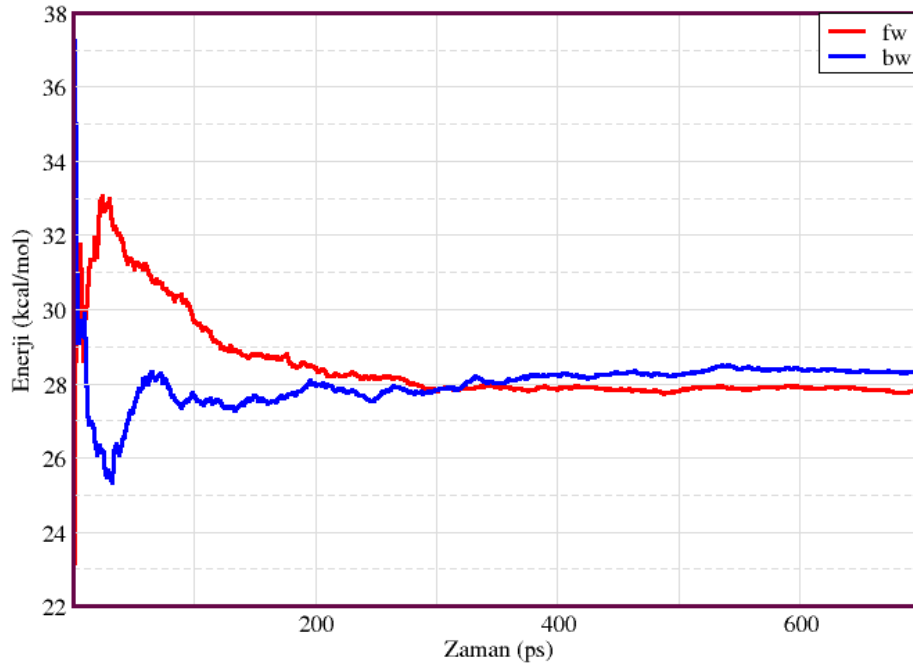
Şekil 5.12. Leu aminoasiti için TI (enerji-zaman) grafiği



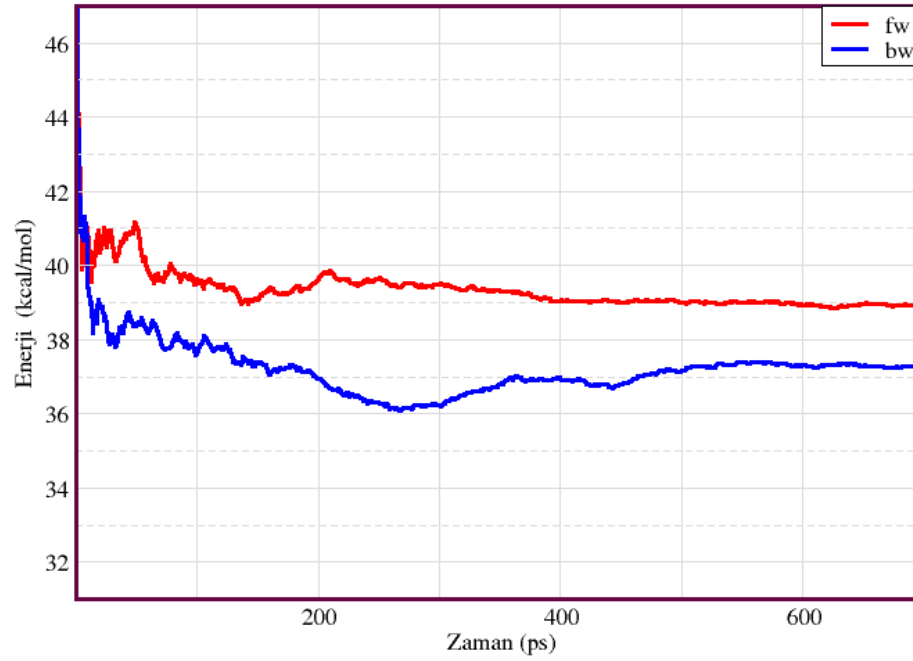
Şekil 5.13. Na2 bağlanma bölgesinde Na^+ iyonu bulunduğunda Na1 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği



Şekil 5.14. Na2 bağlanma bölgesine Na^+ iyonu yerine su molekülü konularak Na1 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği



Şekil 5.15. Na1 bağlanma bölgesinde Na^+ iyonu bulunduğunda Na2 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği



Şekil 5.16. Na1 bağlanma bölgesine Na^+ iyonu yerine su molekülü konularak Na2 bağlanma bölgesindeki Na^+ iyonu için TI (enerji-zaman) grafiği

Grafiklerden elde edilen iyon ve ligant bağlanma enerjileri Çizelge 5.6'da gösterilmiştir. Forward ve backward hesaplamaları arasında genelde uyum görülmektedir ve maksimum $1,6 \text{ kcal/mol}$ değerinde bir histerisis etki bulunmaktadır. Çizelge 5.6'nın son kolonunda forward ve backward hesaplamaların ortalaması görülmektedir.

Çizelge 5.6. LeuT taşıyıcısında TI yöntemiyle iyon ve ligant bağlanma enerjileri

İyon/Ligant	$-\Delta G$ (fw) (kcal/mol)	$-\Delta G$ (bw) (kcal/mol)	$-\Delta G$ (ort) (kcal/mol)
Leu Aminoasiti	11,5	11,7	11,6
Na1 (Na2 mevcut)	26,6	25,3	25,9
Na2 (Na1 mevcut)	35,1	34,6	34,8
Na1 (Na2 mevcut değil)	27,9	28,3	28,1
Na2 (Na1 mevcut değil)	38,9	37,3	38,1

Bu değerlerden yola çıkılarak taşıyıcı içerisine ilk Na^+ iyonu, Na2 bağlanma pozisyonuna yerleşmektedir. Zira en büyük bağlanma afinitesi, $\sim 38 \text{ kcal/mol}$, Na2 pozisyonuna aittir. İkinci olarak tekrar Na^+ iyonu taşıyıcı içine girmekte Na1 bağlanma pozisyonuna yerleşmektedir, bağlanma afinitesi $\sim 26 \text{ kcal/mol}$ olarak hesaplanmıştır. Son olarak Leu aminoasidi taşıyıcı içinde ki pozisyonuna yerleşmektedir, bağlanma afinitesi $\sim 12 \text{ kcal/mol}$ 'dür. İyon ve ligant taşıyıcıya bağlandıktan sonra taşıyıcıda bir konformasyon değişikliği olmakta ve taşıyıcının hücre dışı bölgedeki kapısı kapanmakta aynı zamanda da hücre içi bölgedeki kapısı açılmaktadır. Taşıyıcıdaki bu konformasyon değişikliği iyon ve ligandın bağlanma afinitelerini değiştirmekte, Na1 pozisyonuna bağlanan Na^+ iyonu taşıyıcıyı ilk olarak terk etmektedir. Sonra sırasıyla Na2 pozisyonuna bağlanan Na^+ iyonu ve ligant taşıyıcıdan ayrılmaktadır. Boş durumda kalan taşıyıcı tekrar konformasyon değişikliğine giderek ilk durumuna geri dönmektedir. Bu çalışma sırasında hücre içi bölgedeki kapısı açık olan LeuT protein yapının 3 boyutlu kristal yapısı bulunamamış olduğundan iyon/ligant taşınmasına dair ileri sürdüğümüz tezin ikinci

kısmını kesin olarak göstermemiz mümkün değildir. Ancak homoloji modellerinden elde edilen yapılarla göstermek denenebilir ama bunun içinde çok iyi test edilmiş homoloji yapısına ihtiyaç olduğundan çalışmanın bu kısmının tamamlanması biraz zaman alacaktır.

6. NAVAB KANALI

Aksiyon potansiyeli olarak da adlandırılan elektrik sinyalleri sinir sistemindeki bilgileri ve fizyolojik süreçleri düzenler [Hodgkin ve Huxley, 1952; Hille, 2001; Payandeh ve ark., 2011]. Elektrik sinyaline aracılık eden voltaj kapılı iyon kanallarının farklı fonksiyonel rolleri vardır [Hodgkin ve Huxley, 1952; Hille, 2001; Payandeh ve ark., 2011]. Nav kanalları aksiyon potansiyellerini başlatır. Nav kanallarının bozulmasıyla kalıtsal epilepsi, migren, periyodik paralizi, kardiyak aritmi ve kronik ağrı sendromları oluşmaktadır [Ryan ve Ptacek, 2010].

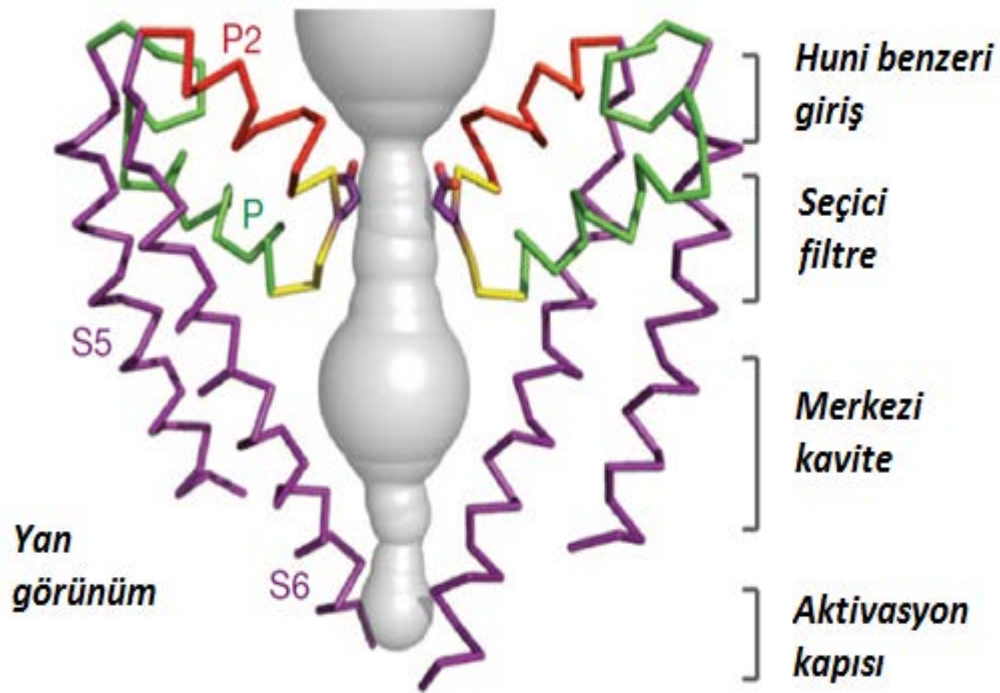
Bu kanallar; lokal anestezide, genetik tedavide ve beyin, iskelet kası ile kalpteki sporadik Nav kanalopatilerinde kullanılan ilaçların moleküler hedeflerdir [Catterall, 1987]. Hızlı aktivasyon, Nav kanallarının sodyum iyonu seçiciliği ve ilaç duyarlılığı voltaj kapılı iyon kanalları arasında benzersizdir [Hille, 2001,].

Voltaj kapılı iyon kanalları dört voltaj sensörüyle çevrelenen, merkezi bir iyon iletimi oluşturan dört alt birimden oluşur [Yu ve Catterall, 2004]. Voltaj duyarlı bölge (VDB), S1-S4 segmentlerinden oluşur ve kanal modülü S4 segmenti ile S5 segmenti arasındaki P-köprüsü ile S5 ve S6 segmentleri tarafından oluşturulmuştur [Yu ve Catterall, 2004]. S4 segmentleri depolarizasyona yanıt olarak dışa deplasman geçmesini ve merkez gözenek açılmasını başlatan membran elektrik alanı içindeki yüklü aminoasitlere yerleşir [Bezanilla, 2006; Catterall, 2010]. Kv kanal mimarisi yüksek çözünürlükte bulunmuş olmasına rağmen, voltaj kapılı iyon kanalları hızlı voltaj-bağımlı aktivasyonu esnasındaki yapısal belirsizlik devam etmektedir. Yani Nav kanallarında Na^+ -seçici geçirgenliği ve ilaç bloklamadan sorumlu yapılar henüz çözülememiştir [Long, 2005; Long, 2007]. Omurgalılarda Nav ve Cav proteinlerin birincil gözenek-olusturucu alt birimleri bağlanmış, dört homolog domainde yaklaşık olarak 2000 aminoasit rezidüsünden oluşmaktadır [Payandeh ve ark., 2011]. Bakteriyel NaChBac kanal ailesi daha karmaşık omurgalı Nav ve Cav kanallarının yapı-fonksiyon çalışmaları için önemli bir modeldir [Ren ve ark., 2001; Koishi ve ark., 2004]. NaChBac homotetramerdir ve farmakolojik profili Nav ve Cav kanallarına benzerdir [Ren ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2004]. Bakteriyel Nav

kanalları, yüksek Na^+ seçicidir, ancak bunlar basit mutagenез yoluyla Ca^{++} seçici formlarına dönüştürülebilir. NaChBac ailesi omurgalı Nav ve Cav kanallarının muhtemel atası olarak temsil edilir [Yue, 2002]. *Arcobacter butzleri*'den NavAb'nin üç boyutlu yapısının analizi sayesinde, Nav ve Cav kanallarındaki voltaj bağımlı kapının yapısal temelleri, iyon seçiciliği ve ilaç bloklaması Payandeh ve arkadaşları tarafından bulunmuştur [Payandeh ve ark., 2011].

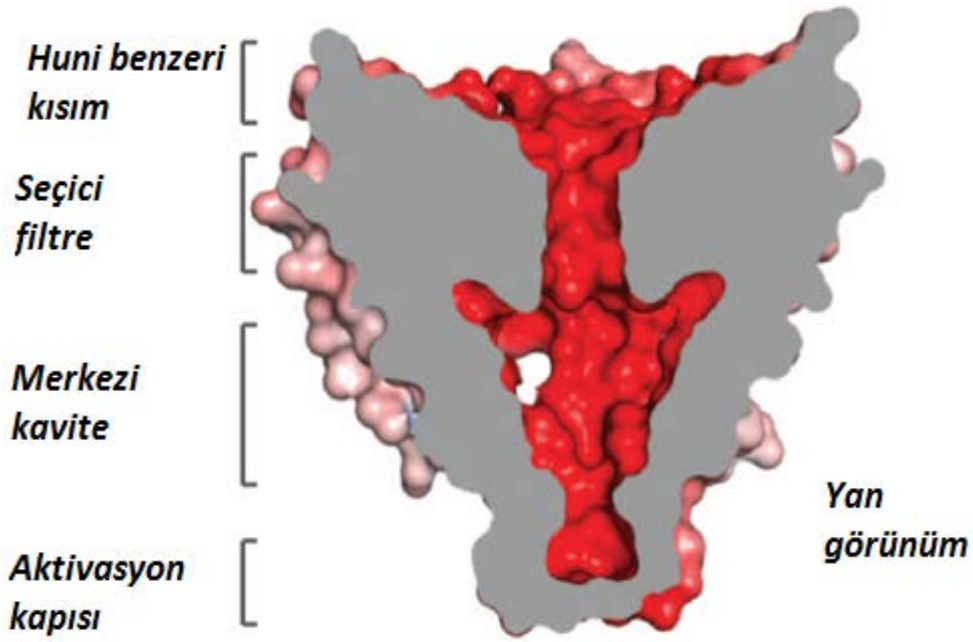
6.1. NavAb Kanalının Yapısı ve Seçici Filtresi

Voltaj kapılı iyon kanalları özel katyonlar için seçicidirler ve serbest difüzyon oranında bu iyonları iletirler [Hille, 2001]. Payandeh ve arkadaşları tarafından bulunan NavAb yapısı Nav kanallarının seçiciliği ve yüksek iletkenliği için bir temel ortaya koymaktadır [Payandeh ve ark., 2011]. Şekil 6.1'de gösterildiği gibi NavAb yapısının kanal kısmı; huni benzeri bir giriş, seçici bir filtre, bir merkez kavite ve bir hücre-içi aktivasyon kapısından oluşmaktadır.



Şekil 6.1. NavAb yapısının kanal kısmının görünümü [Payandeh ve ark., 2011]

NavAb yapısındaki geniş merkezi kavite kolaylıkla bir Na^+ iyonu ile onun 1. hidrasyon kabuğunu alabilecek genişliktedir ve yapı üzerinde iyonların hızlı bir şekilde difüze olmasını sağlayan hidrofobik bir yüzeyi bulunmaktadır (Şekil 6.2).



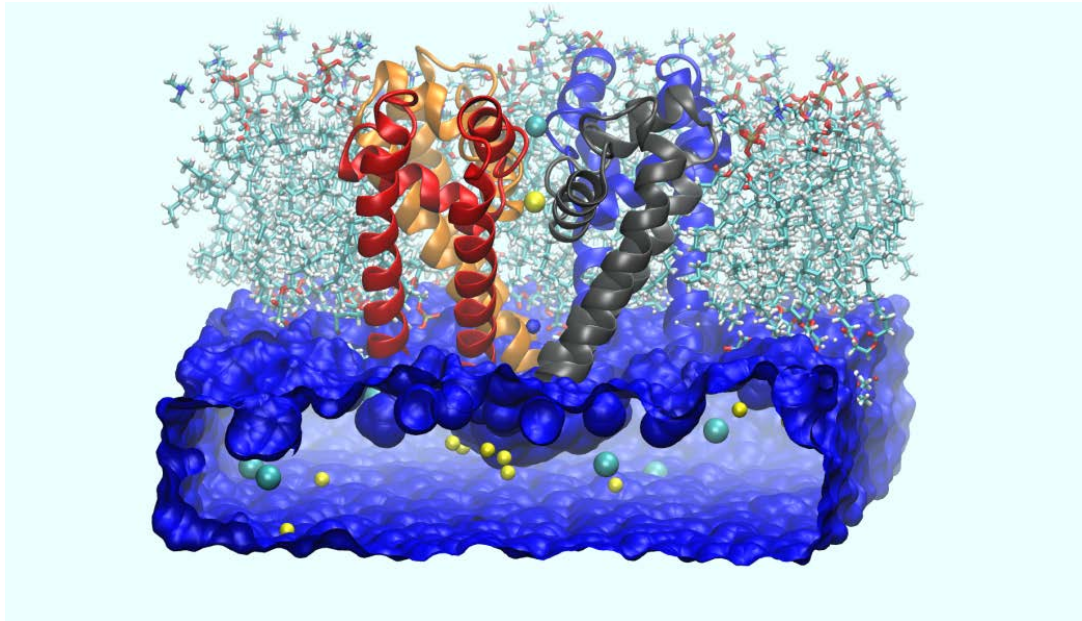
Şekil 6.2. NavAb yapısının kanal kısmının hidrofobikliğinin görünümü [Payandeh ve ark., 2011]

Kanal boyunca bulunan heliksler, sarmal-dipol etkileşim yoluyla merkezi kavitede katyonları stabilize etmek için konumlandırılmış durumdadır [Payandeh ve ark., 2011]. NavAb yapısındaki iyon iletim yolu güçlü bir şekilde elektronegatifdir ve seçici filtrenin hücre dışı tarafında kanal daralır. Kanal filtre yapısı Trp 179, Ser 178, Glu 177, Leu 176 ve Thr 175 aminoasitlerinden oluşmaktadır. Thr 175 ve Trp 179 arasındaki rezidüer sıkı bir yapı oluştururlar. Thr 175 ve Leu 176 omurga karbonilleri ise iyonların iletilmesinde rol oynarlar.

Bilindiği üzere MD simülasyonları potasyum kanallarının iletim ve seçicilik mekanizmasının anlaşılması için çok önemlidir. Çalışmanın bu kısmında, K kanallarında kullanılanlara benzer simülasyon stratejileri NavAb kanalında iletim ve seçiciliği analiz etmek için kullanılarak iletim mekanizmasının doğası, seçiciliği ve kanalın tıkanmasına neden olan kalsiyum iyonunun durumu incelenmiştir.

6.2. Simülasyon Detayları ve Sistemin Dengeye Getirilmesi

Proteinin kristal yapısı PDB'den (3RVY) indirildi [Payandeh ve ark., 2011]. NavAb kanalının tetramer yapısını sağlamak amacıyla indirilen kristal yapıda verilen simetri operasyonları uygulandı ve tetramer yapı elde edildi. Kristal yapıda bulunan VDB (1 – 113 nolu rezidüler) sistem boyutlarının küçülmesi ve hesapsal etkinliğin artması için yapıdan kaldırıldı. Ayrıca yukarıda sözü edilen özelliklerin araştırılmasında VDB'nin etkileri ihmal edilebilir düzeydedir. VMD [Humphrey ve ark., 1996] programı yardımıyla palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine (POPC) lipitleri seçilerek $85 \times 85 \text{ \AA}^2$ boyutunda xy düzleminde 113 adet lipit zincirinden (15142 atom) oluşan bilayer elde edildi ve protein lipit yapının içerisine gömüldü. Sistemi nötralleştirmek ve fizyolojik değeri sağlamak amacıyla 0,15 M'lık bir iyon konsantrasyonu eklendi (42 sodyum, 26 klor atomu). Membran içine gömülü yapıyı fizyolojik ortama benzetmek için ayrıca sisteme toplam 9310 adet su molekülü (27930 atom) eklemek suretiyle membran protein sistemi kuruldu. Toplamda sistemde 49248 atom bulunmaktadır ve sistem boyutu $85 \times 85 \times 80 \text{ \AA}^3$ boyutlarındadır. Sistemin görünümü Şekil 6.3'te verilmiştir.



Şekil 6.3. NavAb sisteminin görünümü

Tüm MD simülasyonu NAMD [Kale, 1999] programının 2.8 versiyonu kullanılarak yapıldı ve Charmm [MacKerell, 1998] kuvvet alanı (force field) kullanıldı. Tüm yönler için periyodik sınır koşulları uygulandı.

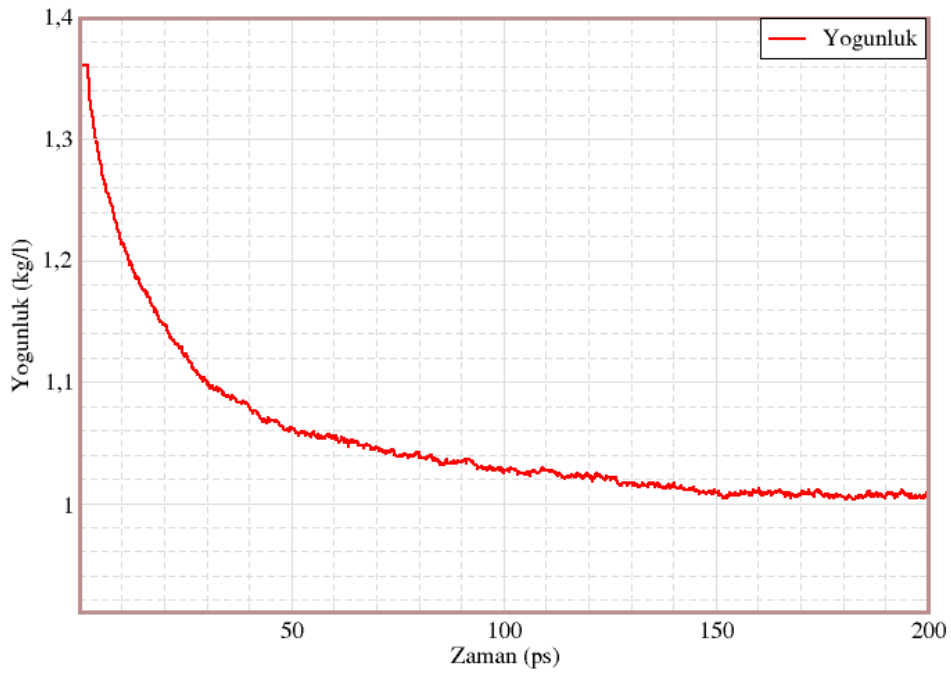
Uzun menzilli elektrostatik etkileşimler ise PME algoritması kullanan NPT topluluğunda yapıldı. Langevin Piston metodu, 50 *fs* piston bozulumu ve 100 *fs* piston periyodu ile 1 *atm* basınç sağlamak için kullanıldı. Van der Waals etkileşimlerinde kesme mesafesi 12 Å ve kayma mesafesi 10 Å 'da tutuldu. Simülasyon boyunca zaman adımı 2 *fs* olarak alındı ve her 1 *ps* aralıklarla simülasyon verileri kaydedildi.

Yukarıda bahsedilen süreçlerde sistem programlar yardımıyla hazırlandı. Bu süreç içerisinde sistemi oluşturan bazı atomlar arasındaki mesafe van der Waals uzaklıklarından daha az olması, kuvvetle muhtemel olduğundan ilk adım olarak sistem 20 *ps* minimize edildi. Şimdiye kadar olan tecrübelerimize göre bu kadar sürelik minimizasyon kötü etkileşim uzaklıkları olarak (bad contact) adlandırılan uzaklıkları ortadan kaldırmıştır. Sistem kurulduktan sonra öncelikle sistemin dengeye gelmesi gerekmektedir. Sistemi dengeye getirme işlemi sırasında protein yapının omurga ve diğer ağır atomlarına harmonik kuvvetler uygulandı. Buradaki amaç; proteinin lipid ve su atomlarıyla birlikte adapte olmasını ve sistemde NPT simülasyon koşullarını sağlamaktır. Protein üzerindeki harmonik kuvvetler belirli zaman aralıklarında azaltıldı ve k kuvvet sabiti 0,1 *kcal/mol/Å²* olana kadar simülasyon devam ettirildi. Çizelge 6.1'de MD simülasyon zamanı; K_{bb} protein yapının omurga atomlarına; K_{noh} yine protein yapının hidrojen atomu hariç yan zincir atomlarına; K_{ion} iyonlara x, y ve z yönlerinde uygulanan kuvvet sabitini gösterirken P1, C218 ve C316 (z) lipitin fosfor, 218 ve 316 numaralı karbon atomlarına z yönünde uygulanan kuvvet sabiti değerini göstermektedir. Çizelge 6.1'de görüldüğü üzere sistem yavaş yavaş serbest bırakılmış ve bu süre zarfında sistem sıcaklığı 300° K ve basınç 1 *atm*'ye getirilmiştir.

Çizelge 6.1. Sistemi denge haline getirme işleminde uygulanan kuvvet sabitleri ve kuvvet sabitlerinin uygulandığı süreler

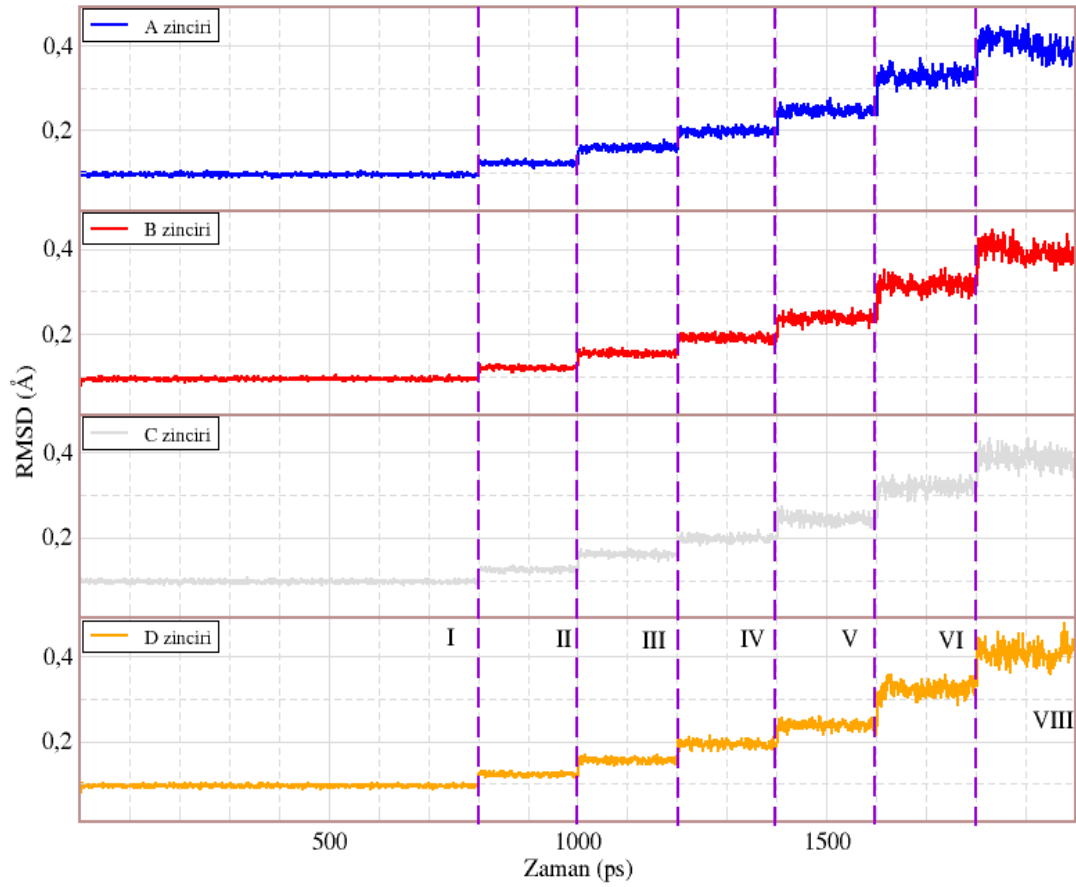
MD Zamanı (fs)	K_{bb} (kcal/mol/Å ²)	K_{noh} (kcal/mol/Å ²)	K_{ion} (kcal/mol/Å ²)	P1, C218 ve C316 (z) (kcal/mol/Å ²)
200000	50	25	5,0	3,0
200000	50	25	5,0	3,0
200000	50	25	5,0	3,0
200000	50	25	5,0	3,0
200000	25	12	3,0	1,0
200000	12	6,0	1,0	1,0
200000	6,0	3,0	0,5	1,0
200000	3,0	1,0	0,0	1,0
200000	1,0	0,0	0,0	1,0
200000	0,5	0,0	0,0	1,0

Sistemin dengeye gelme işlemi sırasında sistemin yoğunluk grafiğine bakıldığında (Şekil 6.4), sistemin yoğunluğunun yaklaşık 1,0 kg/l olduğu ve sistemin dengeye geldiği görüldü.

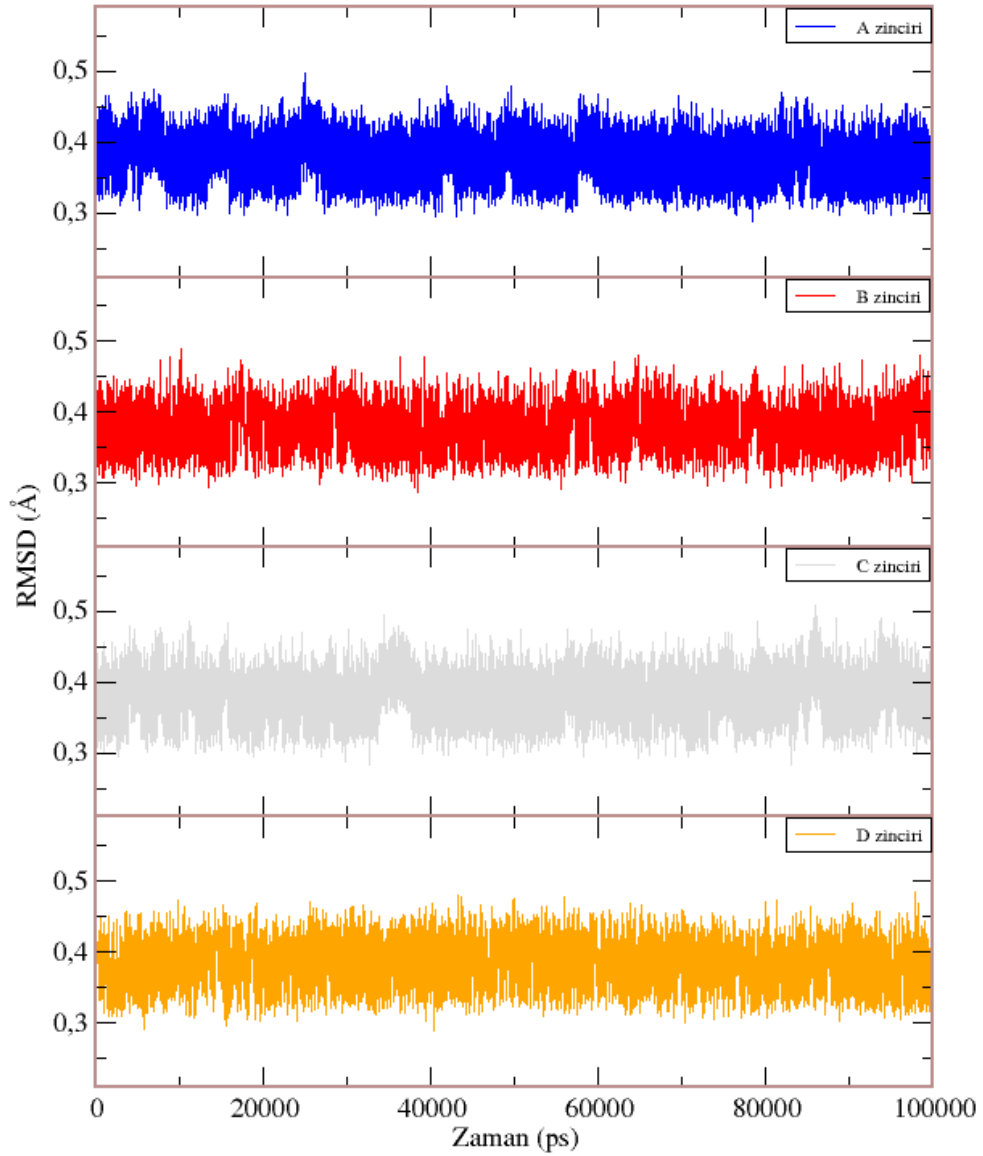


Şekil 6.4. Sistemin yoğunluk-zaman grafiği

Dengeye gelme işlemi sürecinde ayrıca her bir protein zincirinin omurga yapısının atomlarının RMSD grafiğine bakıldı (Şekil 6.5). Burada her bir protein zincirinin RMSD değeri maksimum 0,4 Å olduğu görülmektedir. Sistem dengeye getirildikten sonra iyon kanalının omurga atomlarına çok küçük bir harmonik kuvvet ($0,1 \text{ kcal/mol/Å}$) uygulanarak 200 ns MD yapıldı. Bu süre içerisinde protein omurga yapısının RMSD grafiği Şekil 6.6'da verilmiştir. NavAb protein yapısının omurga atomlarının RMSD değeri maksimum 0,5 Å olarak görülmektedir.

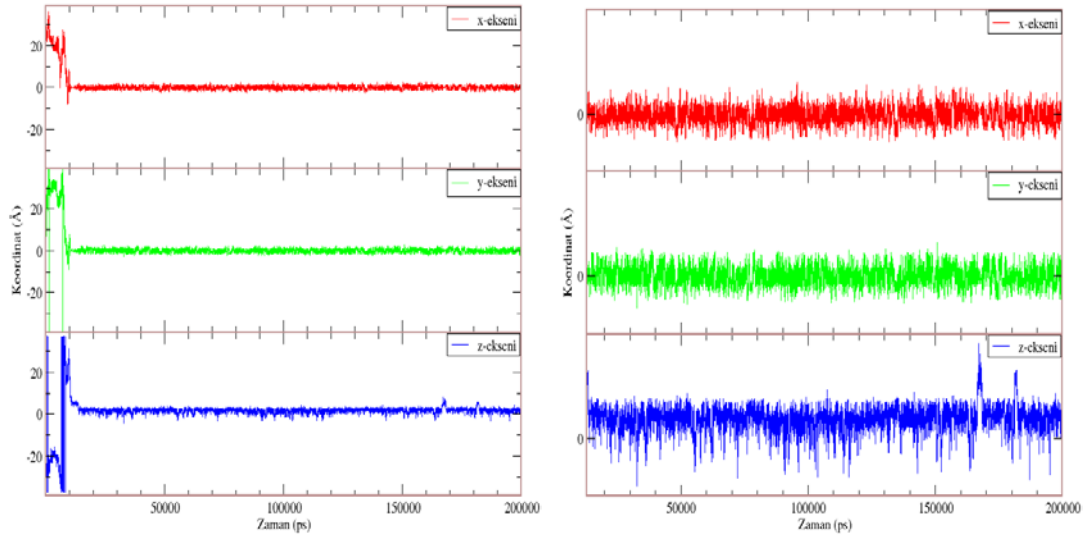


Şekil 6.5. NavAb protein lipit sisteminin dengeye gelme işlemi sürecinde her bir protein zincirinin omurga yapısının atomlarının RMSD grafiği



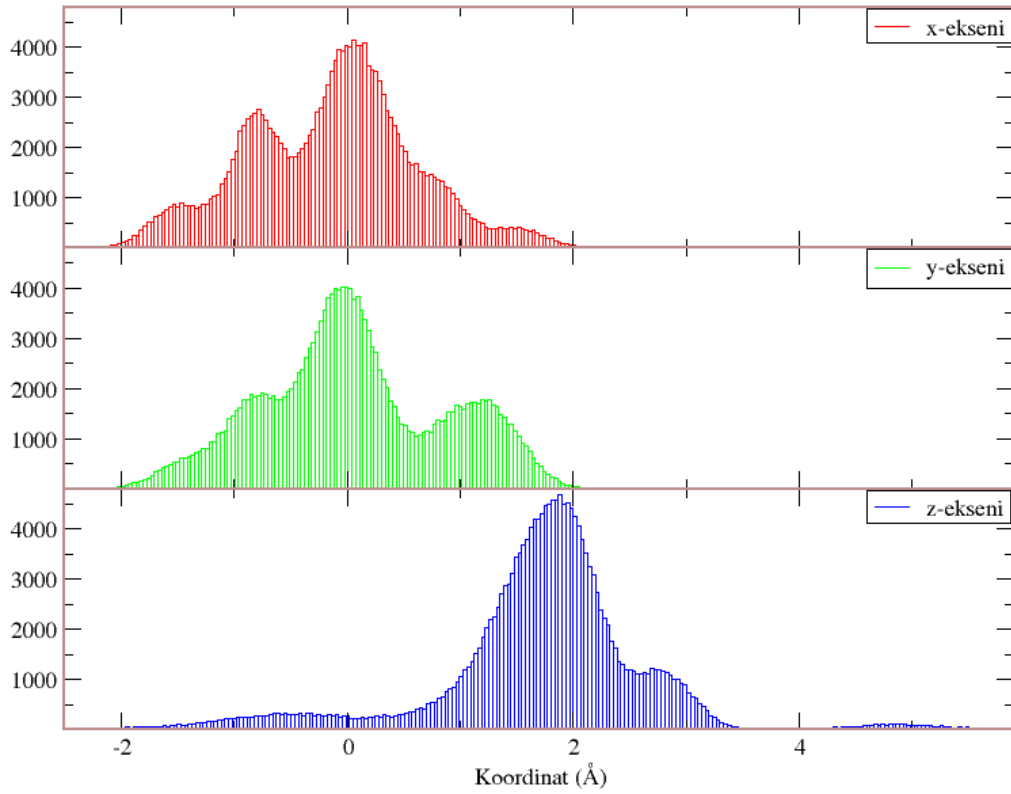
Şekil 6.6. NavAb protein ligant sisteminin omurga atomlarının 200 *ns*’lik MD boyunca RMSD grafiği

200 *ns*’lik MD simülasyonu süresinde 1 adet sodyum iyonu kanal içine doğru yönelmiş ve 13.*ns* içinde iyon kanalının seçici filtresinde bulunan rezidülere bağlanarak 187 *ns* boyunca filtre içinde kalmıştır. Filtre içine giren iyonun x, y ve z eksenindeki koordinatları Şekil 6.7’de verilmiştir. Şekil 6.7a’da 200 *ns*’lik tüm simülasyon boyunca x, y ve z koordinatları, Şekil 6.7b’de ilk 13 *ns*’lik kısım atılarak 187 *ns*’lik simülasyon boyunca x, y ve z koordinatları verilmiştir.



Şekil 6.7. a) 200 ns'lik tüm simülasyon boyunca x, y ve z koordinatları, b) son 187 ns'lik simülasyon boyunca x, y ve z koordinatları

İyonun filtre içine girdikten sonra x, y ve z koordinatlarının histogram eğrileri Şekil 6.8'de verilmiştir.



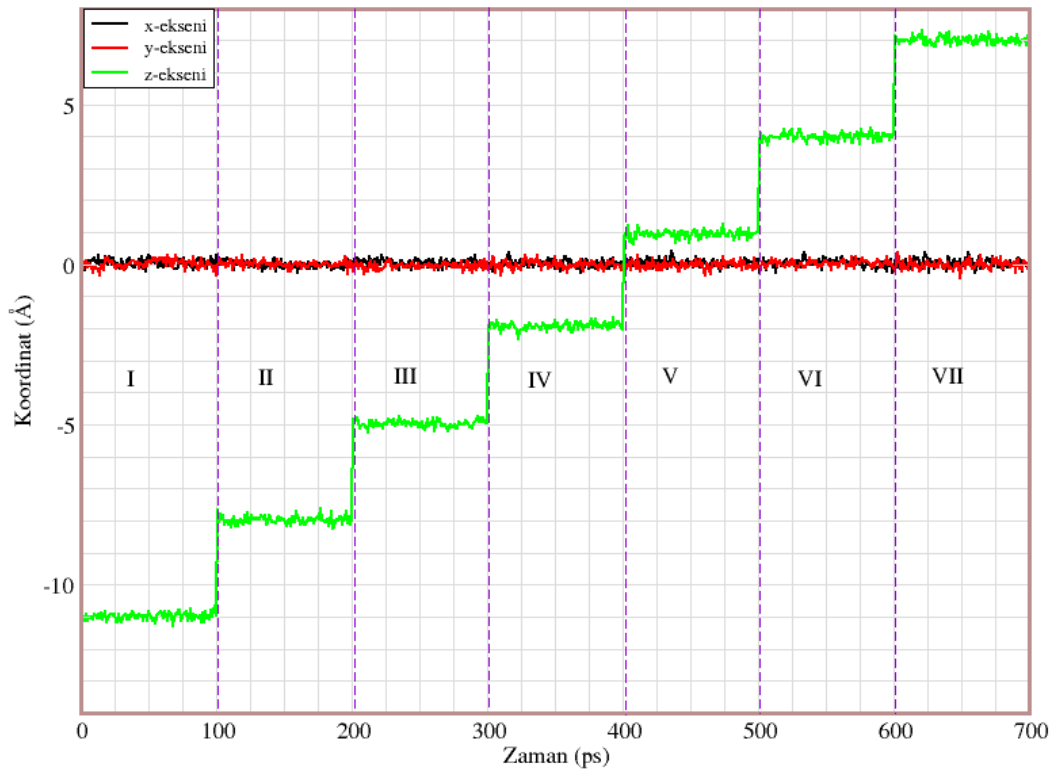
Şekil 6.8. Kanal içine giren iyonun x, y ve z koordinatlarının histogram eğrileri

Burada iyonun z ekseninde genellikle $1,8 \text{ \AA}$ civarında durduğu ancak $-0,4 \text{ \AA}$ ve $2,8 \text{ \AA}$ ’a dalgalanmaların olduğu görülmektedir. x ve y eksenlerinde ise büyük çoğunluğun $0 \text{ \AA}$ civarında durduğu ancak bu eksenlerde de dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Buda sodyum iyonunun filtrenin yan zincirleri ile hidrojen bağı yaparak filtre kenarlarına kaydığını göstermektedir.

6.3. NavAb Kanalına İyon Bağlanması Enerji Hesabı

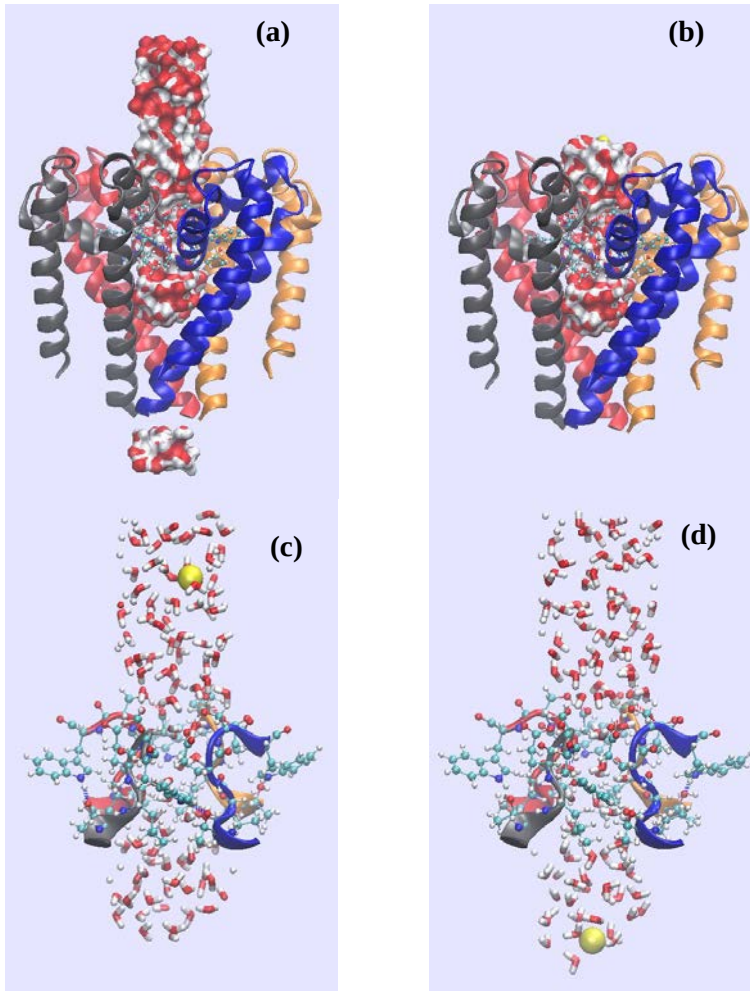
6.3.1. Sodyum iyonu için PMF hesabı

Sistem dengeye getirildikten sonra PMF hazırlıkları yapıldı. PMF başlangıcında filtre içinde 7 farklı noktaya sodyum iyonu yerleştirildi ve $50 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ değerinde kısıtlama kuvveti ile 100 ps ’lik işler çalıştırılıp sistemin dengeye gelmesi sağlandı.



Şekil 6.9. 7 farklı konuma yerleştirilen iyonun x, y, z eksenlerindeki iyon koordinatları

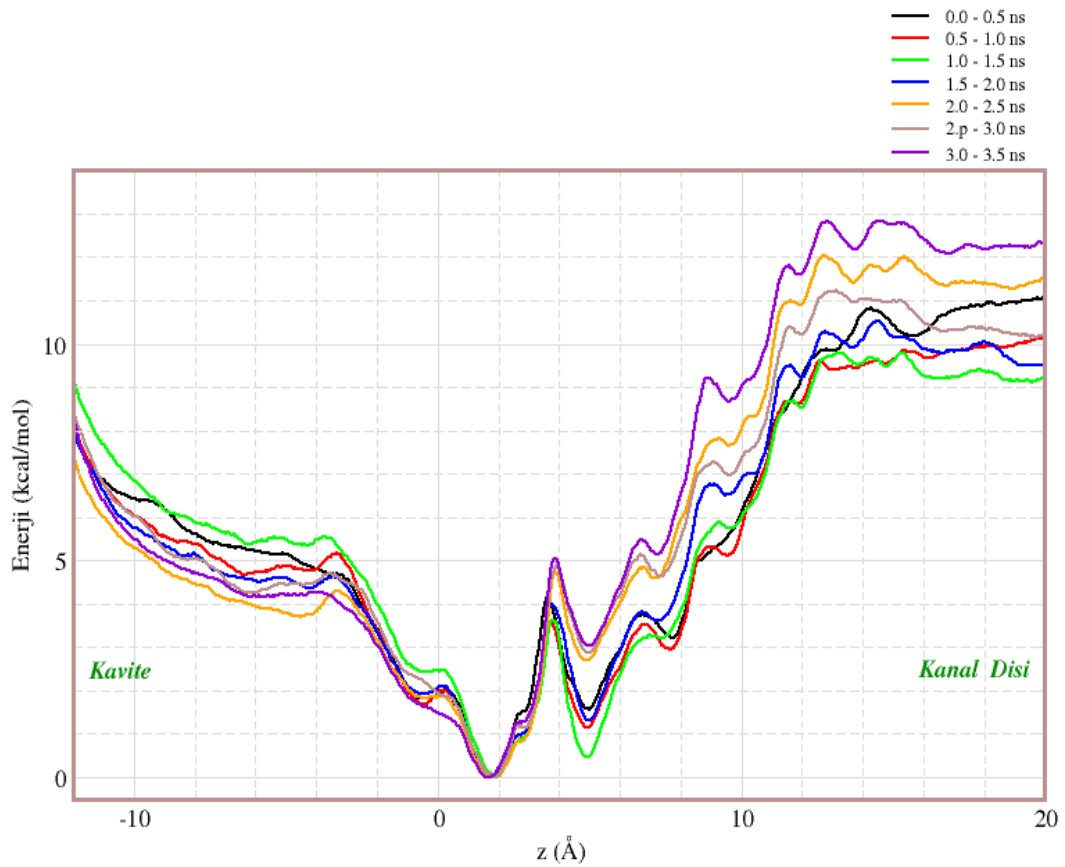
Daha sonra belirlenen noktalarda iyon 0,25 Å'luk aralıklarla +z ve -z yönlerinde hareket ettirildi. Böylelikle her bir iyon +z ve -z yönlerinde maksimum 1,5 Å hareket etmiş oldu. Burada iyon, kanal boyunca da çekilebilirdi ancak bu filtrenin bozulmasına sebep olabilmektedir. Şekil 6.9'da 7 farklı konumda bulunan iyonların x, y, z eksenlerindeki koordinatları gösterilmiştir. Şekil 6.10a'da protein yapı ile birlikte z eksenini (75 Å) boyunca PMF yapılacak bölgedeki su molekülleri görülmektedir.



Şekil 6.10. a) Protein yapı ile birlikte z eksenini (75 Å) boyunca su moleküllerinin görünümü b) Su moleküllerinin 20 Å ile -12 Å aralığında görünümü c) PMF yapılacak bölgede bulunan sodyum iyonunun 20 Å'daki görünümü d) PMF yapılacak bölgede bulunan sodyum iyonunun -12 Å'daki görünümü

Şekil 6.10b’de ise su molekülleri z ekseninde 20 Å ile –12 Å aralığında seçilmiş ve bu aralıkta PMF yapılmaya karar verilmiştir. Şekil 6.10c’de PMF yapılacak bölgede sodyum iyonu 20 Å’da bulunduğunda Şekil 6.10d’de sodyum iyonunu –12 Å’da bulunduğunda görülmektedir.

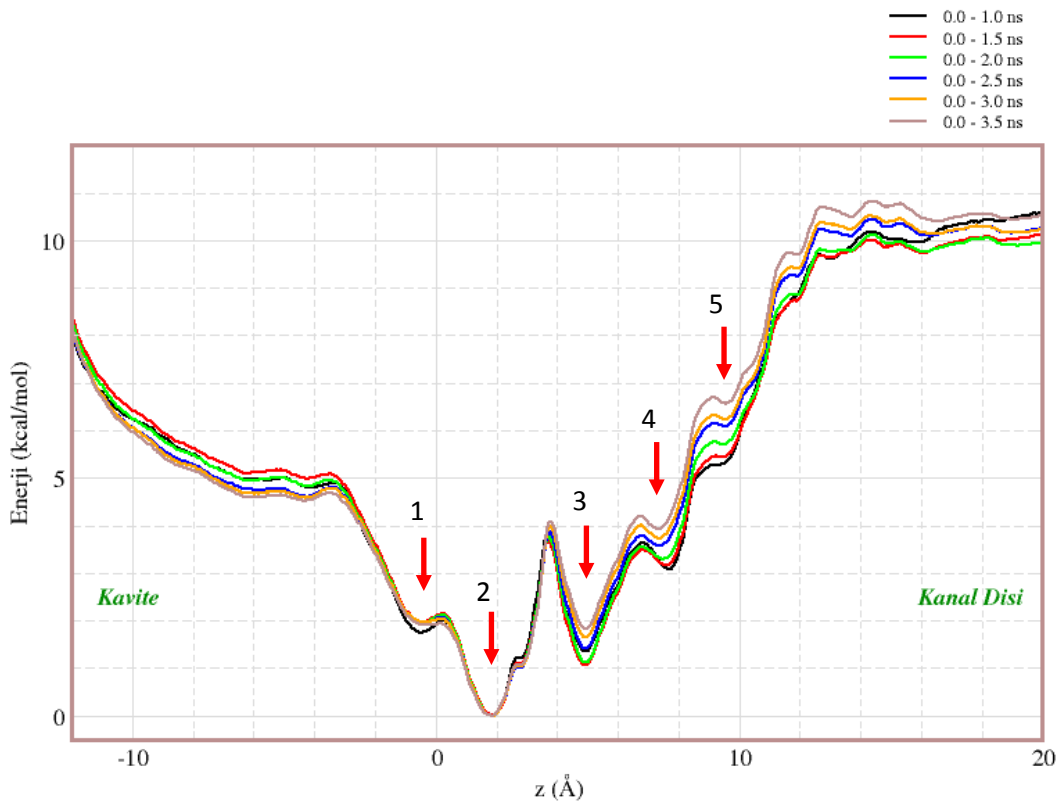
PMF yapılırken 20 Å ile –12 Å aralığı 0,25 Å’luk 129 parçaya bölünmüş ve bu şekilde işler koşturulmuştur. PMF sırasında iyon üzerine x ve y yönlerinde kısıtlama kuvveti konulmamış, z yönünde 2,5 kcal/mol/Å²’lik bir kısıtlama kuvveti konulmuştur. 0,5 ns’lik 7 iş çalıştırılmış ve toplamda 3,5 ns iş koşturulmuştur. Şekil 6.11’de 0,5 ns’lik süreler için simülasyon verilerinden WHAM analizi kullanılarak elde edilen PMF grafikleri verilmiştir. Grafiğin çukurları bağlanma pozisyonlarını göstermektedir. En derin olan pozisyon her yarım nanosaniyede aynı olduğu için bu noktada eğriler üst üste bindirilmiştir.



Şekil 6.11. 0,5 ns’lik süreler içerisinde simülasyon verilerinin PMF eğrileri

Ayrıca, grafik her ne kadar potansiyel minimum pozisyonlarını tutarlı olarak gösterse de her bir eğride potansiyel değerleri dalgalanmaktadırlar. Potansiyel platosunun bulunduğu bölgede iyon kanalı terk etmiş ve tamamıyla su (yığın) içerisine girmiştir. Buradan çıkartacağımız sonuç yarım nanosaniyelik örnekleme süresinin PMF hesaplama amacı için yetersiz olduğudur.

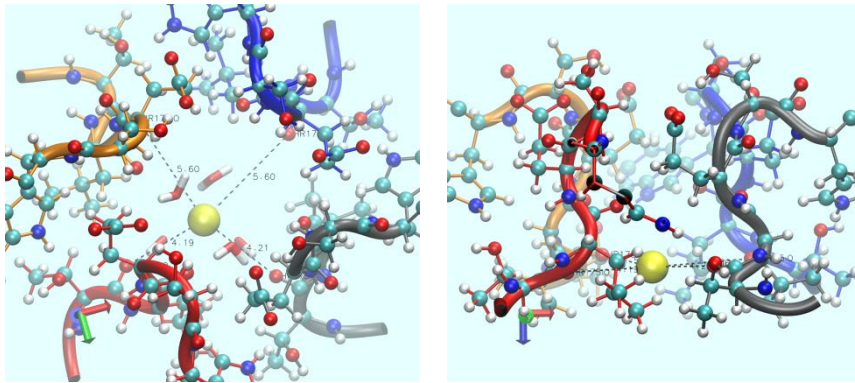
Şekil 6.12’de örnekleme süresi 0’dan 3,5 ns süresine kadar 0,5 ns’lik adımlarla artırılarak toplanan simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrisi gösterilmiştir. Şekil 6.12 PMF eğrilerinin küçük dalgalanmalar içerisinde yakınsadığını göstermektedir.



Şekil 6.12. Örnekleme süresi 0’dan 3,5 ns süresine kadar 0,5 ns’lik adımlarla artırılarak toplanan simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrisi

Şekil 6.12’yi kullanarak mutlak minimum ile lokal minimumlar ve yığın pozisyonu arasındaki enerji farklılıklarını $\pm 0,5 \text{ kcal/mol}$ belirsizliğinde söylemek mümkündür. Grafikten yığın pozisyonu ile en derin bağlanma pozisyonu arasındaki

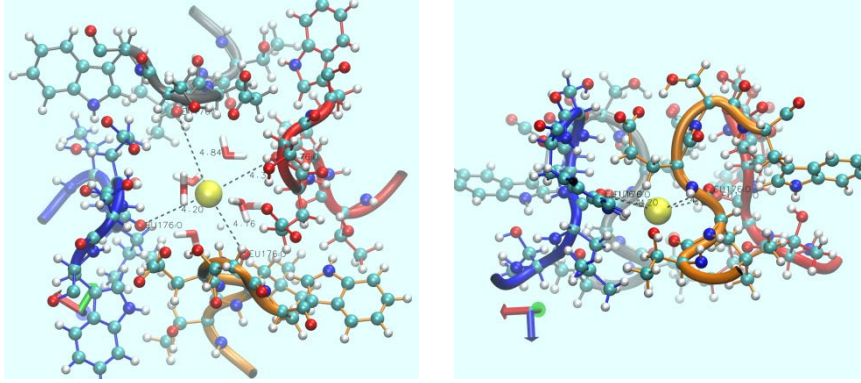
enerji farkının $10,5 \text{ kcal/mol}$ olduğunu çıkartmaktayız. Bu enerji farkından dolayı sistemi dengeye getirirken yaptığımız 200 ns 'lik simülasyonda başlangıçta filtrede iyon olmamasına rağmen 13 ns 'lik kısa bir sürede bir iyon bu pozisyona düşmüş ve geri kalan tüm sürelerde burada kalmıştır. Diğer bağlanma pozisyonları aşağıda detaylıca irdelenmektedir. Şekil 6.12'de görülen her bir minimum numaralandırıldı ve bu konumlarda sistemin analizi yapıldı. 1 nolu minimumda, sodyum iyonu z ekseninde $-0,24 \text{ Å}$ 'da bulunmaktadır. Şekil 6.13a ve 6.13b'de görüldüğü üzere sodyum iyonu filtre içerisinde Thr175 rezidüsüne yakın durumdadır.



Şekil 6.13. a) Thr175 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

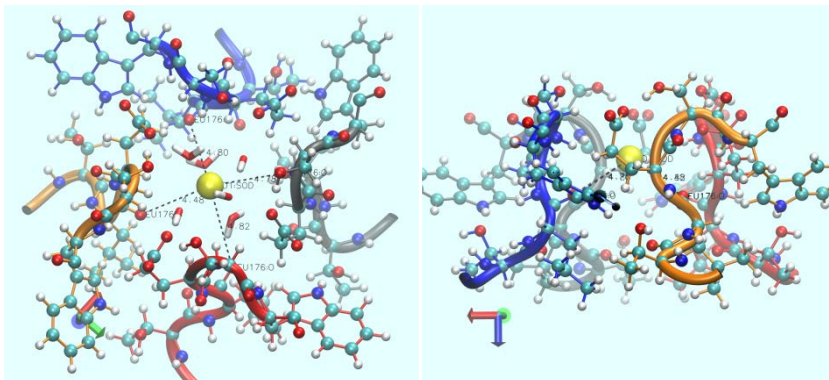
Ayrıca sodyum iyonunun 1. su kabuğunda 5 adet su molekülü bulunmaktadır. Filtrede bulunan 4 zincirin Thr175 rezidüsünün karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su molekülleri birbirleriyle koordinasyondadır.

2 nolu minimumda sodyum iyonu z ekseninde $1,93 \text{ Å}$ 'da bulunmaktadır. Şekil 6.14a ve 6.14b'de görüldüğü üzere sodyum iyonu filtre içerisinde Leu176 rezidüsüne yakın durumdadır. Ayrıca sodyum iyonunun 1. su kabuğunda 6 adet su molekülü bulunmaktadır. Filtrede bulunan 4 zincirin Leu176 rezidüsünün karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su molekülleri birbirleriyle koordinasyondadır.

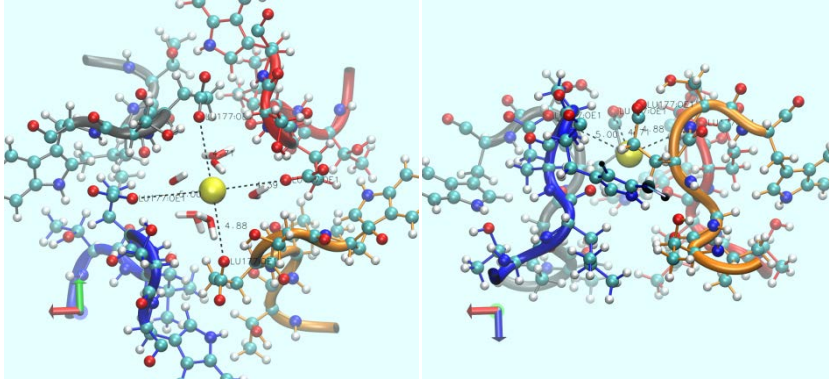


Şekil 6.14. a) Leu176 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

3 nolu minimumda sodyum iyonu z ekseninde 4,94 Å'da bulunmaktadır. Sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan sular Leu176 karbonil oksijenleri ile koordinasyonunun yanında Glu177 yan zincirinde bulunan oksijenlerle de koordinasyon sağlamaktadır. Şekil 6.15a ve 6.15b'de sodyum iyonu, Leu176 rezidüsüne ve Şekil 6.16a ve 6.16b'de ise Glu177 yan zincirinde bulunan oksijenlere yakın durumdadır. Ayrıca bu pozisyonda sodyum iyonunun 1. su kabuğunda 6 adet su molekülü bulunmaktadır. Sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtrede bulunan 4 zincirin Leu176 rezidüsünün karbonil oksijenleri ile ve Glu177 yan zincirinde bulunan oksijenleri ile koordinasyonda olduğu görülmektedir.

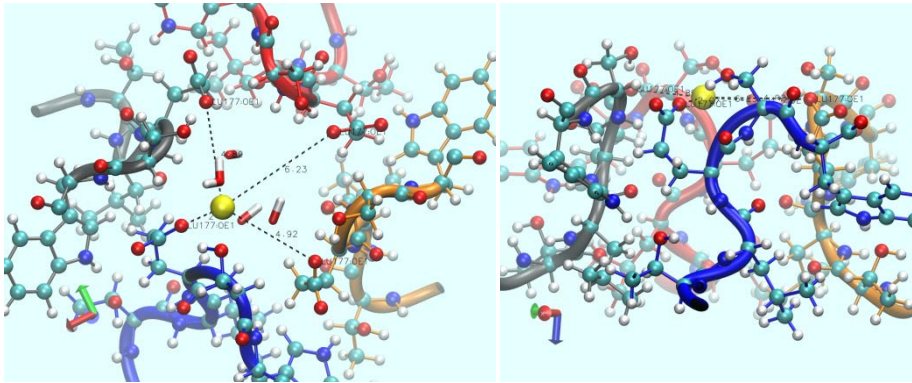


Şekil 6.15. a) Leu176 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü



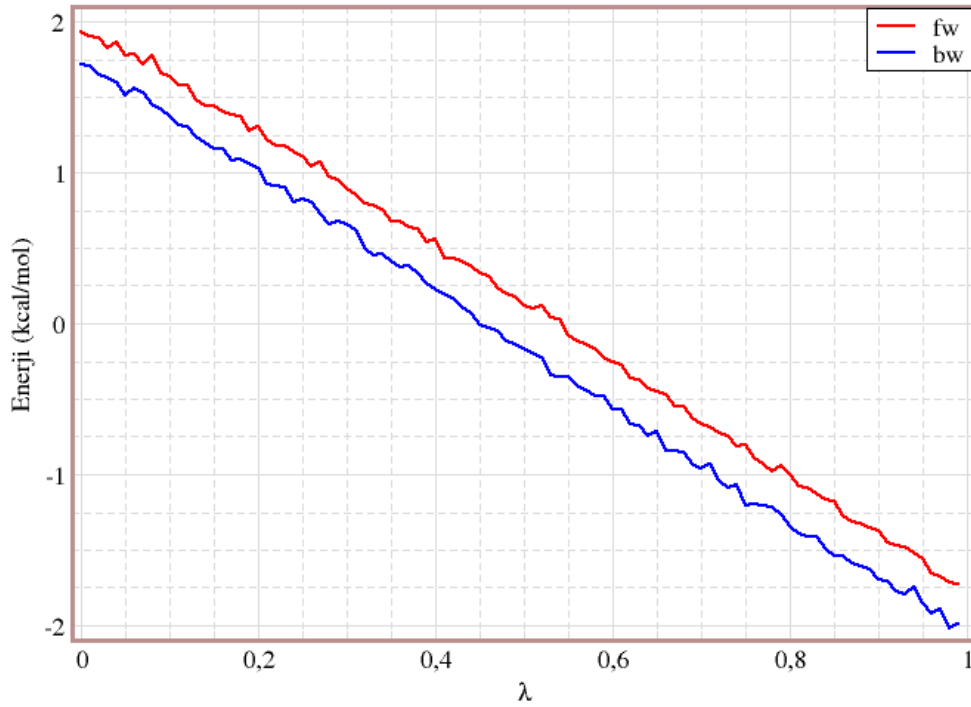
Şekil 6.16. a) Glu177 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

4 nolu minimumda sodyum iyonu z ekseninde 7,51 Å'da bulunmaktadır. Şekil 6.17a ve 6.17b'de görüldüğü üzere sodyum iyonu Glu177 rezidüsüne yakın durumdadır. Burada sodyum iyonu Glu177 zincirinin 1 tanesi ile hidrojen bağı yapmakta ve uzaklık 2,07 Å olarak ölçülmektedir. Ayrıca sodyum iyonunun 1. su kabuğunda 4 adet su molekülü bulunmaktadır. Filtrede bulunan diğer 3 zincirin Glu177 rezidüsünün karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin koordinasyonda olduğu görülmektedir.



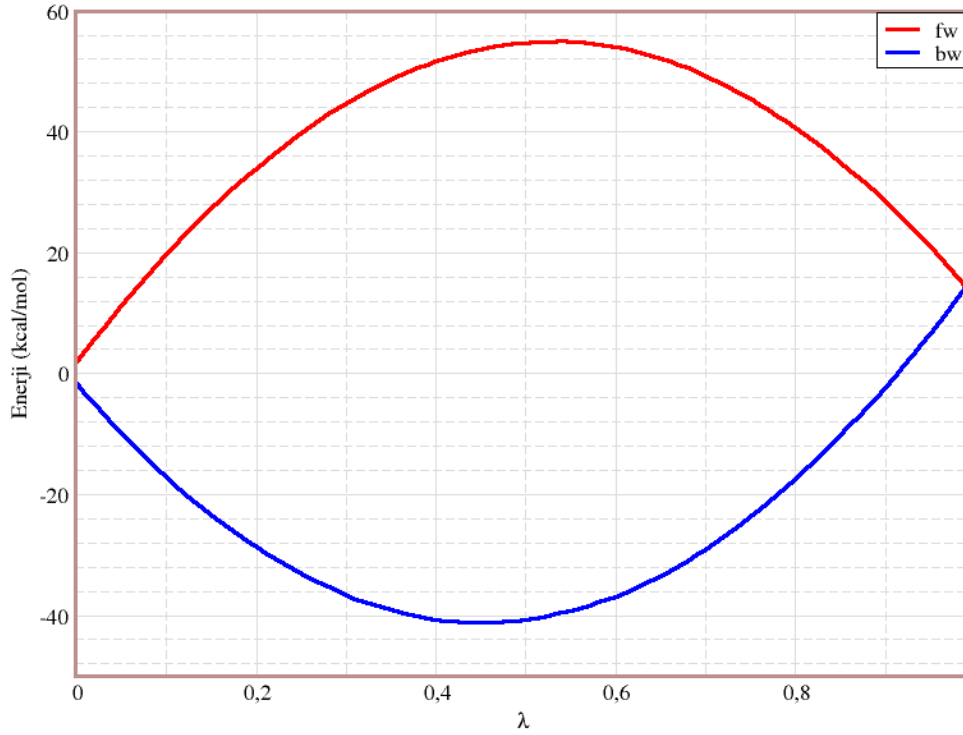
Şekil 6.17. a) Glu177 karbonil oksijenleri ile sodyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

5 nolu minimumda sodyum iyonu z ekseninde 9,64 Å'da bulunmaktadır. Şekil 6.18a ve 6.18b'de görüldüğü üzere sodyum iyonu Ser178 rezidüsüne yakın durumdadır. Burada sodyum iyonu Ser178 zincirinin 1 tanesi ile hidrojen bağı yapmakta ve bu uzaklık 2,26 Å olarak ölçülmektedir. Ayrıca sodyum iyonunun 1. su kabuğunda 4



Şekil 6.19. Forward ve backward enerji hesaplamaları için her λ değerine karşılık gelen ΔG enerji değerleri

Şekil 6.19’da forward ve backward hesaplamaları için her λ değerine karşılık gelen ΔG enerji fark değerleri görülmektedir. Bu farklar toplanarak serbest enerji değeri elde edilmektedir. Şekil 6.20’de verilen grafikte her bir ΔG değeri ardışık olarak toplanmıştır, $\lambda = 1$ ’de elde edilen değer bütün λ ’lar üzerinden elde edilen toplamı vermektedir. Şekil 6.20’den FEP süresince yapılan forward ve backward hesaplamaları sonucu sodyum iyonunun FEP değeri $14,3 \text{ kcal/mol}$ olarak bulunmuştur. Burada elde edilen serbest enerji farkı iyon pozisyonunu değiştirmekten kaynaklanan katkıyı da içermektedir. Bunun PMF’te elde edilen enerji ile karşılaştırılması için yer değiştirme serbest enerji katkısının (yaklaşık 4 kcal/mol) [Heinzelmann ve ark., 2011] bu değerden çıkartılması gereklidir. Sonuç itibarı ile elde edilen serbest enerji değeri PMF hesabı ile elde edilen değer ile mükemmel bir uyum içerisinde ve rahatlıkla hesapladığımız değer doğruluğunu iddia etmemiz mümkündür.



Şekil 6.20. Sodyum iyonunun serbest enerji pertürbasyon grafiği

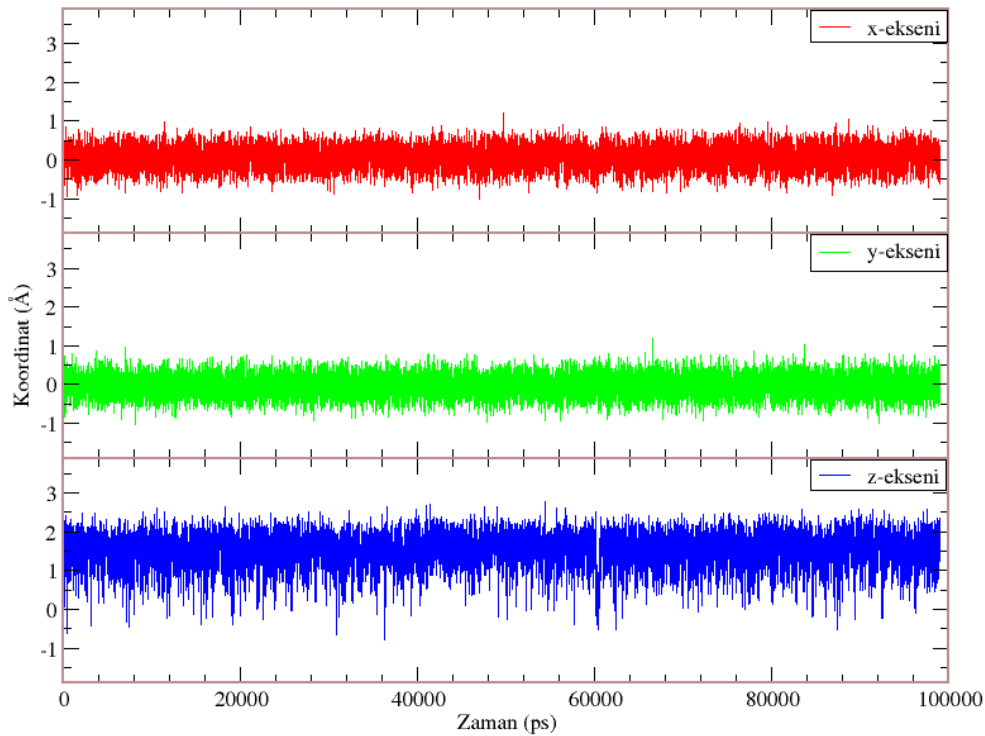
Benzer hesaplar Ben Corry [Corry ve Thomas, 2011; Corry, 2013] ve Simone Furini [Furini ve Domene, 2012] tarafından yapılmıştır. Ben Corry bu konuda 2 makale yayınlamış ve her ikisinde sodyum PMF için farklı profiller elde etmiştir. Ben Corry'nin ikinci makalesi ve Simone Furini'nin yayınladığı PMF hesabındaki bağlanma pozisyonları bizim bulduğumuz değerlerle uyum içindedir. Her iki hesapta da reaksiyon koordinatının orijini bizimkinden farklı seçildiğinden minimumda biraz kayma vardır. Orijin seçimini aynı yaptığımızda pozisyonlar üst üste oturmaktadır. Lakin aynı uyum serbest enerji değerleri için söz konusu değildir. Diğer makalelerde bizim yaptığımız yakınsama testi yapılmamıştır. Ben Corry'nin ilk makalesindeki PMF değerleri 1 ns'lik örnekleme pencerelerinden elde edilirken 2. makalesinde yayınladığı PMF değerleri 2 ns örnekleme süresi üzerinden elde edilmiştir. Her iki makalenin karşılaştırılması bu PMF değerlerinin elde edildiği örnekleme verilerinin yetersizliğine işaret etmektedir. Simone Furini'nin yayınladığı PMF eğrisi 0,5 ns'lik örnekleme süresinden elde edildiğinden aynı örnekleme verilerinin yetersizliğinin var olduğunu bu grup için iddia etmemizde mümkündür, zira bu örnekleme süresi

Ben Corry'nin ilk makalesinde yayınladığı örnekleme süresinden dahi azdır. Ayrıca bu makalelerde farklı yollardan kendi değerlerinin test edilmesi eksiktir.

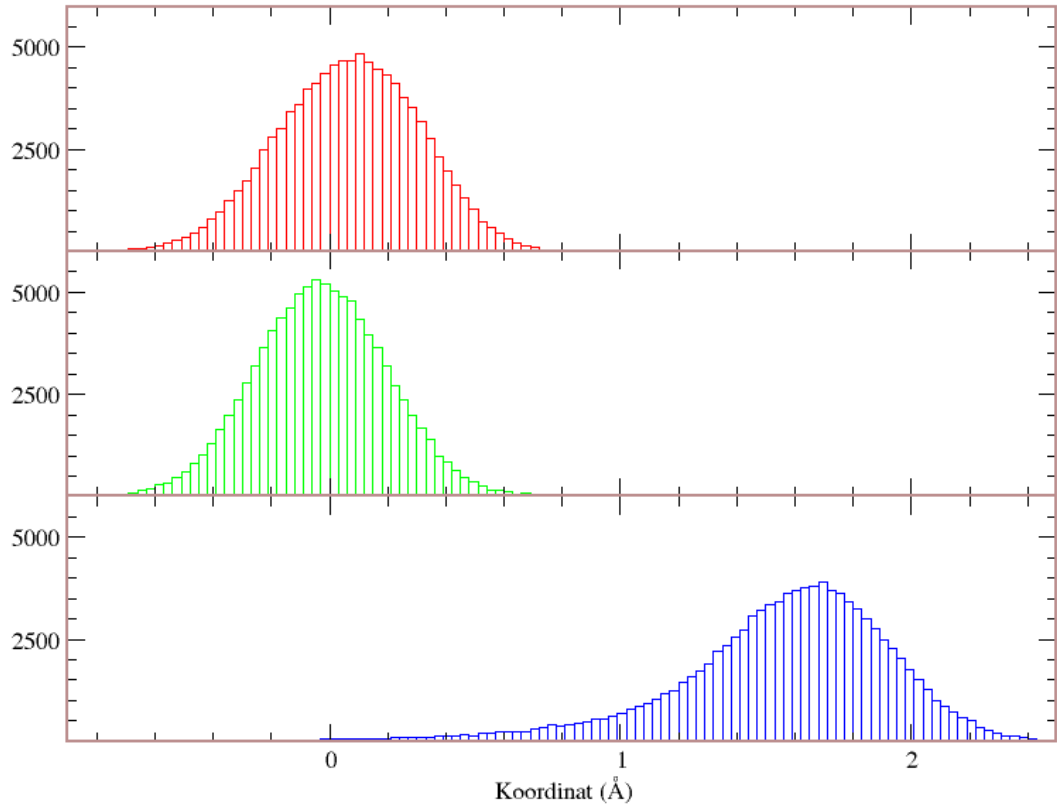
6.3.3. Kalsiyum iyonu için PMF ve FEP hesabı

NavAb kanalında sodyum iyonun MD işlemi bitirildikten sonra filtre içindeki sodyum iyonu ile kalsiyum iyonu yer değiştirilmiş ve 100 ns boyunca MD yapılmıştır. 100 ns süresince kalsiyum iyonunun kanal içindeki x, y ve z koordinatları Şekil 6.21'de görülmektedir.

Kalsiyum iyonun MD boyunca x, y ve z eksenlerinin histogram eğrileri Şekil 6.22'de gösterilmiştir. Burada iyonun z ekseninde 1,6 Å civarında durduğu x ve y eksenlerinde ise 0 Å civarında durduğu ve bu noktalar etrafında dalgalandığı görülmektedir. Kalsiyum iyonunun histogram eğrilerinin sodyum iyonunun histogram eğrilerine göre daha kararlı bir durumda oldukları görülmektedir.

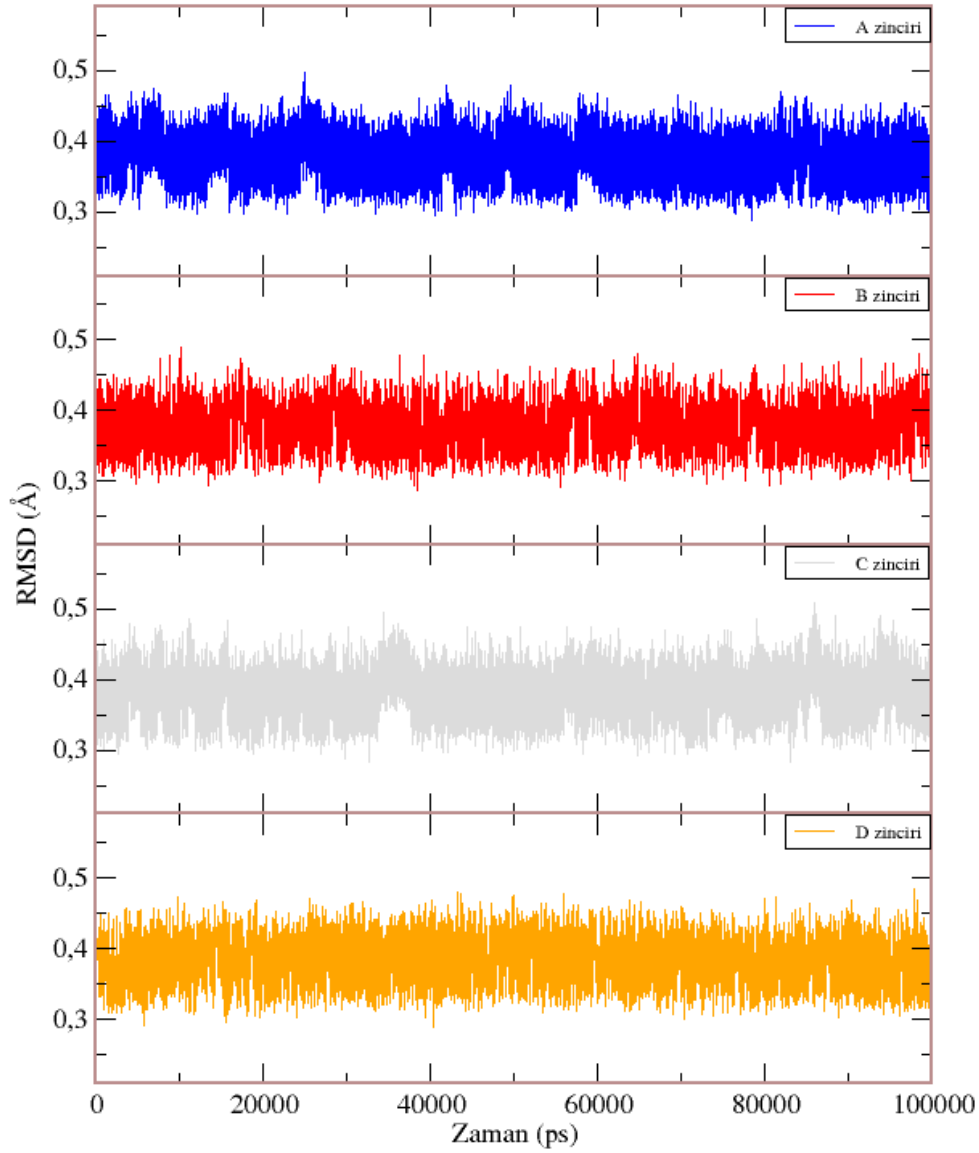


Şekil 6.21. NavAb kanalına kalsiyum iyonu konularak yapılan MD'de iyonun x, y ve z koordinatlarındaki durumu



Şekil 6.22. Kanal içinde bulunan kalsiyum iyonun x, y ve z eksenlerinin histogram eğrileri

Yapılan 100 ns MD boyunca protein omurga yapısının RMSD grafiği Şekil 6.23'te verilmiştir. Kalsiyum iyonu filtre içerisindeyken NavAb protein yapısının omurga atomlarının RMSD değeri maksimum olarak 0,5 Å bulunmuştur. Bu daha önce elde ettiğimiz RMSD değerlerinden farklı değildir. Buradan sistem yapısının bozulmadan kaldığını iddia edebiliriz.

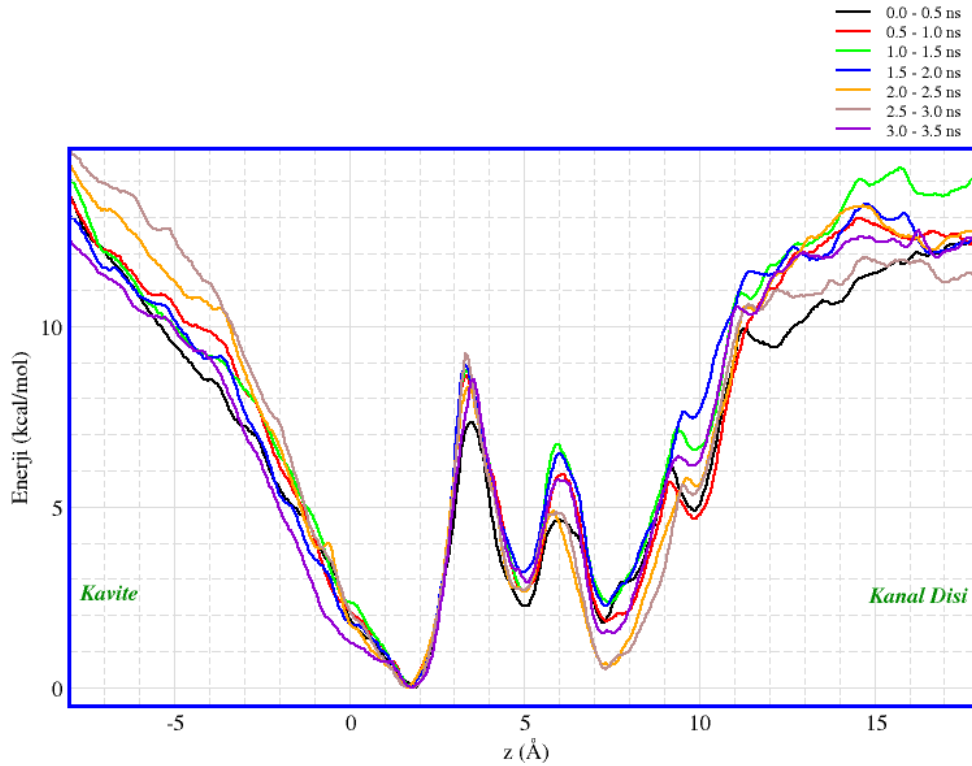


Şekil 6.23. NavAb protein yapısında kalsiyum iyonu bulunduğunda protein omurga atomlarının 100 ns'lik MD boyunca RMSD grafiği

MD yapıldıktan sonra PMF hesaplamasına geçildi. Yukarıda sodyum iyonunun PMF hesabı için verilen prosedür kalsiyum iyonu için de aynen tekrarlandı. Sodyum iyonundan kazandığımız tecrübeler doğrultusunda kalsiyum PMF hesabı yapılırken z eksenini 18 ile $-8,0 \text{ Å}$ aralığında seçildi ve $0,5 \text{ Å}$ 'luk 53 parçaya bölünerek işler kıştırıldı. PMF sırasında kalsiyum iyonu üzerine x ve y yönlerinde kısıtlama kuvveti konulmadı ve z yönünde 10 kcal/mol/Å^2 'lik kısıtlama kuvveti konuldu.

Hesaplamalar sodyum iyonunda olduğu gibi 0,5 ns'lik 7 iş çalıştırılarak toplamda 3,5 ns iş çalıştırılarak yapılmıştır.

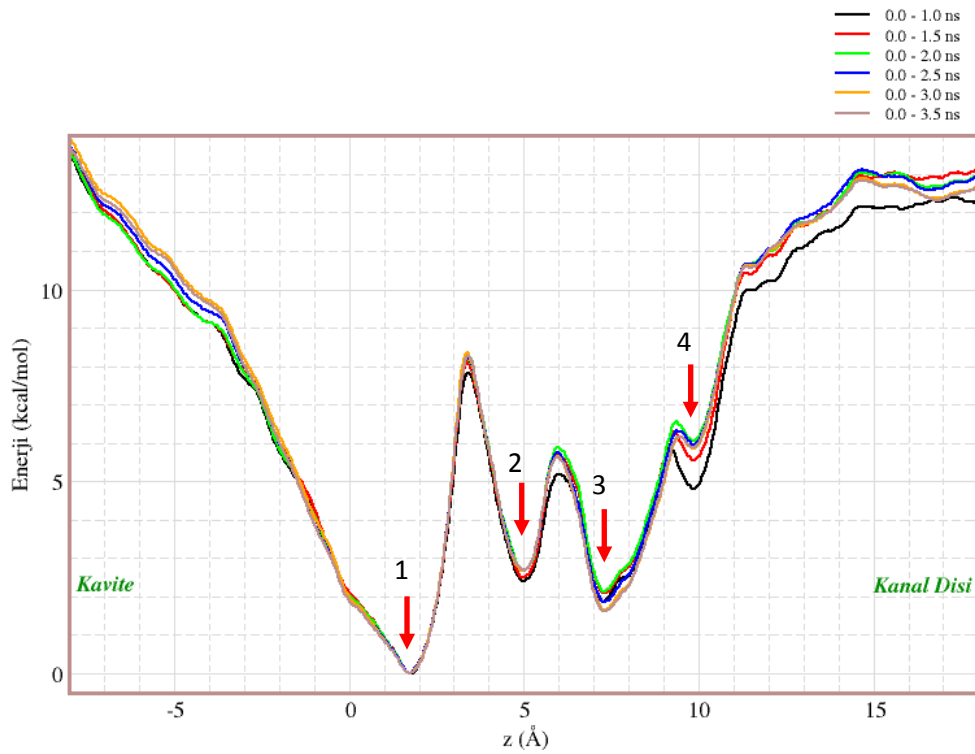
Şekil 6.24'te yarım ns'lik süreler içerisinde simülasyon verilerinde WHAM analizi kullanılarak elde edilen PMF eğrileri verilmiştir. Grafiğin minimumları kalsiyum iyonunun filtrede bağlanma pozisyonlarını göstermektedir. Global minimum olan pozisyonlar her yarım nanosaniyede aynı olduğu için bu noktada eğriler üst üste getirilmiş grafiğin minimum pozisyonlarının tutarlılığı incelenmiştir. Ancak sodyum iyonunda olduğu gibi potansiyel değerlerinde dalgalanmalar mevcuttur.



Şekil 6.24. Kalsiyum iyonu için 0,5 ns'lik süreler içerisinde simülasyon verilerinin PMF eğrileri

Şekil 6.25'de örnekleme süresi artırılarak 0 dan 3,5 ns süresine kadar 1 ns 'lik adımlarla artırılarak toplanan simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrileri gösterilmiştir. Bu eğriler PMF eğrilerinin küçük dalgalanmalar içerisinde yakınsadığını göstermektedir. Bu eğrileri kullanarak mutlak minimum ile lokal minimumlar ve yığın pozisyonu arasındaki enerji farklılıklarını $\pm 1 \text{ kcal/mol}$

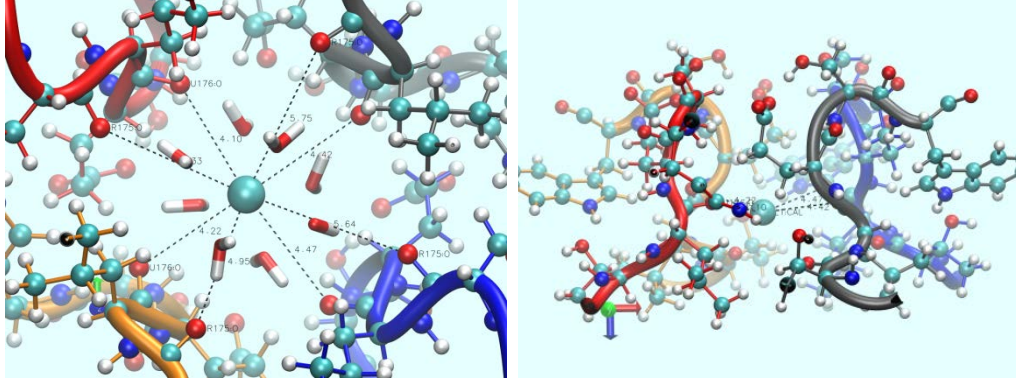
belirsizliğinde söylemek mümkündür. Grafikten yığın pozisyon ile en derin bağlanma pozisyonu arasındaki enerji farkının ortalama $12,5 \text{ kcal/mol}$ olduğu çıkarılmaktadır. Kalsiyum iyonu PMF grafiği (Şekil 6.25) sodyum iyonu PMF grafiği (Şekil 6.12) ile karşılaştırıldığında minimum noktalarının benzer yerlerde çıktığı ancak kalsiyum iyonunun daha derin bir potansiyel ile bağlandığı görülmektedir.



Şekil 6.25. Kalsiyum iyonu için örnekleme süresi 0'dan 3,5 ns süresine kadar 0,5 ns'lik adımlarla artırılarak toplanan simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrileri

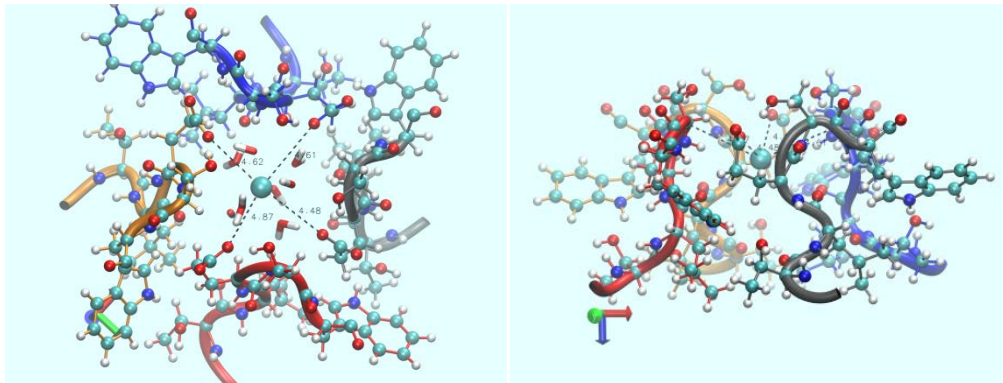
Şekil 6.25'de görülen her bir minimum numaralandırıldı ve bu konumlarda sistemin analizi yapıldı. 1 nolu minimumda kalsiyum iyonu z ekseninde $2,12 \text{ Å}$ 'da bulunmaktadır. Şekil 6.26a ve 6.26b'de görüldüğü üzere kalsiyum iyonun birinci su kabuğunda bulunan sular hem Thr175 karbonil oksijenleri ile hem Leu176 karbonil oksijenleriyle koordinasyon sağlamaktadır. Ayrıca kalsiyum iyonunun 1. su kabuğunda 8 adet su molekülü bulunmaktadır. Bu deneysel değerden (7 su) fazladır,

dolayısıyla kalsiyum iyonunun kuvvet alanları parametrelerinin doğruluğunu sorgulamak için yeterli bir nedendir.



Şekil 6.26 a) Thr175 ve Leu176 karbonil oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

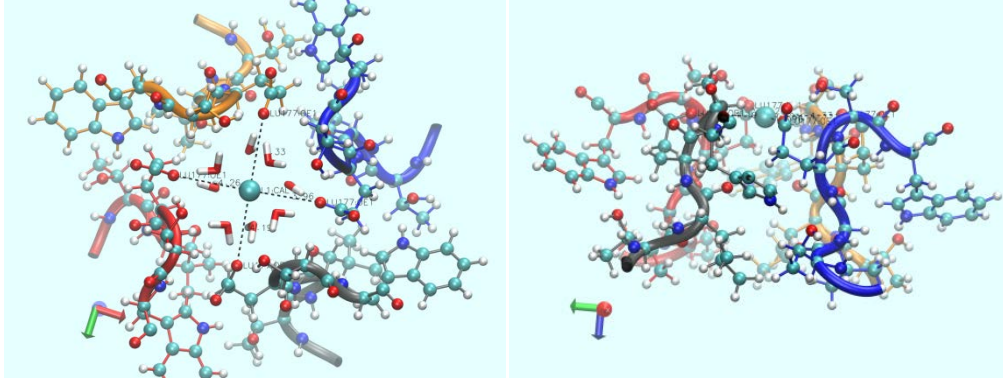
2 nolu minimumda kalsiyum iyonu z ekseninde 5,16 Å'da bulunmaktadır. Şekil 6.27a ve 6.27b'de görüldüğü üzere kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda sular Glu177 yan zincir oksijenleri ile koordinasyon sağlamaktadır. Ayrıca kalsiyum iyonunun 1. su kabuğunda 8 adet su molekülü bulunmaktadır.



Şekil 6.27. a) Glu177 yan zincir oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

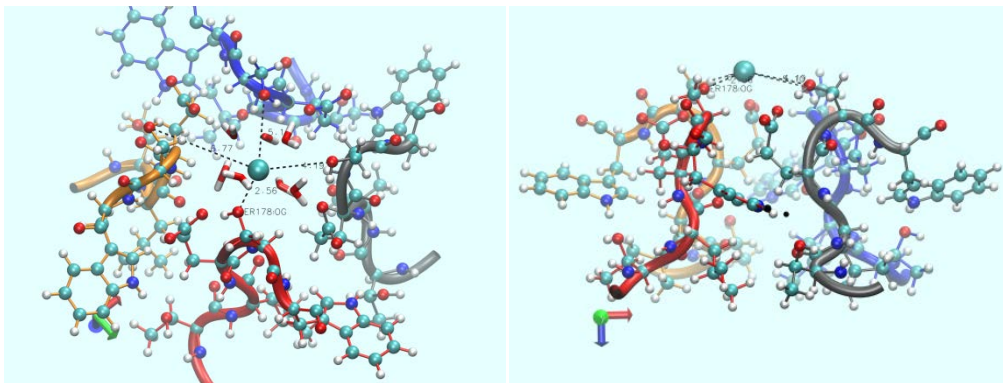
3 nolu minimumda kalsiyum iyonu z ekseninde 7,21 Å'da bulunmaktadır. Şekil 6.28a ve 6.28b'de görüldüğü üzere kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan

sular Glu177 yan zincir oksijenleri ile koordinasyon sağlamaktadır. Ayrıca kalsiyum iyonunun 1. su kabuğunda 8 adet su molekülü bulunmaktadır.



Şekil 6.28. a) Glu177 yan zincir oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

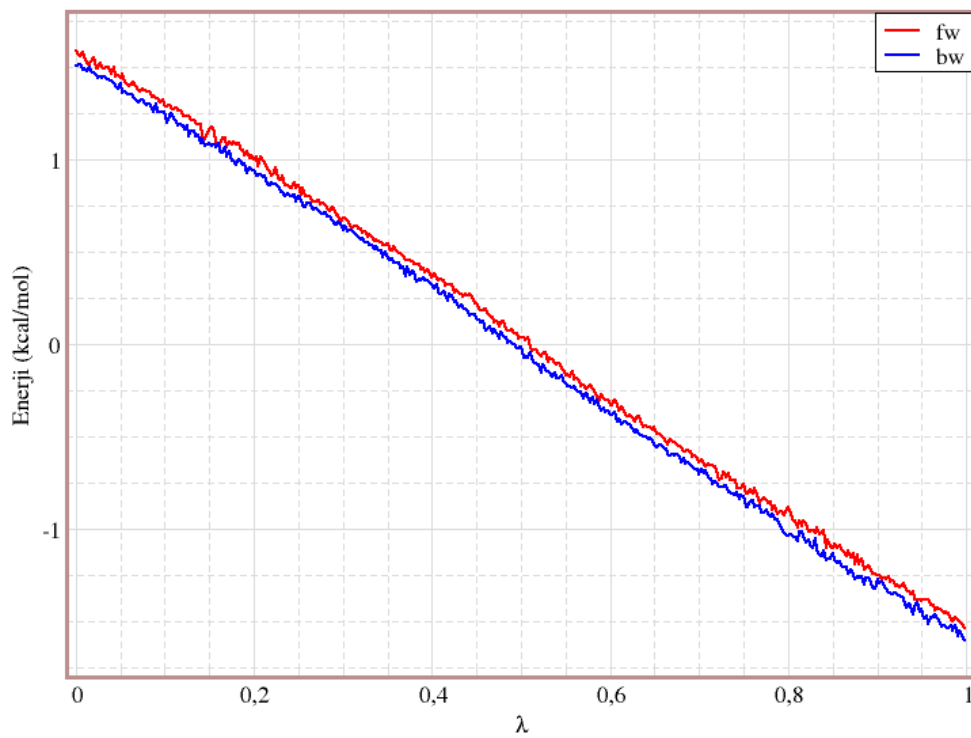
4 nolu minimumda kalsiyum iyonu z ekseninde 10,2 Å'da bulunmaktadır. Şekil 6.29a ve 6.29b'de görüldüğü üzere kalsiyum iyonun birinci su kabuğunda bulunan sular Ser178 karbonil oksijenleri ile koordinasyon sağlamaktadır. Kalsiyum iyonu zincirlerden birisiyle hidrojen bağı yapmış ve bu uzaklık 2,56 Å olarak ölçülmüştür. Ayrıca kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda 6 adet su molekülü bulunmaktadır.



Şekil 6.29. Ser178 yan zincir oksijenleri ile kalsiyum iyonunun birinci su kabuğunda bulunan su moleküllerinin filtre üstü ve b) yandan görünümü

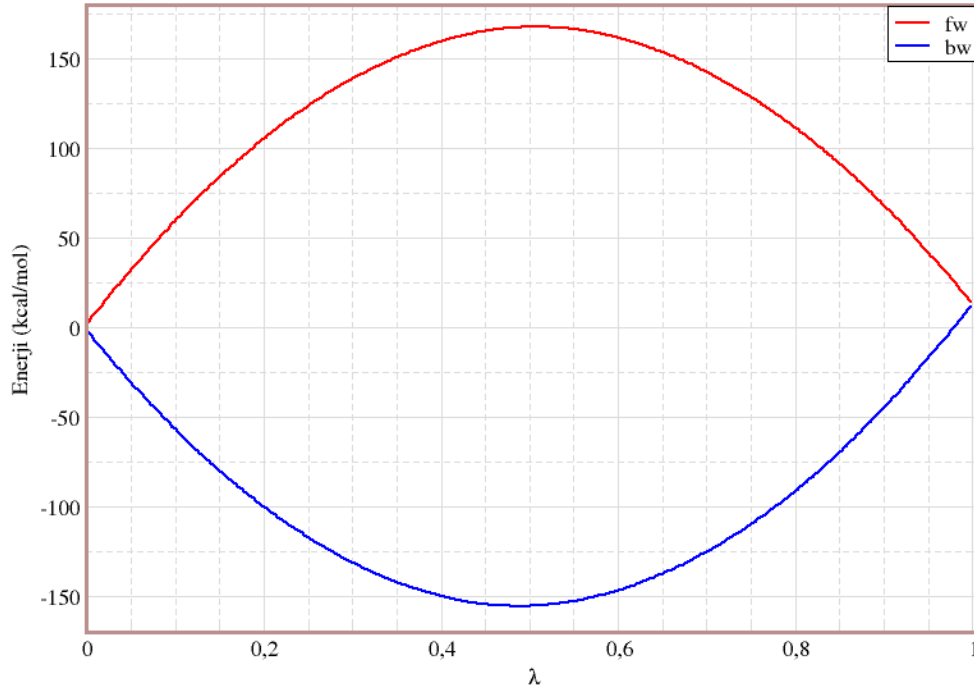
Kalsiyum iyonu için sodyum iyonunda olduğu gibi FEP hesaplamasında global minimumda bulunan kalsiyum iyonu yok edilerek belirlenen bulk pozisyonunda

kalsiyum iyonu oluşturulmuştur. Serbest enerji süreci sodyumda olduğu gibi ilerletilmiştir. Kalsiyum iyonu için λ değeri 0 ile 1 arasında 400 eşit parçaya ayrılmış ve iş bu şekilde koşturulmuştur. PMF hesabı ile karşılaştırılması için iyon pozisyonları global minimumda z eksenini 1,60 Å ve bulk pozisyon için z eksenini 16,6 Å olarak belirlenmiştir. Şekil 6.30’ da forward ve backward hesaplamaları için her λ değerine karşılık gelen ΔG enerji değerleri görülmektedir.



Şekil 6.30. Forward ve backward enerji hesaplamaları için her λ değerine karşılık gelen ΔG enerji değerleri

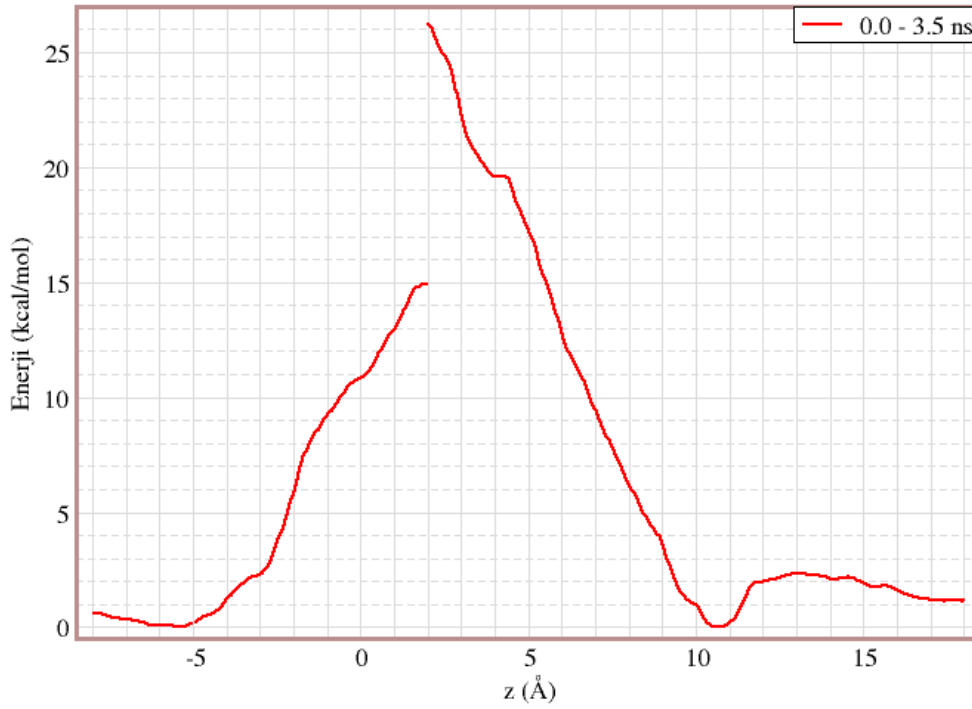
Şekil 6.31’de FEP süresince yapılan forward ve backward hesaplamaları sonucu kalsiyum iyonunun FEP değeri ortalama olarak 12,90 *kcal/mol* olarak bulunmuştur. Burada elde edilen serbest enerji farkı iyon pozisyonunu değiştirmekten kaynaklanan katkıyı da (yaklaşık 1 *kcal/mol*) içermektedir. Bu katkının çıkartılması sonucu FEP değeri 11,90 *kcal/mol* olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak elde edilen serbest enerji değeri ile PMF hesabı ile elde edilen değer arasında 0,6 *kcal/mol* bir fark çıkmaktadır. Bu sonuç hata değerleri içerisinde gayet uyumludur.



Şekil 6.31. Kalsiyum iyonunun serbest enerji pertürbasyon grafiği

6.3.4. Kanalda kalsiyum iyonu bulunduğunda sodyum iyonunun PMF hesabı

Çalışmanın bu bölümünde kalsiyum iyonu global minimum noktasında iken sodyum iyonunun filtre boyunca PMF hesabı yapılmıştır. Buradaki amacımız kalsiyum iyonu NavAb kanalının tıkanmasına sebep oluyor mu, sorusunun cevabını bulmaktır. Yukarıda anlatıldığı gibi PMF hesabı için verilen prosedür burada da aynen uygulandı. PMF hesabı yapılırken z ekseninde 18 ile $-8 \text{ \AA}$ aralığı dikkate alındı ve $0,5 \text{ \AA}$ 'luk 53 parçaya bölünerek işler koşturuldu. Yukarıda edindiğimiz tecrübeler doğrultusunda PMF sırasında sodyum iyonu üzerine x ve y yönlerinde kısıtlama kuvveti konulmadı ve z yönünde $10 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ 'lik kısıtlama kuvveti konuldu. Filtrede $z = 2 \text{ \AA}$ noktasında bulunan kalsiyum iyonu üzerine herhangi bir kuvvet uygulanmadı. Hesaplamalar $0,5 \text{ ns}$ 'lik 7 iş çalıştırılarak toplamda $3,5 \text{ ns}$ iş çalıştırılarak yapılmıştır. Şekil 6.32'de görüldüğü üzere kalsiyum iyonu filtre içerisinde iken sodyum iyonunun filtre içerisinden geçmesi mümkün görülmemektedir. Zira potansiyel engel çok yüksek görülmektedir.



Şekil 6.32. Kalsiyum iyonu filtre içinde bulunduğunda sodyum iyonu için 0,0 – 3,5 ns’lik simülasyon verilerinden elde edilen PMF eğrisi

Bu sonuç deneysel verilerle uyum içerisinde değildir. Zira deneyler, filtrede bir kalsiyum iyonu varken azda olsa sodyum akımının olduğunu ileri sürmektedir [Shaya ve ark., 2011]. Deneyle olan uyumsuzluğun iki nedeni olabilir. Birincisi problemin 1 boyutlu incelenmesidir. Burada z eksenine koyduğumuz reaksiyon yolu üzerindeki potansiyel hesabının yapılması, eksen dışı değerlerin ihmal ediliyor olmasıdır. Halbuki ikinci iyon mutlaka eksenden kayacaktır. Zira Ben Corry’nin makalesinde [Corry, 2013] benzer bir çalışma 2 boyutlu yapılmış deneyle uyumlu olduğu iddiasında bulunulmuştur. O makalede verilen sonuçlar, bizim 1 boyutlu PMF hesabına karşılık gelen kısmın sonuçlarıyla uyumlu değildir. Zira bu farkın yakınsama probleminden olduğunu yukarıda kaydettik. Bu sonuçların karşılaştırmasındaki uyumsuzluğun yine yakınsama probleminden kaynaklanacağını öne sürebiliriz. Deneyle olan uyumsuzluğun ikinci nedeni de kalsiyum iyonu için kullanılan kuvvet alanları parametrelerinin yanlış olabileceğidir. Yukarıda kalsiyum iyonunun birinci hidrasyon kabuğunda bulunan su sayısı deneysel değer olan 7 değil 8 olarak bulunmuştu. Başka literatür kaynakları [Baştuğ ve Kuyucak, 2006] da kalsiyum kuvvet parametrelerinin sorunlu olduğuna işaret etmişlerdir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücre zarından iyonların geçişi hücre biyolojisinin en önemli temel süreçlerindendir. Yaşayan organizmalarda membran kanallarından iyon ya da ligantların geçirilmesiyle hücre-hücre iletişimi ve sinyal geçişi, kas gevşemesi veya daralması gibi fizyolojik süreçler başlamaktadır. Bu süreçte iyon kanalları birkaç milisaniyelik sürede binlerce iyonu hücre zarından geçirmeye çalışır. Böyle bir durumda biyolojik iyon kanallarını membran duvarında sadece bir delik olmaktan ayıran en önemli özellik seçicilik özelliğidir. Diğer bir deyişle, iyon kanalları belli türlerde iyonları iletmek için tasarlanmışlardır. Hücre zarında bulunan taşıyıcı proteinler ise belirli moleküllere yapışırlar ve sadece bunları hücre içine getirirler. Bu görevlerini yerine getirirlerken şekillerinde bir değişiklik olur. Bu nedenle maddeleri hücre zarından geçirmek için genellikle enerjiye ihtiyaç duyarlar. Membran proteinlerinin moleküler yapı tayinleri genel olarak çözülmemiş bir problem olmasına rağmen, son on beş yılda bu durum değişmektedir. Bu gelişmelerin yanında, son yirmi yılda bilgisayarlardaki yazılım ve donanımsal ilerlemeler ve aynı zamanda atomik ölçekte biyolojik sistemleri çalışmak için geliştirilen moleküler modelleme yöntemleri şuan karmaşık kimyasal ve biyolojik sorunları çözmemizi sağlamaktadır.

Membran protein sisteminin tam olarak anlaşılması için kimyasal süreçlerin serbest enerji davranışlarının incelenmesi gerekir. MD simülasyonları sistem mekanizması ve dinamikleri ile ilgili yararlı bilgiler sağlayabilir, ancak deneysel karakteristiklerin büyük bir kısmı sistemin serbest enerji bilgilerinden anlaşılabilir. Sistemin serbest enerjisi, verilen bir durumda sistemin nasıl bulunduğunu tanımlayabilir. Daha uygun bir deyişle iki durum arasındaki serbest enerji farkı hesaplanır.

Bu tez çalışmasında üzerinde durulan birinci biyolojik yapı bakteriyel bir membran taşıyıcısı olan lösin taşıyıcısıdır. LeuT için iki Na^+ iyonu ve Leu aminoasiti bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Leu aminoasiti ayrıca yapısal bağlantıyı sağlayarak taşıyıcının kapanmasını sağlamaktadır. Burada yapılan hesaplama çalışmaları nörotransmitter alımı ve taşınımını etkileyen farklı mikroskobik faktörleri incelememiz açısından iyi bir fırsat sağlar.

Bu çalışmada serbest enerji metotları kullanarak ilk defa, Leu taşıyıcı proteini için Na^+ iyonunun bağlanma pozisyonları ve bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Bağlanma enerjilerinden hangi pozisyona öncelikle iyon bağlanacağı tahmin edilmiştir. Buradan görülmektedir ki, sisteme ilk Na^+ iyonu Na2 pozisyonuna bağlanmaktadır. İkinci Na^+ iyonu Na1 pozisyonuna bağlanmaktadır ve son olarakta sisteme Leu aminoasiti bağlanmaktadır, zira en az bağlanma enerjisi ona aittir. Simulasyonda elde ettiğimiz yapı resmi, enerji hesabında çıkardığımız sonuçlarla uyumludur.

İyon ve ligant taşıyıcıya bağlandıktan sonra taşıyıcıda bir konformasyon değişikliği olmakta ve taşıyıcının hücre dışı bölgesindeki kapı kapanmakta aynı zamanda da hücre içi bölgesindeki kapı açılmaktadır. Taşıyıcıdaki bu konformasyon değişikliği iyon ve ligandın bağlanma afinitelerini değiştirmekte, Na1 pozisyonuna bağlanan Na^+ iyonu taşıyıcıyı ilk olarak terk etmektedir. Sonra sırasıyla Na2 pozisyonuna bağlanan Na^+ iyonu ve ligant taşıyıcıdan ayrılmaktadır. Boş durumda kalan taşıyıcı tekrar konformasyon değişikliğine giderek ilk durumuna geri dönmektedir. Bu çalışma sırasında hücre içi kapısı açık olan LeuT protein yapının 3 boyutlu kristal yapısı bulunamamış olduğundan iyon/ligant taşınmasına dair ileri sürdüğümüz tezin ikinci kısmını kesin olarak göstermemiz mümkün olmamıştır. Ancak homoloji modellerinden elde edilen yapılarla göstermek denenebilir ama bunun içinde çok iyi test edilmiş homoloji yapısına ihtiyaç olduğundan çalışmanın bu kısmının gelecekte devam edilmesi hedeflenmektedir.

Bu tez çalışmasında üzerinde durulan ikinci biyolojik sistem ise aksiyon potansiyeli olarak da adlandırılan elektrik sinyallerini, sinir sistemindeki bilgileri ve fizyolojik süreçleri düzenleyen NavAb hücre zarı kanallarıdır. NavAb kanallarından iyon geçişinin nasıl olduğu ve seçici filtrenin davranışının nasıl olduğu hakkında genel sonuçlar PMF ve FEP hesapları yardımı ile çıkartıldı. Sodyum iyonunu NavAb kanalından geçişinin serbest enerji hesaplamalarında FEP ve PMF hesapları sonucu elde edilen değerler mükemmel bir uyum içerisinde ve rahatlıkla hesapladığımız değerlerin doğruluğunu iddia etmemiz mümkündür. Bu konuda önceki yapılan çalışmalardan farklı olarak enerji hesaplarında yakınsama problemi çalışılmış ve

3,5 ns 'lik bir örnekleme zamanının gerekli olduğu ortaya konulmuştur. Önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında bağlanma pozisyonları gayet uyumlu elde edilmiş, ancak bağlanma enerjilerinin, özellikle de enerji bariyerlerinin farklı çıktığı gözlenmiştir. Farklılığın kaynağının literatürde bulunan çalışmalarda eksik olan yakınsama probleminden olduğu kanaatindeyiz.

Kalsiyum iyonunun NavAb kanalından geçişinin enerji hesaplamasında elde edilen FEP ile PMF değerinin 0,6 kcal/mol 'lük hata içerisinde uyumlu oldukları gösterilmiştir. Ayrıca kanalda bir Ca^{++} iyonu varken Na^{+} iyonunun kanaldan geçmediği yapılan PMF hesabı ile gösterilmiştir. Ne yazık ki burada elde edilen sonuçlar deneysel verilerle uyum içerisinde değildir. Zira deneyler filtrede bir kalsiyum iyonu varken azda olsa sodyum akımının olduğunu ileri sürmektedir [Shaya ve ark., 2011]. Deneylerle olan uyumsuzluğun iki nedeni olabilir. Birincisi problemin 1 boyutlu incelemesidir. Yani z eksenine koyduğumuz reaksiyon yolu üzerindeki potansiyel hesabının yapılması ve eksen dışı değerlerin ihmal ediliyor olmasıdır. Halbuki ikinci iyon mutlaka eksenden kayacaktır. Zira Ben Corry'nin makalesinde [Corry, 2013] benzer bir çalışma 2 boyutlu yapılmış deneye uyumlu olduğu iddiasında bulunulmuştur. Corry'nin sonuçlarından bizim 1 boyutlu PMF hesabına karşılık gelen kısmı bizim sonuçlarla uyumlu değildir. Zira bu farkın yakınsama probleminden kaynaklandığını yukarıda kaydettik. Deneyle olan uyumsuzluğun ikinci nedeni de kalsiyum iyonu için kullanılan kuvvet alanları parametrelerinin yanlış olabileceğidir. Yukarıda kalsiyum iyonunun birinci hidrasyon kabuğunda bulunan su sayısı deneysel değer olan 7 değil 8 olarak bulunmuştu. Başka literatür kaynakları [Baştuğ ve Kuyucak, 2006] da kalsiyum kuvvet parametrelerinin sorunlu olduğuna işaret etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Akhshi, P., "Molecular Dynamics Simulation Studies of Ion Transport Along G-Quadruplex Dna Channels" Doktora Tezi, **Queen's University Department of Chemistry**, Canada 18-40 (2013).
2. Alder, B. J. and Wainwright, T. E., "Phase Transition for a Hard Sphere System", **J. Chem. Phys.**, 27, 1208 (1957).
3. Allen, M. P. and Tildesley, D. J., "Computer Simulation of Liquids". Clarendon Press, **Oxford**, hardback edition, (1987).
4. Andersen, H. C., "Rattle: A 'Velocity' Version of the Shake Algorithm for Molecular Dynamics Calculations", **J. Comput. Chem.** 52: 24-34 (1983).
5. Barker, J. A. And Henderson, D., "What is 'Liquid'? Understanding the States of Matter", **Rev.Mod. Phys.**, 48: 587 (1976).
6. Baştuğ T. and Kuyucak, S., "Energetics of Ion Permeation, Rejection, Binding, and Block in Gramicidin A from Free Energy Simulations" **Biophys. J.**, 90: 3941–3950 (2006).
7. Baştuğ, T., Kuyucak, S., "Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins" **Biophysical Reviews**, 4 (3): 271-282 (2012).
8. Battisti A., "Computer Simulation of Biological Systems" Doktora Tezi, **University of Trento, Doctoral School in Physics**, Trento, 15-20 (2012)
9. Behr, J. P., "The Lock-and-Key Principle: The State of The Art-100 Years On", **John Wiley & Sons Ltd.**, (1994).
10. Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Dijkstra, E.J., Achterop, S., van Drunen, R., van der Spoel, D., Sijbers, A., Keegstra, H., Reitsma, B. and Renardus, M.K.R., "GROMACS: A Parallel Computer For Molecular Dynamics Simulations, Physics Computing" **R.A. de Groot and J. Nadrchal, eds. World Scientific**, Singapore, 252-256 (1993).
11. Bennett, H., "Efficient Estimation of Free Energy Differences From Monte Carlo Data" **J. Comp. Phys.**, 22: 245268 (1976).
12. Beveridge, D. L. and DiCapua F. M., "Free Energy via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems", **Annu. Rev. Biophys.**, 18: 431 (1989).
13. Bezanilla, F., "The Action Potential: From Voltage-Gated Conductances to Molecular Structures" **Biol. Res.**, 39: 425–435 (2006).

14. Bond, P. J. and Sansom, M. S. P., "Insertion and Assembly of Membrane Proteins via Simulation", *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 2697–26704 (2006).
15. Bond, P. J., Holyoake, J., Ivetac, A., Khalid, S. and Sansom, M. S. P., "Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins and Peptides", *J. Struct. Biol.*, 157: 593–605 (2006).
16. Born M. and von Kármán, T., "Über Schwingungen in Raumgittern," *Phys. Z.* 13: 297-309 (1912).
17. Bustamante, C., Liphardt, J., Ritort F., "The Nonequilibrium Thermodynamics of Small Systems", *Physics Today*, 58: 43-48 (2005).
18. Buxbaum, E., "Fundamentals of Protein Structure and Function" *Springer Verlag*, ISBN 0387263527 (2007).
19. Calzetta, E. A., "Kinesin and the Crooks Fluctuation Theorem" *European Physical Journal B*, 68: 601-605 (2009).
20. Caplan, D.A., Subbotina, J.O. and Noskov, S.Y., "Molecular Mechanism of Ion–Ion and Ion–Substrate Coupling in The Na⁺ Dependent Leucine Transporter, LeuT", *Biophys. J.* 95: 4613-4621 (2008).
21. Catterall, W. A., "Common modes of Drug Action on Na⁺ Channels: Local Anesthetics, Antiarrhythmics and Anticonvulsants" *Trends Pharmacol. Sci.*, 8:57–65 (1987).
22. Catterall, W. A., "Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology", *Neuron*, 67: 915–928 (2010).
23. Celik, L., Schiott, B. and Tajkhorshid, E., "Substrate Binding and Formation of an occluded State in the Leucine Transporter". *Biophys. J.*, 94: 1600 (2008).
24. Chang, R., Ayton, G. S., and Voth, G. A., "Multiscale Coupling of Mesoscopic and Atomistic-Level Lipid Bilayer Simulations", *J. Chem. Phys.* 122: 244716 (2005).
25. Chiles, R. A. and Rossky, P. J., "Evaluation of Reaction Free Energy Surfaces in Aqueous Solution: An Integral Equation Approach", *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 6867 (1984).
26. Chipot, C. and Pohorille, A., "Free Energy Calculations" *Springer Series in Chemical Physics*, Vol. 86 Springer (2007).

27. Christen, M. and Van Gunsteren, W. F., "Multigraining an Algorithm for Simultaneous Fine-Grained and Coarse-Grained Simulation of Molecular Systems", *J. Chem. Phys.*, 124: 154 (2006).
28. Clementi, C., Nymeyer, H. and Onuchic. J. N., "Topological and Energetic Factors: What Determines The Structural Details of The Transition State Ensemble and 'Enroute' Intermediates For Protein Folding? An Investigation for Small Globular Proteins", *J.Mol. Biol.*, 298: 937-953 (2000).
29. Crooks, G. E., "The Entropy Production Fluctuation Theorem and the Nonequilibrium Work Relation for Free Energy Differences" *Phys. Rev. E*, 60: 2721-2726 (1999).
30. Corry, B. " $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Selectivity in the Bacterial Voltage-Gated Sodium Channel NavAb", *PeerJ*, 1: 16 (2013).
31. Corry, B., Thomas, M. "Mechanism of Ion Permeation and Selectivity in a Voltage Gated Sodium Channel", *J. Amer. Chem. Soc.*, 134 (3): 1840-1846 (2012).
32. Darden, T., York, D. and Pedersen, L., "Particle Mesh Ewald: An $N \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems", *J. Chemical Physics*, 98: 10089-10089 (1993).
33. Darling, D., "Life Everywhere" Basic Books, *New York*, (2001).
34. Darve, E. and Pohorille, A., "Calculating Free Energies Using Average Force", *J. Chem. Phys.*, 115: 9169-9183 (2001).
35. Doyle, D. A., Morais, Cabral J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R., "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity", *Science*, 280: 69-77 (1998).
36. Eisenberg, D. and McGlachlan, A. D., "Solvation Energy in Protein Folding and Binding", *Nature*, 319:199 (1986).
37. Frenkel, D. and Smit, B., "Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications", *Elsevier*, (formerly published by Academic Press) (1996).
38. Furini, S., Domene, C., "Nonselective Conduction in a Mutated Na/K Channel with Three Cation-Binding Sites", *Biophys. J.*, 103: 2106-2114 (2012).

39. Goetz, R. and Lipowsky, R. "Computer Simulations of Bilayer Membranes: Self Assembly and Interfacial Tension", *J. Chem. Phys.*, 108: 7397–73409 (1998).
40. Grubmüller, H., "Predicting Slow Structural Transitions in Macromolecular Systems: Conformational Flooding", *Phys. Rev. E*, 52 (3): 2893-2906 (1995).
41. Guthold, M. and Cho, S. S., "Fibrinogen Unfolding Mechanisms Are Not Too Much of a Stretch", *Structure* 19 (11): 1536-1538 (2011).
42. Hahn, M. K. and Blakely, R. D., "Mono Amine Transporter Gene Structure and Polymorphisms in Relation to Psychiatric and other Complex Disorders", *Pharmacogenomics J.*, 2: 217–235 (2002).
43. Han, D., Namslauer, A., Pawate, A. S., Morgan, J. E., Nagy, S., Vakkasoglu, A. S., Brzezinski, P. & Gennis, R. B. "Replacing Asn207 by Aspartate at the Neck of the D Channel in the Aa3-Type Cytochrome C Oxidase From Rhodobacter Sphaeroides Results in Decoupling The Proton Pump", *Biochemistry*, 45: 14064-14074 (2006).
44. Haynes, D. "Biological Thermodynamics" Cambridge University Press, *Cambridge*, (2008).
45. Heinzelmann, G., Bastuğ T. and Kuyucak, S., "Free Energy Simulations of Ligand Binding to the Aspartate Transporter GltPh" *Biophys. J.*, 101: 2380–2388 (2011).
46. Hille, B., "Ion Channels of Excitable Membranes" 3rd edn, *Sinauer Associates*, (2001).
47. Hills, R. D. and Brooks, C. L., "Insights from Coarse-Grained Go Models for Protein Folding and Dynamics" *Internat. J. Molecular Sciences* 10 (3): 889-905 (2009).
48. Hirata, F. and Rossky, P. J., "An Extended RISM Equation for Molecular Polar Fluids", *Chem.Phys. Letts.*, 83: 329 (1981).
49. Hirata, F., Pettitt, B. M. and Rossky, P. J., "Application of an Extended RISM Equation to Dipolar and Quadrupolar Fluids", *J. Chem. Phys.*, 77: 509 (1982).
50. Hockney, R. W., Goel, S. P. and Eastwood, J., "Quiet High Resolution Compter Models of Plasma", *J. Comp. Phys.*, 14: 148-158 (1974).

51. Hodes, Z. I., Nemethy, G. and Scheraga, H. A., "Model for the Conformational Analysis of Hydrated Peptides. Effect of Hydration on The Conformational Stability of the Terminally Blocked Residues of the 20 Naturally Occurring Amino Acids" **Biopolymers**, 18: 1565 (1979).
52. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., "A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve", **J. Physiol. (Lond.)**, 117: 500–544 (1952).
53. Huber, T., Torda, A. E., and van Gunsteren, W., "Local Elevation - A Method for Improving the Searching Properties of Molecular Dynamics Simulation", **J. Computer-Aided Molecular Design**, 8 (6): 695–708 (1994).
54. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD-Visual Molecular Dynamics", **J. Molecular Graphics**, 14: 33-38 (1996).
55. Hummer, G. and Kevrekidis, I., "Coarse Molecular Dynamics of a Peptide Fragment: Free Energy, Kinetics, and Long-Time Dynamics Computations", **J. Chemical Physics**, 118 (23): 10762-10773 (2003).
56. Iannuzzi, M., Laio, A., and Parrinello, M., "Efficient Exploration of Reactive Potential Energy Surfaces Using Car-Parrinello Molecular Dynamics", **Phys. Rev. Letts.**, 90 (23): 238302 (2003).
57. Jarzynski, C., "Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences", **Physical Review Letters**, 78 (14): 2690-2693 (1997).
58. Jayaram, B., Sharp, K., Honig, B., "The Electrostatic Potential of B-DNA" **Biopolymers**, 28: 975 (1989).
59. Kale, L., Skeel, R., Bhandakar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajan, K. and Schulten, K., "NAMD2: Greater Scale Ability for Parallel Molecular Dynamics", **J. Comput.Phys.** 151: 283–312 (1999).
60. Karplus, M. and Kushick, J., "Method for Estimating the Configurational Entropy of Macromolecules", **Macromolecules**, 14: 324 (1981).
61. Khabiri, M., "Computational Investigations of Biomolecular Systems and Comparison with Experiments in Various Environmental Conditions", Doktora Tezi, **University Of South Bohemia In Ceske Budejovice Institute of Physical Biology**, 1-5 (2011)
62. King, P. M., "Free Energy via Molecular Simulation: A Primer" **W. F. Van Gunsteren**, (1993).

63. Kirkwood, J. G., "Statistical Mechanics of Fluid Mixtures", *J. Chem. Phys.*, 3: 300 (1935).
64. Klapper, I., Hagstrom, R., Fine, R., Sharp, K., Honig, B., "Focusing of Electric Fields in the Active Site of Cu-Zn Superoxide Dismutase: Effects of Ionic Strength and Amino acid Modification", *Proteins*, 1: 47 (1986).
65. Kofke D. A., "Free Energy Methods in Molecular Simulation", *Fluid Phase Equilibria*, 228-229: 41-48 (2005).
66. Koishi, R., Xu, H., Ren, D., Navarro, B., Spiller, B. W., Shi, Q., Clapham, D. E., "A Superfamily of Voltage-Gated Sodium Channels in Bacteria" *J. Biol. Chem.*, 279: 9532–9538 (2004).
67. Kuyucak, S. and Baştuğ, T., "Physics of Ion Channels" *J. Biological Physics*, 29: 429–446 (2003).
68. Laio, A. and Gervasio, F.L., "Metadynamics: A Method to Simulate Rare Events and Reconstruct the Free Energy in Biophysics, Chemistry and Material Science", *Reports on Progress in Physics*, 71: 126601 (2008).
69. Levitt, M. and Warshel, A., "Computer Simulation of Protein Folding", *Nature*, 253, 694-698 (1975).
70. Lipscomb, T. J., "Gpu-Optimized Molecular Dynamics Simulations", Yüksek Lisans Tezi, *Wake Forest University Graduate School Of Arts And Sciences*, Winston-Salem, North Carolina, 27-35 (2012).
71. Long, S. B., Campbell, E. B. and Mackinnon, R., "Crystal Structure of A Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K1 Channel" *Science* 309: 897–903 (2005).
72. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. and MacKinnon, R., "Atomic Structure of a Voltage dependent K1 Channel in a Lipid Membrane-Like Environment", *Nature*, 450: 376–382 (2007).
73. Lopez, C. F., Nielsen, S. O., Moore, P. B. and Klein, M. L., "Understand Nature's Design for a Nanosyringe" *PNAS USA*, 101: 4431–4434 (2004).
74. Lu, N., Singh, J. K. and Kofke, D. A., "Appropriate Methods to Combine Forward and Reverse Free-Energy Perturbation Averages", *J. Chem. Phys.*, 118: 2977–2984 (2003).
75. Marrink, S. J., de Vries, A. H. and Mark, A. E., "Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations", *J. Phys. Chem. B*, 108: 750–760 (2004).

76. Masson, J., Sagne, C., Hamon, M. and Mestikawy, S. E., "Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System", *Pharmacol. Rev.*, 51: 439–464 (1999).
77. Matthew, J. B., "Electrostatic Effects in Proteins" *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 14: 387 (1985).
78. Metropolis, N, Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., Teller, E. J., "Equation of State Calculations by Fast Computing Machines" *Chem. Phys.*, 21 (6): 1087 (1953)
79. Mones, L., "Investigation of Complex Systems by Hybrid QM/MM Molecular Dynamics Simulations", Doktora Tezi, *Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University*, Budapest, 1-5 (2011)
80. Murtola, T., Falck, E., Patra, M., Karttunen, M. and Vattulainen, I., "Coarse-Grained Model for Phospholipid/Cholesterol Bilayer", *J. Chem. Phys.*, 121: 9156–9165 (2004).
81. MacKerell, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M., "All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins", *J. Phys. Chem. B* 102: 3586–3616 (1998)
82. Nelson, P., "Biological Physics Freeman", *New York* (2004).
83. Nielsen, S. O., Lopez, C. F., Ivanov, I., Moore, P. B., Shelley, J. C. and Klein, M. L., "Transmembrane Peptide-Induced Lipid Sorting and Mechanism of L α -to-Inverted Phase Transition Using Coarse-Grain Molecular Dynamics" *Biophys. J.*, 87: 2107–2115 (2004).
84. Nielsen, S. O., Lopez, C. F., Srinivas, G., and Klein, M. L., "Coarse Grain Models and The Computer Simulation of Soft Materials", *J. Phys. Cond. Matt.* 16: R481–R512 (2004).
85. Noskov, S.Y., "Molecular Mechanism of Substrate Specificity In The Bacterial Neutral Amino Acid Transporter LeuT", *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 73: 851-863 (2008).
86. Noskov, S.Y., Roux, B., "Control of Ion Selectivity in LeuT: Two Na⁺ Binding Sites With Two Different Mechanisms", *J. Mol. Biol.* 377: 804-818 (2008).

87. Owens, M. J. and Nemeroff, C. B., "Role of Serotonin in the pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter", ***Clin. Chem.***, 40: 288–295 (1994).
88. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. and Catterall W. A., "The Crystal Structure of a Voltage-Gated Sodium Channel" ***Nature***, 475: 353-359 (2011).
89. Pearlman, D.A., Case, D.A., Caldwell, J.W., Ross, W.S., Cheatham, T.E., DeBolt, III, S., Ferguson, D., Seibel, G., and Kollman, P., "AMBER, A Package of Computer Programs for Applying Molecular Mechanics, Normal Mode Analysis, Molecular Dynamics and Free Energy Calculations to Simulate the Structural and Energetic Properties of Molecules" ***Comp. Phys. Commun.*** 91: 1-41 (1995).
90. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K., "Scalable Molecular Dynamic Swith NAMD" ***J. Comput. Chem.***, 26: 1781–1802 (2005).
91. Pincus, D. L., Cho S. S., Hyeon, C. and Thirumalai, D., "Minimal Models for Proteins and RNA From Folding to Function" ***Prog Mol Biol Transl Sci.***, 84 (203): 50 (2008).
92. Rahman, A., "Correlations in the Motion of Atoms in Liquid" ***Argon*** A136: 405 (1964).
93. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V., "Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations" ***J. Molecular Biology***, 7: 95 (1963).
94. Rashin, A. A. and Honig, B., "Reevaluation of the Born Model of Ion Hydration", ***J. Phys.Chem.***, 89: 5588 (1985).
95. Rashin, A. A. and Namboodiri, K., "A Simple Method for the Calculation of Hydration Enthalpies of Polar Molecules With Arbitrary Shapes", ***J. Phys, Chem.***, 91: 6003 (1987).
96. Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., Clapham, D.E., "A Prokaryotic Voltage-Gated Sodium Channel", ***Science*** 294: 2372–2375 (2001).
97. Ritort, F., "Nonequilibrium fluctuations in small systems: From physics to biology", ***Advances in Chemical Physics***, 137: 31-123 (2008).
98. Ryan, D. P. and Ptacek, L. J., "Episodic Neurological Channelopathies", ***Neuron***, 68: 282–292 (2010).

99. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. "Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of A System with Constraints: Molecular Dynamics of N-Alkanes" *J. Comput. Chem.*, 23: 327-341 (1977).
100. Schrodinger, E., "What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell", Cambridge University Press, **Cambridge**, (1945).
101. Schnuelle, G. W., Swaminathan, S., Beveridge, D. L., "A Statistical Thermodynamic Supermolecule-Continuum Study of Ion Hydration II Cell and Shell Methods", *Theor. Chim.Acta*, 48: 17 (1978).
102. Shea, J. E. and Brooks. C. L., "From Folding Theories to Folding Proteins: A Review and Assessment of Simulation Studies of Protein Folding and Unfolding", *Annual review of physical chemistry*, 52: 499-535 (2001).
103. Shelley, J. C., Shelley, M. Y., Reeder, R. C., Bandyopadhyay, S. and Klein, M. L., "A Coarse Grain Model for Phospholipid Simulations", *J. Phys. Chem. B* 105: 4464–4470 (2001).
104. Shaya D., Kreirb, M., Robbinsc, RA., Wonga, S., Hammona, J., Brüggemannb, A. and. Minor, DL. "Voltage-Gated Sodium Channel (Na-V) Protein Dissection Creates A Set of Functional Pore-Only Proteins", *PNAS USA*, 108: 12313–12318 (2011).
105. Shi, Q., Izvekov, S. and Voth, G. A., "Mixed Atomistic And Coarse-Grained Molecular Dynamics: Simulation of a Membrane-Bound Ion Channel", *J. Phys. Chem. B*, 110: 15045–15048 (2006).
106. Shih, A. Y., Arkhipov, A., Freddolino, P. L. and Schulten, K., "Coarse Grained Proteinlipid Model with Application to Lipoprotein Particles", *J. Phys. Chem. B*, 110: 3674–3684 (2006).
107. Smit, B., Hilbers, A. J., Esselink, K., Rupert, L. A. M., Van Os, N. M., and Schlijper, G., "Computer Simulations of a Water/Oil Interface in the Presence of Micelles", *Nature*, 348: 624–625 (1990).
108. Stevens, M. J., Hoh, J. H., and Woolf, T. B., "Insights into the Molecular Mechanism of Membrane Fusion from Simulation: Evidence for the Association of Splayed Tails", *Phys. Rev. Letts.*, 91: 188102 (2003).
109. Stillinger, F. H. and Rahman, A. J., "Improved Simulation of Liquid Water by Molecular Dynamics", *Chem. Phys.*, 60: 1545 (1974).
110. Straatsma, T. P., Berendsen, H. J. C. and Postma, J. P. M., "Free-Energy of Hydrophobic Hydration: A Molecular-Dynamics Study of Noble-Gases in Water", *J. Chemical Physics*, 85: 6720-6727 (1986).

111. Şengül, S. “Atomik Simülasyon Yöntemleri İle Sıvı Hcp Metal Ve Metal Alaşımlarının İncelenmesi”, Doktora Tezi, **Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Edirne,1-5 (2008).
112. Tanford, C. and Kirkwood, J. G., “The Configuration of Base-Denatured β -Lactoglobulin”, **J.Am. Chem. Soc.**, 79: 5333 (1957).
113. Tepper, H. L. and Voth, G. A., “A Coarse-Grained Model for Double-Helix Molecules in Solution: Spontaneous Helix Formation and Equilibrium Properties”, **J. Chem. Phys.** 122: 124906 (2005).
114. Torres, G. E., Gainetdinov, R. R. and Caron, M. G., “Plasma Membrane Mono Amine Transporters: Structure, Regulation and function”, **Nat. Rev. Neurosci.**, 4: 13–25 (2003).
115. Tozzini, V., “Coarse-Grained Models for Proteins” **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 15: 144–150 (2005).
116. Tuckerman, M., Berne, B. J., Martyna, “Reversible Multiple Time Scale Molecular Dynamics”, **G. J. J. Chem. Phys.**, 97: 1990-2001. (1992)
117. Tuszynski, J. and Kurzynski, M., “Introduction to Molecular Biophysics” **CRC Press**, Boca Raton, (2003).
118. Vakkasoglu, A. S., Morgan, J. E., Han, D., Pawate, A. S. and Gennis, R. B., “Mutations Which Decouple the Proton Pump of The Cytochrome C Oxidase from Rhodobacter Sphaeroides Perturb the Environment of Glutamate 286”, **FEBS Letts.**, 580: 4613-4617 (2006).
119. Venturoli, M., Smit, B. and Sperotto, M. M., “Simulation Studies of Protein-Induced Bilayer Deformations, and Lipid-Induced Protein Tilting, on A Mesoscopic Model for Lipid Bilayers with Embedded Proteins” **Biophys. J.**, 88: 1778–1798 (2005).
120. Voter, F., “Hyperdynamics: Accelerated Molecular Dynamics of Infrequent Events”, **Phys. Rev. Letts.**, 78 (20): 3908–3911 (1997).
121. Warshel, A. and Levitt, M., “Theoretical Studies of Enzymatic Reactions: Dielectric Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme”, **J. Mol. Biol.**, 103: 227 (1976).
122. Warshel, A., “Electrostatic Basis of Structure-Function Correlation in Proteins”, **Acc. Chem. Res.**, 14: 284 (1981).
123. Watson, J. D. and Crick, F. H. C., “Molecular Structure of Nucleic Acids” **Nature**, 171: 737-738 (1953).

124. Weiner, P. K. and Wilkinson, A. J., "Computer Simulation of Biomolecular Systems: Theoretical and Experimental Applications" **ESCOM, Leiden**, 2: 267–314 (1993).
125. Whitehead, L., Edge, C. M. and Essex, J. W., "Molecular Dynamics Simulation of the Hydrocarbon Region of a Biomembrane Using A Reduced Representation Model" **J. Comput. Chem.**, 22: 1622–1633 (2001).
126. Xu, J. and Voth, G. A., "Computer Simulation of Explicit Proton Translocation in Cytochrome C Oxidase: The D-Pathway", **PNAS USA**, 102: 6795– 6800 (2005).
127. Xu, J. and Voth, G. A., "Free Energy Profiles of H⁺ Conduction in the Pathway of Cytochrome C Oxidase: A Study of the Wild Type and N98D Mutant Enzymes", **Biochim. Biophys. Acta**, 1757: 852-859 (2006).
128. Xu, J., Sharpe, M. A., Qin, L., Ferguson-Miller, S. and Voth, G. A., "Storage of an Excess Proton in the Hydrogen-Bonded Network of the D-Pathway of Cytochrome C Oxidase: Identification of A Protonated Water Cluster", **J. Am. Chem. Soc.**, 129: 2910-2913 (2007).
129. Yada, R. Y., Jackman, R. L. and Nakai, S., "Secondary Structure Prediction and Determination of Proteins-A Review", **International Journal of Peptide and Protein Research**, 31 (1): 98-108 (1988).
130. Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y. and Gouaux, E., "Crystal Structure of A Bacterial Homologue of Na⁺/Cl⁻ Dependent Neurotransmitter Transporters", **Nature**, 437: 215–223 (2005).
131. Yu, F. H. and Catterall, W. A., "The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis" **Sci. STKE**, 2004: re15 (2004).
132. Yue, L., Navarro, B., Ren, D., Ramos, A. And Clapham, D. E., "The Cation Selectivity Filter of the Bacterial Sodium Channel, NaChBac", **J. Gen. Physiol.**, 120: 845–853 (2002).
133. Zdravkovic, I., Zhao, C., Lev, B., Cuervo, JE., Noskov SY., "Atomistic Models of Ion and Solute Transport by the Sodium-Dependent Secondary Active Transporters", **Biochimica et Biophysica Acta**, 1818: 337-347 (2012).
134. Zhao, C.F., Caplan, D.A., Noskov, S.Y., "Evaluations of the Absolute and Relative Free Energies for Antidepressant Binding to the Amino Acid Membrane Transporter LeuT with Free Energy Simulations", **J. Chem. Theory Comput.** 6: 1900-1914 (2010).

135. Zhao, Y., Scheuer, T. and Catterall, W. A., “Reversed Voltage-Dependent Gating of a Bacterial Sodium Channel with Proline Substitutions in the S6 Transmembrane Segment”, *PNAS USA*, 101: 17873–17878 (2004).
136. Zhmurov, A., Dima, RI., Kholodov, Y., Barsegov, V., “Sop-GPU: Accelerating Biomolecular Simulations in the Centisecond Timescale Using Graphics Processors”, *Proteins* 78 (14): 2984-2999 (2010).
137. Zhmurov A., Brown AEX., Litvinov RI., Dima RI., Weisel JW., Barsegov V., “Mechanism of Fibrin(ogen) Forced Unfolding”, *Structure*, 19 (11): 1615-1624 (2011).
138. Zichi, D. A. and Rossky, P. J., “Molecular Conformational Equilibria in Liquids”, *J. Chem. Phys.*, 84: 1712 (1986).
139. Zwanzig, R. W., “High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method 1. Nonpolar gases”, *J. Chem. Phys.*, 22: 1420–1426 (1954).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇAVUŞ, Murat
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 03.02.1982 Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (505) 585 14 26
 e-mail : murat.cavus@bozok.edu.tr, murat.cavus@gazi.edu.tr

Eğitim

<i>Derece</i>	<i>Eğitim Birimi</i>	<i>Mezuniyet tarihi</i>
Doktora	Gazi Üniversitesi / Fizik Bölümü	2013
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Fizik Bölümü	2007
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Fizik Bölümü	2003

İş Deneyimi

<i>Yıl</i>	<i>Yer</i>	<i>Görev</i>
2006-2007	Gazi Üniversitesi	Öğrenci Asistan
2008-2012	TOBB ETÜ	Proje Asistanı
2012-...	Bozok Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. **Çavuş, M.**, Özbay, A., Kuyucak, S., Baştuğ T., “Na⁺ and Ca⁺⁺ Permeation, Rejection, Binding, and Block in NavAB from Free Energy Simulations”, *submitted to Journal of Physical Chemistry*
2. **Çavuş, M.**, Kuyucak, S., Baştuğ T., “Free energy Simulation of Ion and Ligand Binding to the Leucine Transporters, LeuT” in preperation

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. **Çavuş, M.**, Mercan, Ö., Baştuğ T., “K, Ca ve Cl İyonlarının Birinci Su Kabuğundaki Suların Polarizasyonu”, Türk Fizik Derneği 26. Uluslararası Fizik Kongresi, Sözlü Sunum, Bodrum P: 78 (24-27 Eylül 2009)
2. **Çavuş, M.**, Mercan, Ö., Baştuğ, T., Kuyucak, S., “Molecular Dynamics Simulations and Modeling of Potassium Channels”, Bozok Science Wokshop 2010, oral presentations, Bozok University, Yozgat, P:8 (22 April 2010)
3. Mercan, Ö., **Çavuş, M.**, Baştuğ, T., Kuyucak, S., “Energetics of ion transfer through potassium channels “, 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Sözlü Sunum, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, (22-27 Haziran 2010)
4. **Çavuş, M.**, Baştuğ, T., Kuyucak, S., “Energetics of Ion and Ligand Binding to GLTph and LeuT Transporters”, Bozok Science Wokshop 2011, oral presentations, Bozok University Yozgat, P:7 (21-23 April 2011)
5. **Çavuş, M.**, Baştuğ, T., Kuyucak, S., “Leucine Taşıyıcısına ion ve ligand bağlanmasının enerji hesaplamaları” Türk Fizik Derneği 28. Uluslararası Fizik Kongresi, Sözlü Sunum, Bodrum P: 138 (6-9 Eylül 2011)
6. Demirdelen, M., **Çavuş, M.**, Baştuğ, T., Kuyucak S., “Molecular Dynamics Simulation of Voltage Gated Sodium Channel” 8th Nanoscience and Nanotechnology Congress 2012, oral presentations, Hacettepe University Ankara, Turkey (25-29 June 2012)
7. **Çavuş, M.**, Baştuğ, T., “Application of Jarzynski Equality and Crooks Fluctuation Theorem in Simple versus Complex Systems” 19. İstatistiksel Fizik Günleri, Sözlü Sunum, Sabancı Üniversitesi, İstanbul (28 - 30 Haziran 2012)
8. **Çavuş, M.**, Baştuğ T., and Kuyucak S., “MD simulations of Leucine Transporters” Chemical Physics Congress X, Poster Presentations, TOBB University of Economics and Technology Ankara, Türkiye, (10-12 October 2012)
9. Mercan Tez, Ö., **Çavuş, M.**, Baştuğ T., and Kuyucak S., “Free Energy Profile of K⁺ ion through Gramicidin A Channel” Chemical Physics Congress X, Poster Presentations, TOBB University of Economics and Technology Ankara, Türkiye, (10-12 October 2012)
10. **Çavuş, M.**, Baştuğ, T., Kuyucak, S., “Binding Mechanism of Sodium and Calcium Ion of NavAb Channel” 20. İstatistiksel Fizik Günleri, Sözlü Sunum, Erciyes Üniversitesi, Kayseri (27 - 29 Haziran 2013)