

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PEPTİTLERİN ALTIN (Au) {111}-YÜZEYİ İLE ETKİLEŞİMLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DİDEM ÖZKAYA**

**Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ersin Emre ÖREN**

**AĞUSTOS 2022**



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Didem ÖZKAYA

## ÖZET

Yüksek Lisans

Peptitlerin Altın (Au) {111}-Yüzeyi ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

Didem ÖZKAYA

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ersin Emre ÖREN

Tarih: Ağustos 2022

Proteinler ve peptitler, doğada yaşam için gerekli olan, metabolik reaksiyonları katalize etme, DNA replikasyonu, moleküler taşıma, yumuşak ve sert doku (kemik, diş) oluşumu da dahil olmak üzere çok çeşitli hayati işlevler ve süreçlerde yer alırlar. Günümüzde, protein ve peptitler biyonanoteknolojide inorganik malzemeler (Ag, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Pd, Pt, grafene, hidroksiapatit, vb.) ile bütünleşmiş bir şekilde, biyosentez, biyoalgılayıcılar, ilaç taşıma ve hedeflenmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Burada, peptitlerin malzemelere spesifik olarak bağlanabilmeleri cihaz performanslarını etkilemektedir. Spesifik bağlanma peptitlerin amino asit sekanslarına ve dolayısı ile yapılarına bağlıdır. Günümüzde, inorganik malzemelere bağlanabilen peptitler doğadan esinlenerek ve/veya deneysel kombinatorial seçim yöntemleri kullanılarak bulunmaktadır. Bu nedenlerle, inorganik malzemeler ile peptitler/proteinler arasındaki etkileşimlerin anlaşılması ve istenilen malzemeye özgü ve istenilen özelliklerde peptit/protein tasarımı teknolojik gelişim için çok önemlidir. Altın, iletken bir inorganiktir ve yüzey difikasyonuna uygundur ve peptitlerle modifiye edildiğinde biyogörüntüleme, biyosensörler, kanser tedavisi ve ilaç taşıma gibi pratik uygulamalarda kullanılabilir. Bu tez kapsamında, peptitlerin Au {111}-yüzeyi ile etkileşim mekanizmasını anlamak için atomistik modelleme yöntemleri

(NAMD) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar ile altına bağlandığı bilinen peptitlerin bağlanma mekanizmaları ortaya çıkarılmış, buna ek olarak peptitlerin amino asit dizilimleri ve Au {111}-yüzeyleri ile bağlanma yapıları ve afiniteleri optimize edilerek peptit tasarlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler dinamik, Peptit tasarımı, Konformasyonel tarama



## **ABSTRACT**

Master of Science

Analysis of Peptide - Gold (Au) {111}-Surface Interactions

Didem ÖZKAYA

TOBB University of Economics and Technology  
Materials Science and Nanotechnology Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ersin Emre ÖREN

Date: August 2022

Proteins are known to have a role in mineral nucleation, growth, and structure creation, as well as providing molecular scaffolding for the formation of soft and hard tissues such as bone and dental tissues. Today in bionanotechnology, proteins and peptides are used in various fields such as biosynthesis, biosensors, drug delivery and targeting, integrated with inorganic materials (Ag, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Pd, Pt, graphene, hydroxyapatite, etc.). Here, specific binding of peptides to materials affects device performance and this specificity is related to peptide sequences and structures. Today, these peptides are selected with inspiration from nature or combinatorial selection methods. So, a deeper understanding of interactions between inorganic materials and peptides/proteins and design of peptides with desired specificity and properties is very important for the improvement of technology. Gold is a highly conductive inorganic and amenable to surface modifications. When gold is functionalized with peptides, it has practical applications such as bioimaging, biosensors, cancer therapy and drug delivery. In this research, we use atomistic methods (NAMD) to understand how peptides interact with Au {111}-surface. In this study, the binding mechanisms of well known peptides that binds to Au {111}-surface are found out. In addition, two peptides are designed via optimization of peptide sequences, binding structures and affinities to Au {111}-surface.

**Keywords:** Molecular dynamics, Peptide design, Conformational search



## TEŞEKKÜR

Çalışma hayatım boyunca bilimsel görüşleriyle ve yönlendirmeleriyle bana çok değerli katkılarda bulunan danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Ersin Emre Ören'e, destekleri ile bu akademik yolda yanımda olan Biyonanotasarım Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım arkadaşlarım Büőra Demir'e, Çağlanaz Akın Gültaktı'ya, Rabia Kaşıkçı'ya, Őeniz Yarar'a ve Zeynep Köker'e ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim. Son olarak, yüksek lisans eğitimim boyunca sağladıkları burs imkanı için TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi'ne teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Genel Bilgiler .....	4
1.1.1 Peptitler ve özellikleri .....	4
1.1.1.1 Kombinatoryal yöntemler ile seçilmiş peptitler .....	8
1.1.2 Altın ve özellikleri.....	9
1.2 Literatür Özeti.....	10
<b>2. TEORİK MODEL VE YÖNTEM</b> .....	<b>13</b>
2.1 Çalışmanın Genel Prosedürü .....	13
2.2 Konformasyonel Tarama .....	16
2.3 Moleküler Dinamik.....	18
2.4 Kümeleme Analizleri.....	20
2.5 Peptitlerin Altına Bağlanma Enerjilerinin Hesaplanması.....	21
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>23</b>
3.1 Konformasyonel Tarama Analizleri .....	23
3.2 AuBP1, AuBP2 ve GBP Peptitlerinin MD Simülasyonları.....	26
3.3 Peptitlerin Tasarımı .....	36
3.4 Tasarlanan Peptitlerin MD Simülasyonları .....	39
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>55</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1:	Doğada peptitler/proteinler kullanılarak sentezlenen fonksiyonel malzemeler (Tamerler ve diğ., 2010'dan alınmıştır), A) magnetotaktik bakteri ( <i>Aquaspirillum magnetotacticum</i> ) ve yapılarındaki dizilmiş oktahedral kübik şekilli süperparamanyetik parçacıklar, B) Sedef ve yapısındaki dizilmiş oktahedral kübik şekilli süperparamanyetik parçacıklar, B) Sedef ve yapısındaki kalsiyum karbonat-biyomolekül hibrit yapısı, C) Memeli dişi, (E: Mine, D: Dentin, P: Pulpa, C: Sementum ve PDL: periodontal bağlar). ....	2
Şekil 1.2:	Amino Asit Yapısı .....	4
Şekil 1.3:	Yan zincirlerine göre (pPolar, polar olmayan ve elektrik yüklü) gruplandırılmış 20 temel amino asit (Campbell ve diğ., 2014). ....	5
Şekil 1.4:	Peptit bağı ve iki amino asit zincirine sahip peptit gösterimi (Campbell ve diğ., 2014). ....	6
Şekil 1.5:	Peptitlerin ikincil yapısı olan yapılarından biri olan $\alpha$ - helix'in gösterimi, ana zinciri ve yapısındaki hidrojen bağları (Gromiha, 2010). ....	6
Şekil 1.6:	Peptitlerin moleküler tanıma fonksiyonlarının bir örneği (Oren ve diğ., 2005). ....	7
Şekil 1.7:	Faj gösterimi ve Hücre Gösterimi Metotları (Sarıkaya ve diğ., 2003). ....	8
Şekil 1.8:	Altın yüzeyindeki biyofonksiyonel molekül örnekleri (Cobley ve diğ., 2011). ....	9
Şekil 2.1:	Çalışmanın genel prosedürünün şematik gösterimi. ....	14
Şekil 2.2:	Pozisyonlandırma, altın yüzeyinde peptidin başlangıç yapısının ayarlanması için eğilme açısı, $\phi$ ve döndürme açısı, $\theta$ .....	15
Şekil 2.3:	Kısa zincirli peptidin iki farklı dihedral açısı ve potansiyel enerji yüzeyi (Borrel 2016). ....	17
Şekil 3.1:	AuBP1 (WAGAKRLVLRRE) başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü. ....	24
Şekil 3.2:	(a) AuBP2 (WALRRSIRRQSY) başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü. ....	25
Şekil 3.3:	GBP (MHGKTQATSGTIQS) başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü .....	25
Şekil 3.4:	(a) AuBP1, (b) AuBP2 ve (c) GBP için RMSD grafikleri. ....	26
Şekil 3.5:	AuBP1 (WAGAKRLVLRRE) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir. ....	29
Şekil 3.6:	AuBP2 (WALRRSIRRQSY) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir. ....	30

Şekil 3.7:	GBP (MHGKTQATSGTIQS) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir.....	30
Şekil 3.8:	GBP (MHGKTQATSGTIQS) için en yoğun ikinci kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının simülasyondaki zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir.....	31
Şekil 3.9:	GBP (MHGKTQATSGTIQS)'nin (a) başlangıç yapısı, (b) en yoğun kümenin temsilci yapısı, (c) en yoğun ikinci kümenin temsilci yapısı ve (d) yapıların simülasyondaki zamansal konumları.....	32
Şekil 3.10:	AuBP1 (toplam atom sayısı: 217) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi. ....	32
Şekil 3.11:	AuBP2 (toplam atom sayısı: 231) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi. ....	33
Şekil 3.12:	GBP (toplam atom sayısı: 200) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi. ....	33
Şekil 3.13:	AuBP1'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å). ....	34
Şekil 3.14:	AuBP2'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å). ....	34
Şekil 3.15:	GBP'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å). ....	35
Şekil 3.16:	Prolin (P) , alanin (A), treonin (T), lösin (L) amino asitlerinin başlangıç yapıları. ....	37
Şekil 3.17:	Tasarım basamakları ve her bir basamak için en iyi bağlanan sekanslar. ....	38
Şekil 3.18:	(a) PFTQSTV başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü.....	40
Şekil 3.19:	PFTQSDI başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü. ....	40
Şekil 3.20:	Tas-1 (PFTQSTV) ve Tas-2 (PFTQSDI) peptitlerinin RMSD değerleri. ....	41
Şekil 3.21:	Tas-1 (PFTQSTV) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) üstten görünümü (b) önden görünümü (c) sağdan görünümü (d) simülasyondaki yeri. ....	44
Şekil 3.22:	Tas-2 (PFTQSDI) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) üstten görünümü (b) önden görünümü (c) sağdan görünümü (d) simülasyondaki yeri. ....	44
Şekil 3.23:	Tas-1 (toplam atom sayısı: 109) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi. ....	45
Şekil 3.24:	Tas-2 (toplam atom sayısı: 110) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi. ....	45
Şekil 3.25:	Tas-1'in yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å). ....	46
Şekil 3.26:	Tas-2'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å). ....	46

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 3.1: Peptitlerin amino asit dizilimleri ve yapılan MD simülasyonlarının süreleri. ....	23
Çizelge 3.2: AuBP1'in kümeleme analiz sonuçları .....	27
Çizelge 3.3: AuBP2'nin kümeleme analiz sonuçları. ....	28
Çizelge 3.4: GBP'nin kümeleme analiz sonuçları. ....	28
Çizelge 3.5: Peptitlerin amino asit dizilimleri ve yapılan MD simülasyonlarının süreleri. ....	35
Çizelge 3.6: 20 temel amino asitin Au {111}-yüzeyine bağlanma enerjileri. ....	36
Çizelge 3.7: 7 amino asit uzunluğundaki peptitlerin bağlanma enerjileri.....	39
Çizelge 3.8: Tasarlanan peptitler ve moleküler dinamik süreleri. ....	39
Çizelge 3.9: Tas-1'in kümeleme analizi sonuçları.....	42
Çizelge 3.10: Tas-2'nin kümeleme analizi sonuçları.....	43

## KISALTMALAR

<b>AuBP1</b>	: Altına bağlanan peptit-1
<b>AuBP2</b>	: Altına bağlanan peptit-2
<b>A</b>	: Alanin
<b>Au</b>	: Altın
<b>C</b>	: Sistein
<b>D</b>	: Aspartic asit
<b>E</b>	: Glutamik asit
<b>F</b>	: Fenilalanin
<b>G</b>	: Glisin
<b>GBP</b>	: Altına bağlanan peptit (Gold binding peptide)
<b>H</b>	: Histidin
<b>I</b>	: İzolösin
<b>K</b>	: Lizin
<b>L</b>	: Lösin
<b>M</b>	: Metiyonin
<b>MD</b>	: Moleküler dinamik
<b>MM</b>	: Moleküler mekanik
<b>N</b>	: Asparjin
<b>NAMD</b>	: Nanoscale molecular dynamics
<b>P</b>	: Prolin
<b>Q</b>	: Glutamin
<b>QCM</b>	: Kuvars kristal mikroterazi (Quartz crystal microbalance)
<b>R</b>	: Arjinin
<b>RMSD</b>	: Kök ortalama kare sapması (Root mean square deviation)
<b>S</b>	: Serin
<b>SPR</b>	: Yüzey plazmon rezonans (Surface plasmon resonance)
<b>T</b>	: Treonin
<b>Tas-1</b>	: Tasarlanan peptit 1
<b>Tas-2</b>	: Tasarlanan peptit 2
<b>V</b>	: Valin
<b>VMD</b>	: Visual molecular dynamics
<b>Y</b>	: Tirozin
<b>W</b>	: Triptofan



## SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$E$	Enerji
$\phi$	Eğme açısı
$\theta$	Döndürme açısı
$h$	Peptit merkezinin Au {111}-yüzeyinden uzaklığı
$K_n$	Dihedral kuvvet sabiti
$\varphi$	Dihedral açısı
$R$	Atomlar arası denge uzaklığı
$q$	Atomların elektriksel yükü
$t$	Zaman
$N$	Atom sayısı
$r$	Atomlar arası uzaklık
$a$	İvme
$v$	Hız
$V$	Potansiyel

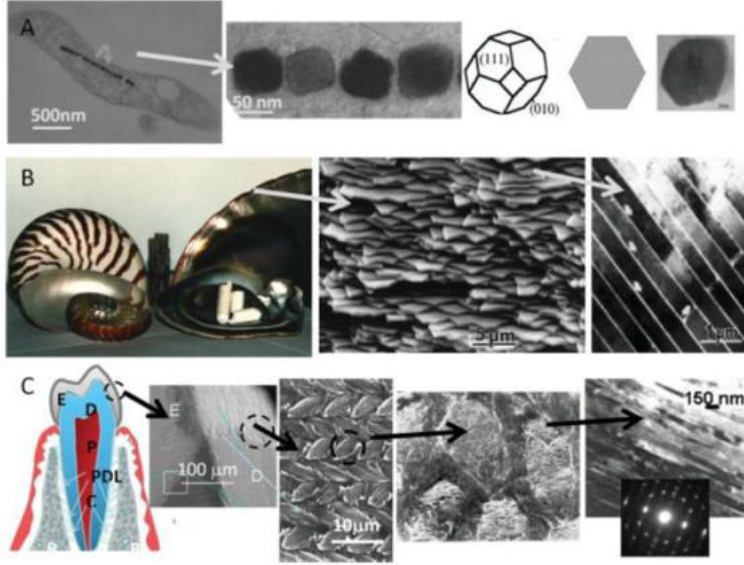




## 1. GİRİŞ

Doğada yaşam biyolojik moleküllerin aralarındaki etkileşimlere bağlıdır. Biyolojik moleküller kendilerine özgü ve karmaşık yapılarıyla moleküler tanıma ve kendiliğinden kurulum (self-assembly) gibi özelliklere sahiptirler (Branden ve Tooze 1999). Amin ve karboksil gruplarına sahip amino asitler biyolojik sistemlerin yapısal ve işlevsel fonksiyonlarında görev alan küçük kimyasal moleküllerdir. Bu moleküller birbirlerine peptit bağı ile kovalent olarak art arda dizilerek polimerik yapılar oluşturur (Branden ve Tooze 1999). Bu biyolojik yapılar dizilimlerindeki amino asit sayısına göre peptit veya protein olarak adlandırılır. Peptitler amino asitlerin zincir halinde dizilmesiyle oluşan biyomoleküllerdir ve genellikle zincirlerindeki amino asit sayısı 2 ile 50 arasında değişmektedir.

Doğada, diş, kemik, tırnak gibi sert dokuların oluşumunda (biyomineralizasyon) peptit ve proteinlerin görev aldığı bilinmektedir (Tamerler ve diğ., 2010). Şekil 1’de doğada bulunan biyomineralizasyon sonucu oluşmuş malzemelere örnekler gösterilmiştir (Tamerler ve diğ., 2010). Şekil 1.1.a’da, magnetotaktik bakteri ve yapısındaki magnetozomların (manyetit nanoparçacıkları) yapısı görülmektedir. Yapıdaki protein sayesinde oluşan magnetozomların bu düzenli dizilimi magnetotaktik bakterilerin yollarını bulmalarında doğal bir pusula görevi görür. Şekil 1.1.b’de protein ve kalsiyum karbonattan oluşan deniz kabuğu gösterilmiştir. Bu yapı mekanik anlamda güçlü bir biyokompozittir. Şekil 1.1.c’de ise vücuttaki en sert doku olan memeli dişi ve katmanları gösterilmiştir. Diş yapısında bulunan katmanlar içindeki hidroksiapatit kristalleri, proteinlerin kontrolü sayesinde düzgün bir form alırlar. Bu yapılaşma ile kuvvete karşı dirençli bir sert doku oluşur.



Şekil 1.1: Doğada peptitler/proteinler kullanılarak sentezlenen fonksiyonel malzemeler (Tamerler ve diğ., 2010'dan alınmıştır), A) magnetotaktik bakteri (*Aquaspirillum magnetotacticum*) ve yapılarındaki dizilmiş oktahedral kübik şekilli süperparamanyetik parçacıklar, B) Sedef ve yapısındaki kalsiyum karbonat-biyomolekül hibrit yapısı, C) Memeli dişi, (E: Mine, D: Dentin, P: Pulpa, C: Sementum ve PDL: periodontal bağlar.

Biyomimetik, moleküler ölçekte biyolojik yollar kullanarak malzeme ve sistemlerin işlevini, sentezini veya yapısını taklit etmek olarak tanımlanabilir (Sarıkaya M., ve diğ., 2007) Biyomimetik moleküler biyolojinin ve nanoteknolojinin kullanılmasıyla yeni hibrit teknolojilerinin geliştirildiği önemli bir alandır. Biyomimetik yaklaşımı ile peptitlerin doğadaki moleküler fonksiyonlarından ilham alınarak biyonanoteknolojide birçok mühendislik ürününün geliştirildiği gösterilmiştir (Ball 2001). Örneğin, Ma ve diğerleri çalışmalarında hayvan derisinden esinlenerek sensörlerde kullanılabilecek esnek ve sert bir malzeme tasarlamışlardır. Hayvan derisi sert bir protein olan kollajen liflerinden ve esnek mikrofibril ağlarından oluşan doğal bir biyokompozittir (Ma ve diğ., 2013).

Peptitler biyolojik sistemlerde moleküler tanıma fonksiyonları ile inorganiklerin çekirdeklenmesinde, büyütülmesinde ve organizasyonunda görev alırlar (Mann 1988). Bu biyolojik olaylarda peptitlerin işlevlerinin daha yakından anlaşılmasıyla yeni hibrit malzemeler geliştirilebilir ve aynı zamanda peptitlerin bu fonksiyonları inorganiklere de uygulanabilir. Bu uygulama terimsel olarak biyonanokombinatorik yaklaşım olarak adlandırılır (Tang ve diğ., 2013). Biyonanoteknolojide biyonanokombinatorik yaklaşımın uygulamalarının geliştirilmesi için peptitlerle inorganikler arasındaki

etkileşimin moleküler düzeyde anlaşılması gerekmektedir. Peptitlerin inorganiklerle aralarındaki etkileşimler zayıf ve kovalent olmayan etkileşim aracılığıyla oluşurlar. Bu etkileşimlere hidrofobik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler örnek olarak verilebilir.

İnorganik malzemelerin yüzeylerine spesifik (seçici ve iyi) olarak bağlanabilen biyomoleküllerin elde edilmesi için deneysel olarak hücre gösterimi ve faj gösterimi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile yapılan deneysel çalışmalar sonucu inorganik metal (altın, platin, gümüş, vb.), oksit (silika, kalsit, bakır oksit, vb.) ve yarıiletken (galyum arsenit, çinko sülfat, vb.) yüzeylere bağlanan peptitler bulunmuştur (Brown 1997; Naik ve diğ., 2002; Thai ve diğ., 2004; Gaskin 2000; Whaley 2000; Lee 2002). Ancak peptitlerin bahsedilen malzemelere gösterdiği bağlanma afinitesinin nedenleri ve etkileşim mekanizması hakkında henüz yeterli bilgi elde edilememiştir. Bu sebeple peptitler ile inorganik yüzeyler arasındaki etkileşimlerin anlaşılması daha üstün özelliklere sahip peptitlerin tasarlanması için çok önemlidir.

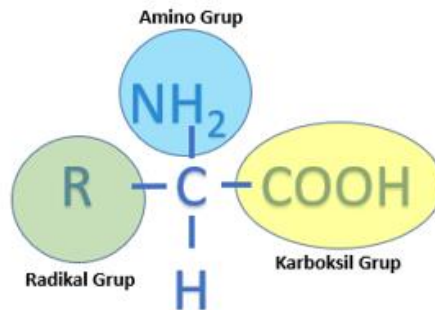
Moleküler yapı bloklarının oluşturulması, nanoyapıların organizasyonu, fonksiyonel malzemelerin kurulumu gibi birçok önemli konu peptitlerin inorganiklerle etkileşimlerinin incelenmesi ve anlaşılması ile geliştirilebilir ve elde edilen bilgi birikimiyle amaca uygun peptitlerin tasarlanması mümkün olacaktır (Sarıkaya ve diğ., 2004). Peptitlerin inorganik yüzeyine bağlanma mekanizmalarının anlaşılmasının biyosensör ve biyomalzeme uygulamalarına da katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Zhang ve diğ., 2017; Soh 2003; Park ve diğ., 2006). Bu davranışın anlaşılmasına yönelik birçok deneysel ve teorik çalışma mevcuttur. Tamerler ve diğerleri geniş pH aralığında altına iyi bağlandığı bilinen bir peptitin altın üzerinde kararlı halde olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada SPR (Yüzey Plazmon Rezonansı, Surface Plasmon Resonance) ve QCM (Kuars Kristal Mikroterazi, Quartz Crystal Microbalance) metotlarıyla peptitin altına bağlanma kinetiğini araştırmışlardır ve bu peptitin altına iyi bağlandığı bilinen tiyollerden daha iyi bağlandığını bulmuşlardır (Tamerler ve diğ., 2006). Tamerler ve arkadaşları başka bir çalışmalarında altına bağlandığı iyi bilinen peptitin seçici olarak platin varlığında da altına bağlandığını göstermişlerdir (Tamerler ve diğ., 2006). Hnilova ve arkadaşları altına iyi bağlandığı bilinen peptitlerin konformasyonlarının bağlanma mekanizması üzerine etkili olduğunu göstermişlerdir (Hnilova ve diğ., 2008). Bütün bu çalışmalara rağmen

peptitlerin inorganiklere bağlanma mekanizmaları moleküler düzeyde tam olarak anlaşılammıştır. Bu tez çalışmasının amacı peptitlerle altın arasındaki bağlanma mekanizmasını anlamak ve istenilen özelliklere sahip ve altın yüzeyi ile daha iyi etkileşim kuran peptitleri tasarlamaktır. Tez kapsamında HyperChem programı (2003) ve NAMD (Phillips ve diğ., 2005) programı kullanılarak istenilen özelliklerde peptitlerin tasarlanabilmesi için modelleme yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile farklı peptitler tasarlanmış ve moleküler dinamik (MD) simülasyonları, NAMD (Phillips ve diğ., 2005) programı ile yapılarak tasarlanan peptitlerin altın (Au) ile etkileşimleri incelenmiştir. Tez kapsamında bağlanma mekanizmasının anlaşılması adına adımlar atılmış, geliştirilen yöntem ile istenilen özellikte peptitlerin tasarlanabilmesi için neler yapılabileceği gösterilmiştir. Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar ile istenilen özelliklerde peptit tasarımının hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmesi için bir yöntem sunulmuştur ve bu yöntemin yeni biyomoleküler teknolojilerinin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

## 1.1 Genel Bilgiler

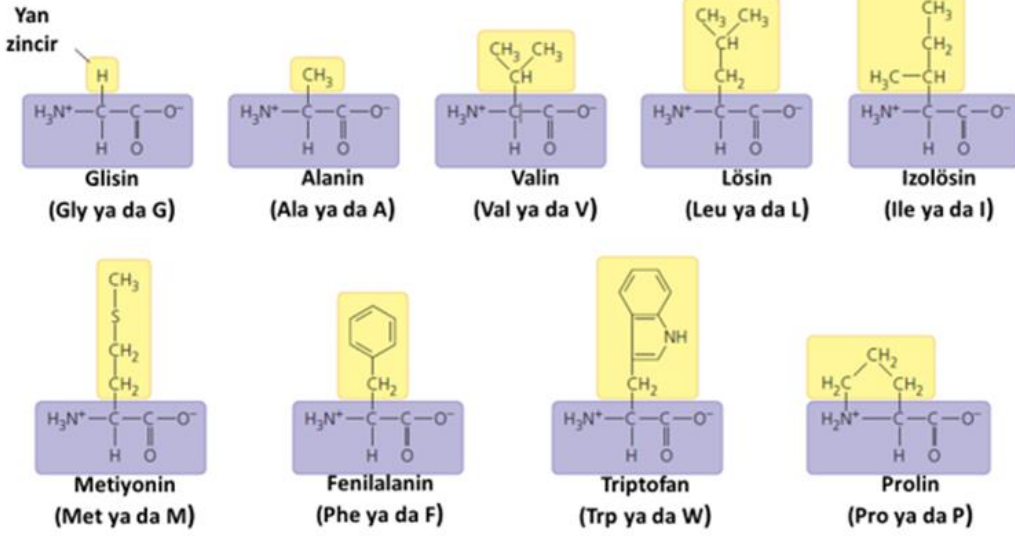
### 1.1.1 Peptitler ve özellikleri

Peptitler amino asitlerin kısa zincirli halde bir araya gelmeleriyle oluşan biyomoleküllerdir. Doğada 20 temel amino asit mevcuttur ve her birinin kendisine has yapısı ve fonksiyonu vardır. Her bir amino asidin sahip olduğu karboksil grubu, amino grubu ve yan zinciri vardır (Şekil 1.2). Şekil 1.3'te 20 amino asidin radikal grubu özelliklerine göre gruplandırılmış şekilleri verilmiştir.

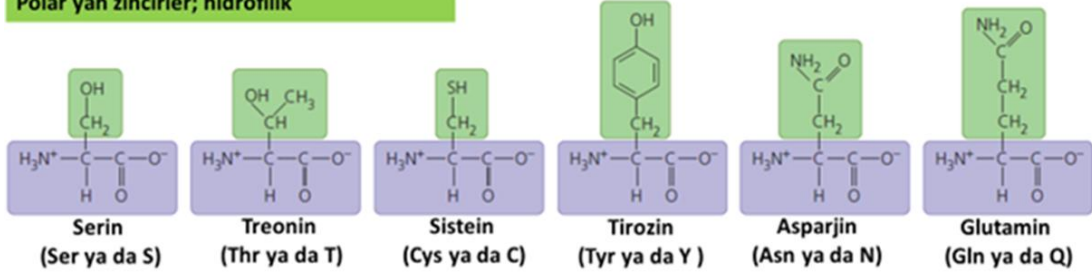


Şekil 1.2: Amino Asit Yapısı.

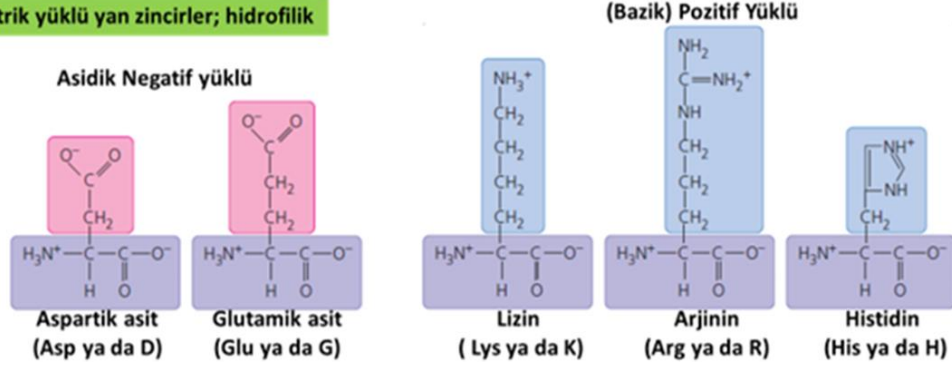
**Polar olmayan yan zincirler; hidrofobik**



**Polar yan zincirler; hidrofilik**

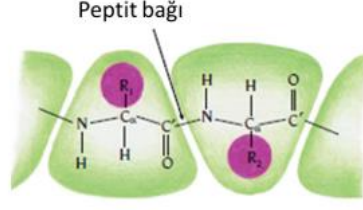


**Elektrik yüklü yan zincirler; hidrofilik**



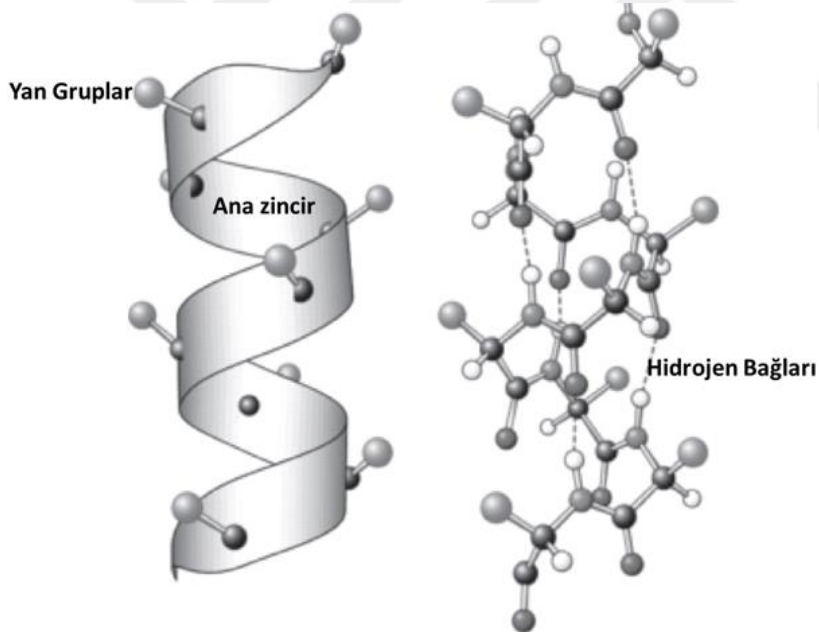
Şekil 1.3: Yan zincirlerine göre (polar, polar olmayan ve elektrik yüklü) gruplandırılmış 20 temel amino asit (Reece ve diğ., 2015).

Amino asitlerin farklı kombinasyonlarda dizilmesi ile peptitler oluşur ve oluşan peptitler farklı yapı ve dizilime sahip olabilirler. Şekil 1.4'te iki amino asidin aralarında peptit bağı oluşturarak bir araya gelmelerinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.4: Peptit bağı ve iki amino asit zincirine sahip peptit gösterimi (Reece ve diğ., 2015).

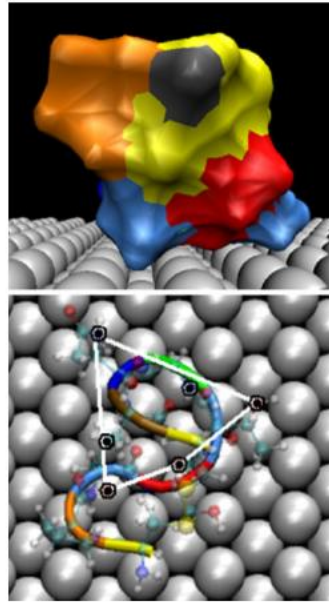
Peptitler içerisinde bulundurduğu amino asitlerin peptit zincirinde düzenli ve yinelenen şekilde dizilimleri ile ikincil yapılar sahiplerdir. Bu ikincil yapılar örnek olarak  $\alpha$ -helis ve  $\beta$ -yaprak yapıları verilebilir.  $\alpha$ -helis yapısı peptitin ana zincirinde yer alan amino asitlerin arasındaki hidrojen bağları ile oluşur. Şekil 1.4'te  $\alpha$ -helis yapısının gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.5: Peptitlerin ikincil yapılarından birisi olan  $\alpha$ -helis'in gösterimi, ana zinciri ve yapısındaki hidrojen bağları (Gromiha, 2010).

Peptitler sahip olduğu amino asit sekansına bağlı olarak moleküler tanıma ve kendiliğinden kurulum özelliklerini gösterirler (Sarıkaya ve diğ., 2003, Zhang, 2003). Peptitler bu fonksiyonları sayesinde biyonanoteknolojide kullanılırlar.

Kendiliğinden kurulum özelliği moleküllerin dışardan bir kuvvet uygulanmadan gösterdiği moleküler organizasyon özelliğidir. Hücredeki belirli özel proteinlerin oluşturulması, antijen tanınması, hücre duvarının kendiliğinden kurulumu birçok biyolojik önemli olay moleküler kendiliğinden kurulum sayesinde olur (Subramani ve diğ., 2008). Peptitlerdeki moleküller arası kovalent olmayan bağlar; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri kendiliğinden kurulum özelliğini desteklerler (Zhang 2003). Bu bağlar ve etkileşimler peptitlerin diğer moleküllerle aralarındaki ilişkide etkilidirler. Bir başka molekül bir peptitle etkileşimde bulunduğu anda bütün bu kuvvetlerin etkisiyle beraber peptitlerin fonksiyonu değişebilir. Bunun sebebi biyomoleküllerin kendiliğinden kurulumları ve diğer moleküllerle etkileşimlerinin onların yapısal mimarisini ve dolayısıyla fonksiyonlarını değiştirmeleridir (Branden ve Tooze 1999).



SD152 CPTSTGQAC

Şekil 1.6: Peptitlerin moleküler tanıma fonksiyonlarının bir örneği (Oren ve diğ., 2005).

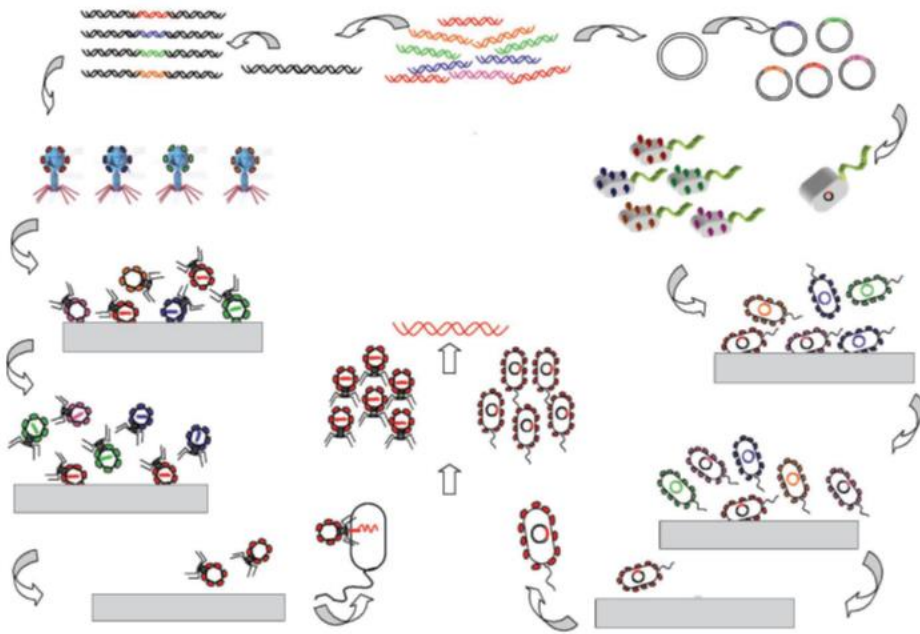
Peptitlerin kendiliğinden kurulum özelliklerinin yanında moleküler tanıma özellikleri de vardır. Moleküler tanıma özelliği biyomoleküllerin başka moleküller ile biyokimyasal ve geometrik olarak eşleşmeleri durumudur (Castner ve Ratner 2002). Moleküler tanıma özelliğine örnek olarak hücredeki kısa peptitlerin hücre reseptörünü tanıyarak ona bağlanması verilebilir. Moleküler tanıma fonksiyonları peptitlerin

malzemeye özgü olarak yüksek afinitede bağlanmalarını sağlar. Peptitlerin malzemeye özgü moleküler tanıma fonksiyonlarının doğal mekanizmalarının bilgisi eksiktir. Buna dair nicel bir araştırma olarak Oren ve diğerleri genetik olarak mühendisliği yapılmış peptitlerin polipodlar halinde yüzey ile eşleştiklerini göstermişlerdir (Şekil 1.6) (Oren ve diğ., 2005).

### 1.1.1.1 Kombinatoriyal yöntemler ile seçilmiş peptitler

Doğada inorganiklerin ve minerallerin çekirdeklenmesini sağlayan proteinlerin dışında istenilen inorganığe seçici olarak bağlanabilecek peptitler biyokombinatoriyal yollarla (hücre gösterimi ve faj gösterimi) seçilmektedir. Bu seçilen peptitlere genetik olarak mühendisliği yapılmış peptitler denilmektedir (Tamerler ve Sarıkaya 2009).

Hücre gösterimi ve faj gösterimi metotları inorganik yüzeylere özgü afiniteye sahip olan peptitleri seçmek için kullanılan deneysel metotlardır (Wittrup, 2001; Hoess, 2001) Şekil 1.7’de çalışma prensipleri gösterilmiştir.



Şekil 1.7: Faj gösterimi ve Hücre Gösterimi Metotları (Sarıkaya ve diğ., 2003).

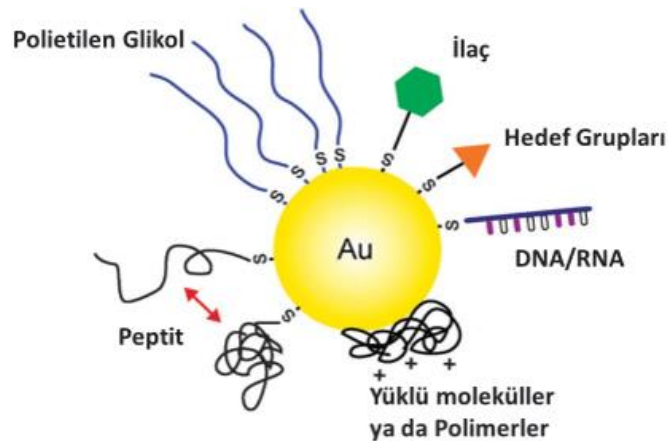
Faj gösterimi metodunda ve hücre gösterimi metodunda sırasıyla virüsler ve bakteriler kullanılmaktadır. Peptit kütüphanelerinden alınan peptitler istenilen yüzeye temas ettirilir. Yüzeye özel afinitesi olan peptitler yüzeye bağlanırlar. Bağlanmayan ya da zayıf bağlanan peptitler ise yüzeyin yıkanmasıyla elenir. Geriye kalan yüzeye kuvvetli



bağlanan peptitler seçilmiş olur. Bu sayede metallere, yarıiletkenlere ve oksit malzemelere bağlandığı tespit edilen peptitler moleküler yapı blokları olarak kullanılabilir (Seeman ve Belcher 2002).

### 1.1.2 Altın ve özellikleri

Altının biyoteknolojide önemli bir yeri vardır. Bunun sebebi olarak nano boyutta şeklinin kolayca kontrol edilebilmesi, yüzey plazmon rezonans özelliği ve yüksek derecede iletken olması verilebilir (Cobley ve diğ., 2011). Kendiliğinden kurulmuş yüzeyler (Self Assembled Monolayers) için altın yaygın olarak kullanılan standart bir inorganiktir (Love diğ., 2005). Altın nanoparçacıklar sahip oldukları optik özellikler ile biyogörüntüleme ve sensör uygulamalarında geniş kullanım alanlarına sahiptir (Boyer 2001). Aynı zamanda altın nanoparçacıkların yüzey kimyası fonksiyonelleşmeye elverişlidir ve biyouyumludur (Niemeyer, 2001). Biyofonksiyonel moleküllerle (peptitler, nükleik asitler, polimerler, ilaçlar) etkileştirildiklerinde konjuge yapılar oluştururlar ve biyolojik uygulamalarda kullanılırlar (Şekil 1.8). Örneğin Choi ve diğ. fosfat enzimlerinin tespiti için peptitlerle konjuge edildiğinde kendi aralarında çöken ve çöktüklerinde mavi renk veren altın nanoparçacıklar kullanmışlardır. Fosfat peptit-altın nanoparçacık sistemiyle temas ettiğinde çöken altın nanoparçacıkların rengi kırmızıya döner (Choi ve diğ., 2007).



Şekil 1.8: Altın yüzeyindeki biyofonksiyonel molekül örnekleri (Cobley ve diğ., 2011).

## 1.2 Literatür Özeti

1985 yılında ilk defa farklı hedef grupları için ligand seçimi konusunda faz gösterimi metodu kullanılmıştır (Smith, 1985). Daha sonrasında faz gösterimi ve hücre gösterimi metotları farklı inorganiklere bağlanan yüksek afiniteli peptitlerin seçilmeleri için önemli deneysel araçlara dönüşmüştür (Whaley ve diğ., 2000). İnorganiklere bağlanan peptitler genetik olarak mühendisliği yapılmış peptitler olarak adlandırılmaktadır (Sarıkaya ve diğ., 2003). Faz gösterimi ve hücre gösterimi ile seçilen peptitler farklı fonksiyonlara sahip hibrit malzemelerin de üretilmesini sağlamıştır (Naik ve diğ., 2002; Naik ve diğ., 2004). Aynı zamanda genetik olarak mühendisliği yapılmış peptitler; biyomineral üretimi, inorganik parçacık sentezi ve nanoparçacıkların yüzey üzerinde immobilizasyonu (sabitlenmesi) gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (Sloacik ve diğ., 2005; Umetsu ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2010; Nam ve diğ., 2010).

Genetik olarak mühendisliği yapılmış peptitlerle ilgili yapılan ilk çalışmalardan birinde Stanley Brown altına bağlanan peptitler üzerine çalışmıştır (Brown, 1997). Brown bu çalışmasında hücre gösterimi metodunu kullanarak literatürde GBP (Altına Bağlanan Peptit, Gold Binding Peptide) olarak adlandırılan ve literatürde üzerine birçok çalışma yapılan peptiti bulmuştur (Park ve diğ., 2009; Nochomovitz ve diğ., 2010). Sonuç olarak altın için yüksek afinitesi olan GBP'nin diğer peptitlerden farklı olarak yüksek tuz konsantrasyonlarında bile altına bağlandığını göstermiştir (Brown, 1997). Literatürde sistein (C) amino asidinin yapısındaki tiyollerin metallere güçlü şekilde bağlandığı ve dolayısıyla altına da kovalent bağ ile bağlandığı bilinmektedir (Porter ve diğ., 1987; Brown 2000). GBP, sistein amino asidini içermemesine rağmen altına yüksek afiniteyle bağlanmaktadır. Bunun sebebi GBP'nin içerdiği treonin (T) ve serin (S) amino asitlerinin yapılarındaki polar yan zincirlerin bağlanmaya katkısıdır (Braun 2002). Peptitlerin içerdiği amino asit kompozisyonları, bu kompozisyonların oluşturduğu iki ve üç boyuttaki farklı mimari yapıları inorganiklere bağlanma afinitelerini etkiler (Evans ve diğ., 2008). Bundan dolayı peptitlerin sekanslarına ve yapılarına bağlı olarak değişiklik gösteren etkileşim fonksiyonlarının anlaşılması peptit tasarımı için önemli bir adımdır.

İnorganiklere bağlanan peptitlerin elde edilme yöntemleri faz gösterimi ve hücre gösterimi ile sınırlı değildir. Eczacılıkta ilaçların elde edilmesini sağlayan teorik moleküler yaklaşım ile de tasarlanabilirler (Schneider ve Wrede 1998). Ancak bu

yöntem zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir (Sarıkaya ve diğ., 2003). Dokuda biyomineralleştirme görevine sahip olan peptitlerin biyolojik sert dokulardan alınarak izolasyonu, saflaştırılması ve klonlanması da başka bir peptit tasarım yöntemidir (Cariolou ve Morse 1988). Ancak sert doku yapısındaki peptitlerin birden fazla olması ve kompleks yapıya sahip olmaları yöntemin uygulanabilirliğini azaltır (Sarıkaya ve diğ., 2003). Bu sebeplerden dolayı literatürde genellikle peptitler faz gösterimi ve hücre gösterimi metotları ile seçilmektedir. Ancak bu metotlarda altaşa iyi bağlanan peptitlerin bağlanmayan peptitlerden ayırma işlemi sistemin kalitesini düşürür. Bunun sebebi altaş malzemesinin yıkama prosedürü sırasında oksitlenme riskinin artmasıdır. Bu durum peptitlerin yüzeye bağlanma afinitelerini değiştirir (Evans ve diğ., 2008). Aynı zamanda kombinatorial metotlar kullanılarak peptitlerin substrata bağlanmasının mekanizmasının ve peptitlerin inorganığe karşı gösterdiği moleküler tanıma özelliğinin işleyiş bilgisinin tamamına erişmek mümkün olmamaktadır.

Ören ve diğ.leri kombinatorial metotlarla belirli bir inorganığe bağlandığı bilinen peptitleri zayıf, orta ve yüksek afiniteyle bağlanan peptitler olarak sınıflandırmışlardır. Bu işlemi biyolojide sekans dizme tekniğini kullanarak ve üretilen puanlama matrisleri ile yapmışlardır. Üretilen matrisler ile inorganığe bağlanan peptitlerin sekanslarına benzer sekanslar tasarlamışlardır. Bu benzer sekanslar SPR ile karakterize edilmiştir ve tasarlanan peptitlerin inorganığe yüksek afiniteye bağlandıkları tespit edilmiştir (Ören ve diğ., 2007).

DeneySEL metotların yanı sıra moleküler dinamik simülasyonları da peptitlerin inorganikler ile etkileşimlerinin belirlenmesi için kullanılan hesaplamalı araçlardır. Verde ve diğ.leri moleküler dinamik simülasyon yardımıyla amino asitlerin esnekliklerinin ve peptitlerin mobilitelerinin altın yüzeyindeki adsorplanma davranışına etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak peptitlerin adsorpsiyonlarının, onların konfigürasyonlarındaki değişimlerine ve içerdikleri amino asitlerin esnekliklerine bağlı olduğunu bulmuşlardır (Verde, 2009).

Şu ana kadar deneySEL metotlar ve moleküler simülasyonlar ile yapılan çalışmalarla peptitlerin inorganiklere bağlanması ile ilgili belirli bilgiler elde edilmiştir. Bunlardan ilki genellikle farklı sekanslara sahip olan peptitlerin aynı altaşa farklı bağlanma afiniteleri göstermeleridir (Whaley ve diğ., 2000; Sarıkaya ve diğ., 2003). Diğ. bir bilgi ise bağlanma konusunda peptitlerin amino asit dizilim sırasının sahip olduğu amino asit kompozisyonundan daha önemli olmasıdır (Ören ve diğ., 2007).

Peptitlerin farklı moleküler konformasyonları ve yapıları bağlanmada etkilidir (Hnilova ve diğ., 2008). Hnilova ve diğ.leri yaptıkları çalışmada altına bağlandığı bilinen, AuBP1 (WAGAKRLVLRRE) ve AuBP2 (WALRRSIRRQSY) olarak isimlendirilen peptitlerin doğrusal ve halkasal yapılarındaki bağlanma kinetiklerini hesaplamışlardır. Sonuç olarak değişen peptit konformasyonu ile bağlanma afiniteleri arasında bir ilişki açığa çıkarmışlardır. (Hnilova ve diğ., 2008). Aynı zamanda floresans mikroskobu kullanarak amino asit kompozisyonu ile bağlanma afinitesi arasındaki ilişkiye baktıklarında altına kuvvetli bağlanan peptitlerde arjinin (R), sistein (C), triptofan (W) ve tirozin (Y) amino asit kompozisyonlarının fazla olduğunu bulmuşlardır.

Vera ve diğ.leri yaptıkları deneysel ve teorik çalışmalarla CLPFFD peptitinin altın nanoparçacığına bağlanmasında fenilalanin (F) aromatik halkasının etkili olduğunu göstermişlerdir. Moleküler mekanik metodunun ardından Raman Spektroskopisi ile yapılan deneysel çalışmalarını teorik bir metot olan genişletilmiş-Hückel ile doğrulamışlardır (Vera ve diğ., 2015).

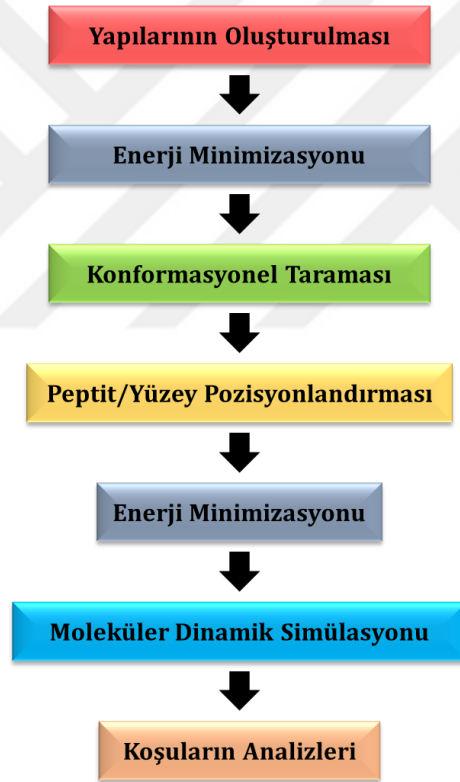
## 2. TEORİK MODEL VE YÖNTEM

Moleküler modelleme metodu, genel olarak moleküllerin geometrilerini (şekillerini, bağ uzunlukların, bağ ve dihedral açılarını), enerjilerini ve geçiş durumlarını, kimyasal aktifliklerini hesaplayan yöntemdir (Lewars 2011). Günümüzde moleküler dinamik simülasyonları; hesaplamalar sonucu moleküllerin konformasyonlarının, farklı molekül veya malzemeler üzerine adsorpsiyon davranışlarının, bu davranışların termodinamik ve kinetik özelliklerinin analiz edilmesini sağlar. Moleküler dinamik simülasyonları peptit/protein gibi biyomoleküllerin yapılarını ve fonksiyonlarını anlamak için sıkça kullanılan bir araçtır. Tez kapsamında minimizasyon ve moleküler dinamik simülasyonları kullanılarak literatürde altına iyi bağlandığı bilinen peptitlerin ve tasarlanan peptitlerin altın yüzeyine adsorpsiyon davranışları incelenmiştir.

### 2.1 Çalışmanın Genel Prosedürü

Matematiksel olarak  $n$  adet amino asitten oluşan bir peptiti tasarlamak için  $20^n$  olasılık vardır. Yani, 7 amino asite sahip bir peptit için 1 milyar 280 milyon farklı olası dizilim vardır. Yedi amino aside sahip bir peptidin altın yüzeyi üzerinde 1 ns moleküler dinamik simülasyonun yapılması 32 GB Ram ve 12 çekirdekli bir işlemciye sahip iş istasyonlarında yaklaşık 10 saat sürmektedir. Yedi amino asidin bir araya gelerek oluşturacağı 1 milyar 280 milyon farklı peptit zincirinin altın yüzeyine adsorpsiyonunun incelenmesi için ortalama 50 ns süreye sahip moleküler dinamik simülasyonları yapılması fazla vakit alacağından bu tezde toplam olasılık sayısını pratik olarak azaltmak için bir metot geliştirilmiştir. Öncelikle 20 adet amino asidin HyperCHEM (2003) programı ile bir sonraki bölümde detaylıca bahsedilecek olan konformasyonel taramaları yapılmıştır. Ardından amino asitlerin su varlığında altın yüzeyi ile etkileşime giremeyecek kadar uzakta ve altın yüzeyinde olmak üzere NAMD (Phillips ve diğ., 2005) programı ile enerji/geometri minimizasyonları yapılmıştır. Bağlanma ve bağlanmama durumlarında sistemin hesaplanan enerjileri kullanılarak 20 farklı amino asidin altın yüzeyine bağlanma enerjileri hesaplanmıştır ve bağlanma enerjileri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda altına

en iyi bağlanan, en düşük bağlanma enerjisine sahip olan iki amino asit seçilmiştir. Seçilen iki amino aside 20 amino asit daha eklenmiştir ve toplam 40 adet 2 amino asit uzunluğunda peptit oluşturulmuştur. Oluşturulan 2 sekansa sahip peptitler için de konformasyonel tarama ve enerji minimizasyonu yapılmıştır ve bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Bağlanma enerjileri karşılaştırıldıktan sonra peptit moleküllerinden altına bağlanma enerjisi en düşük olan iki peptit seçilmiştir. Bu iki peptite 20 amino asit bağlama işlemi, konformasyonel tarama ve minimizasyonu adımları uygulanmıştır. Oluşturulan moleküle 20 amino asit ekleme işlemi, konformasyonel tarama ve minimizasyonu işlemleri 7 amino asit içeren peptit sekansı oluşana kadar devam etmiştir. Şekil 2.1’de çalışmanın genel prosedürünün şematik gösterimi ve iş akışı verilmiştir.

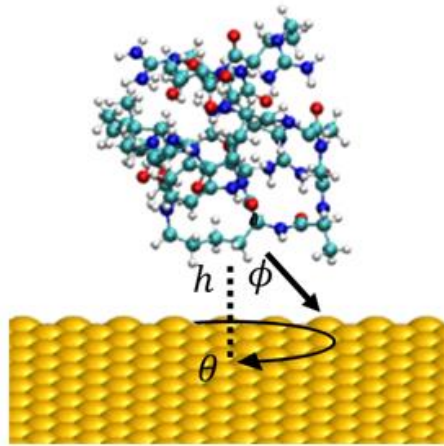


Şekil 2.1: Çalışmanın genel prosedürünün şematik gösterimi.

HyperChem programı kullanılarak peptitlerin üç boyutlu başlangıç yapıları oluşturulmuştur. Her bir peptitin enerjisi enerji minimizasyonu ile minimize edilmiştir. Enerjisi minimize edilen peptitin konformasyonel taraması yapılmıştır. Ardından su varlığında NAMD programında altın yüzeyinde pozisyonlandırılarak ve altınla etkileşime geçmeyecek kadar ( $20 \text{ \AA}$ ) uzak olmak üzere iki farklı sistem oluşturularak

sistemlerin enerjileri minimize edilmiştir. Pozisyonlandırma aşamasında peptit, altın-peptit sisteminin dikey ekseninde altına uzaklığı sabit ve 5 Å olacak şekilde konumlandırılmıştır. Ardından peptit, dikey eksenle arasında 60° olacak şekilde döndürülmüştür. Peptitin dikey eksenle arasındaki açı ( $\phi$ ) 60° olduğu durumda yatay eksenle yaptığı açı ( $\theta$ ) 0°'den 300°'ye kadar 60°'lik açılarla arttırılmıştır. Yatay eksenle döndürme işlemi bittikten sonra dikey eksenle arasında 60° olacak kadar döndürülerek tekrardan yatay eksenle döndürme işlemi yapılmıştır. Peptit konformasyonu dikey eksenle her döndürüldüğünde yatay eksenle de eğilir. Eğilme ve döndürme açıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Her bir açı değişimi sonrası peptitin enerji minimizasyonu yapılarak toplamda 36 farklı konformasyon için enerji değerleri hesaplanıp enerjisi en düşük olan konformasyonun altın yüzeyine bağlanan durum olarak seçilmesi hedeflenmiştir.

Literatürde altına yüksek afinitede bağlandığı bilinen peptitlere ise HyperChem programında 30°'lik açılarla altın yüzeyinde yukarıda bahsedilen pozisyonlandırma işlemi uygulanmıştır. Literatürden alınan peptitler altın yüzeyinde pozisyonlandırıldıktan ve geometri optimizasyonu yapıldıktan sonra bulunan en düşük enerjili peptit-altın sistemi moleküler dinamik simülasyonunun başlangıç yapısı olarak seçilmiştir.



Şekil 2.2: Pozisyonlandırma, altın yüzeyinde peptitin başlangıç yapısının ayarlanması için eğilme açısı,  $\phi$  ve döndürme açısı,  $\theta$ .

Peptitlerin minimizasyon enerjileri kullanılarak bağlanma enerjileri hesaplanır (Denklem 2.1).

$$E_{bağlanma} = E_{peptit / Au} - (E_{peptit} + E_{Au}) \quad (2.1)$$

Peptitlerin minimizasyon sonucu bağlanma enerjisi  $E_{bağlanma}$  ile gösterilmiştir. Peptitlerin bağlanma enerjileri, peptitlerin altın yüzeyindeki enerjisi,  $E_{peptit / Au}$ , ve peptitlerin ve altının aralarında herhangi bir etkileşim olmadığı andaki enerjileri ise sırasıyla  $E_{peptit}$ , ve  $E_{Au}$  olarak gösterilmiştir. Tez kapsamında, 20'si amino asit ve 240'ı peptit olmak üzere 260 molekülün bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Bağlanma enerjileri karşılaştırıldığında altına en iyi bağlanan 2 adet 7 amino asit zincirli peptit oluşturulmuş ve her iki peptitin de moleküler dinamik simülasyonları yapılmıştır.

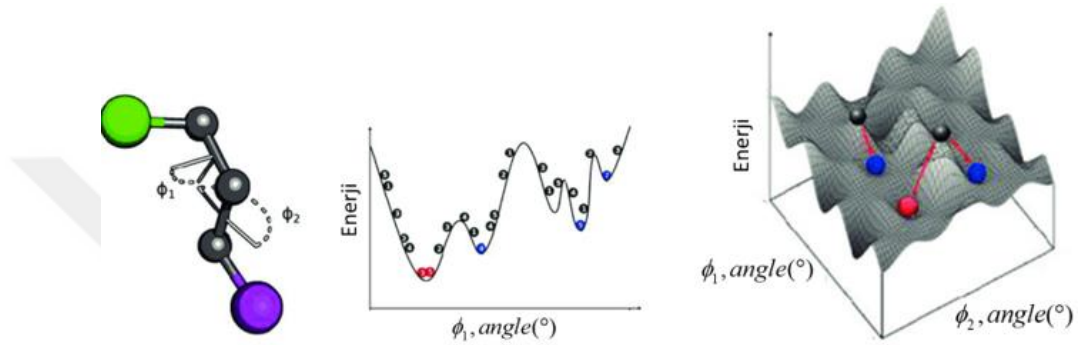
Analiz aşamasında peptitlerin içerdiği amino asitlerin altına olan uzaklıkları, RMSD (Root-Mean Square Deviaton) hesaplamaları ve kümeleme analizleri yapılmıştır.

## 2.2 Konformasyonel Tarama

Moleküler mekaniğin amacı moleküllerin minimum enerjiye sahip geometrisine ulaşmaktır. Bu işlem, enerji minimizasyonu veya geometri minimizasyonu/optimizasyonu olarak isimlendirilmektedir. Enerji minimizasyonlarının amacı molekülün bulunduğu konformasyona benzer durumlardaki lokal minimum enerjiye sahip konformasyonu bulmaktır. Enerjisi lokal minimumlarda bulunan bir molekül dışarıdan bir etki olmaksızın yakın enerjiye sahip konformasyonlara sahip şekilde hareket edebilir. Fakat farklı bir molekülün sisteme dahil edilmesi veya sıcaklık, basınç gibi dış etkiler sonucu sistemin enerjisi değişir ve molekül farklı bir lokal minimuma sahip konformasyona geçiş yapabilir. Genel minimum enerji yüzeyi, molekülün yapısının en kararlı halidir ve bu enerji yüzeyine sahip konformasyona ne kadar yaklaşırsa o kadar gerçek hayata yakın sonuçlar elde edilebilir. Öncelikle üç boyutlu yapıları düz bir zincir halinde oluşturulan peptit zincirlerinin genel minimum enerjiye yaklaşacak konformasyonlarının bulunabilmesi için konformasyonel tarama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde molekül üzerinde seçilen her bir burulma (dihedral) açısı aynı anda değiştirilerek en düşük enerjiye sahip



konformasyon bulunmaktadır. Şekil 2.3'te küçük bir molekül, sahip olduğu iki farklı dihedral açı ve düşük enerji konformasyonlarının sahip olduğu potansiyel enerji yüzeyi gösterilmiştir. Molekülün sahip olduğu potansiyel enerji yüzeyinde birçok lokal minimum enerji noktaları vardır. Lokal minima mavi noktalar, genel minima ise kırmızı nokta ile gösterilmiştir. Tez çalışmasında enerji minimizasyonu ve konformasyonel tarama yapılarak amino asitlerin ve peptitlerin genel minimum enerjilerine yani en kararlı konformasyonlarına ulaşmaları veya bu konformasyona yaklaşmaları amaçlanmıştır.



Şekil 2.3: Kısa zincirli peptitin iki farklı dihedral açısı ve potansiyel enerji yüzeyi (Borrel 2016).

Moleküllerin düşük enerji konformasyonlarının bulunması bilgisayarda yapılan simülasyonların süresini azaltır. Çünkü, konformasyonel tarama yapılmamış bir molekülün moleküler dinamik simülasyonu yapıldığında molekülün minimum enerjiye sahip konformasyonunu bulması zaman alabilir ve dihedral açısının değişmesi ya da sıcaklık gibi dışarıdan bir etki olmadığı sürece farklı bir konformasyondaki lokal minimada kalabilir. Konformasyonel tarama, molekülün her bir dihedral açı burulmasından sonra enerji minimizasyonu yapar ve sıradaki burulma açısının enerji minimizasyonunda referans olarak bir önceki konformasyonu kullanır. Tez dahilinde konformasyonel tarama HyperChem (2003) ile yapılmıştır. Konformasyonel tarama dört aşamadan oluşur. Bunlardan ilki başlangıç yapısının belirlenmesidir. İkinci olarak geometrik parametrelerin sisteme, moleküldeki farklı burulma açılarıyla seçilmesiyle, verilmesidir. Üçüncü olarak molekülün üzerine tanımlanan rastgele olarak ve farklı burulma açılarıyla geometri optimizasyonunun yapılmasıdır. Bu işlem minimum enerji konformasyonunu bulmak için yapılmaktadır. Son olarak dördüncü adımda, bulunan düşük enerji konformasyonu ile yeni araştırılan konformasyon karşılaştırılır ve daha düşük enerjiye sahip olan konformasyon ile konformasyonel taramaya devam edilir.

Moleküle tanımlanan farklı dihedral açıların denenmesiyle değişen yapıların her bir aşamada geometri optimizasyonu ile düşük enerji konformasyonları bulunabilmektedir.

Tez için uygulanan konformasyonel taramada her bir amino asit için 1.000 geometri optimizasyonu yapılmıştır ve 1.000 adet düşük enerji konformasyonu bulunmuştur. İkili peptitler için 3.000, üç ve dört amino asite sahip peptitler için 5.000, beş ve altı amino asite sahip peptitler için 7.000 ve yedi amino asit uzunluğundaki sekanslar için 8.000 adet geometri optimizasyonu yapılarak düşük enerjiye sahip peptit konformasyonları bulunmuştur. Geometri optimizasyonu sayısı artan peptit uzunluğuna bağlı olarak artırılmıştır. Bunun sebebi yapıdaki dihedral açıların miktarının sekans uzunluğu ile artmasıdır. Minimum enerji konformasyonlarına sahip yapılara ise önceden anlatılan altın yüzeyi üzerine pozisyonlandırma ve bağlanma enerjilerinin hesaplanması için enerjilerinin minimize edilmesi adımları uygulanmıştır.

### 2.3 Moleküler Dinamik

Moleküler dinamik (MD) atomları ve oluşturdukları moleküllerin üzerindeki kuvvetleri potansiyel enerji yüzeyleri olarak tanımlar ve moleküllerin minimum enerjiye sahip geometrisini bulmak için kullanılmaktadır. Bu metotta atomlar ve aralarındaki bağlar sırasıyla top ve yay gibi temsil edilmektedir. Moleküler dinamikte enerji terimi molekülün doğada sahip olduğu enerjiden farklıdır. Moleküllerin potansiyel enerjileri bağın gerilmesine, bükülmesine ve burulmasına karşı direncinin bir fonksiyonu olarak ifade edilmektedir. Moleküler dinamikteki potansiyel enerji yüzeyi şu şekilde ifade edilmektedir:

$$E = E_{gerilme} + E_{bükülme} + E_{burulma} + E_{bağlı\_olmayan} \quad (2.2)$$

$$E_{gerilme} = \sum_{bağlar} K_b (l - l_0)^2 \quad (2.3)$$

$$E_{bükülme} = \sum_{açılar} K_\phi (\phi - \phi_0)^2 \quad (2.4)$$

Denklem 2.3 ve 2.4'te sırasıyla gerilme ve bükülme enerjileri gösterilmiştir. Denklem

2.3 bağıın gerilmesinden sonraki  $l$  uzunluğunu ve  $l_0$  dengedeki bağ uzunluğunu içermektedir. Denklem 2.4'te ise bağıın bükülmeden önceki dengedeki açısı ve büküldükten sonraki açısı sırasıyla  $\phi_0$  ve  $\phi$  olarak gösterilmiştir.

$$E_{burulma} = \sum_{dihedraller} \frac{K_n}{2} (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) \quad (2.5)$$

Moleküler dinamikte burulma enerjisi Denklem 2.5'te gösterilmiştir.  $K_n$  dihedral kuvvet sabitidir ve  $n$  ise Fourier teriminde periyodikliği gösterir.  $\phi$  ve  $\phi_0$  sırasıyla dengedeki dihedral ve dihedralin değıştikten sonraki halidir.

$$E_{bağıl\_olmayan} = \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{4\pi D_o r_{ij}} + \sum_{ij} \left( \varepsilon_{ij} \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad (2.6)$$

Denklem 2.6 moleküllerin arasındaki elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerinin bir bütünü olarak gösterilmiştir.  $q_i$  ve  $q_j$  kısmi yükler,  $D_o$  vakumdaki geçirgenlik (permittivity)  $R_{min,ij}$  denge uzaklığını ve  $r_{ij}$  atomlar arası uzaklığı temsil etmektedir.

Moleküler dinamik atomların ve moleküllerin termodinamik özellikleri, dinamik davranışları ve geometrik konformasyonları hakkında bilgi veren bir hesaplama yöntemidir. Moleküler dinamik metodu Newton'un ikinci hareket yasasına bağılıdır ve öncelikle her bir atomun üzerindeki kuvveti zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplar. Her bir kuvvet potansiyel enerjinin negatif gradyanı olarak hesaplanır. Denklem 2.7'de  $i$  atomunun potansiyel enerjisi  $V$  ile ve pozisyonu  $r$  ile gösterilmiştir. Newton'un ikinci hareket yasası Denklem 2.8'deki gibi yazılabilir ve moleküler dinamik bu yasayı farklı algoritmalarla (velocity-verlet, beeman's algorithm, leap frog) çözerek atomların ve moleküllerin zamanla değışen pozisyonlarını, ivmelerini ve sonuç olarak hızlarını hesaplar.

$$F_i = - \frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (2.7)$$

$$F_i = m_i a_i \quad (2.8)$$

$$a_i = \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2.9)$$

$$m_i \left( \frac{d^2 r_i}{dt^2} \right) = - \frac{dV}{dr_i} \quad (2.10)$$

Moleküler dinamikte atomların arasındaki bağların, dihedrallerin ve van der Waals etkileşimlerinin tanımlanmaları için gerekli parametrelere ihtiyaç vardır. Bu parametreler kuvvet alanları olarak adlandırılırlar. MM2 (Allinger, 1977), CHARMM (MacKerell ve diğ., 1998), GROMOS (Oostenbrink ve diğ., 2004), OPLS (Jorgensen ve diğ., 1956), AMBER (Cornell ve diğ., 1995) gibi kullanılan çeşitli kuvvet alanları vardır. Tez çalışmasında, peptitler için AMBER ff14SB (Maier ve diğ., 2015), Au atomları için Interface\_v1\_5 (Heinz ve diğ., 2013), su molekülleri için ise TIP3P (Jorgensen ve diğ., 1983) kuvvet alanları kullanılmıştır.

Tez çalışmasında, literatürde altına iyi bağlandığı bilinen peptitlerin ve tasarlanan peptitlerin altın yüzeyi ile etkileşimleri, su molekülleri varlığında moleküler dinamik simülasyonları ile araştırılmıştır. Moleküler dinamik simülasyonu öncesinde tüm sistemin dengeye gelmesi ve bozulmaması için minimizasyon adımı yapılır. İlk adımda altın hareketi sabitlenmıştır ve peptitin hareketi ise kısıtlanmıştır. Simülasyonun ilk adımında sadece su ve iyon moleküllerinin enerjileri minimize edilmiştir. İkinci adımda protein, su ve iyon molekülleri minimize edilmiştir. Sonrasında sistem, yalnız altın hareketsiz iken 315 K'e kadar 1 ps aralıklarla 5 K arttırılarak ısıtılmış ve moleküler yapılar kaydedilmiştir. Ardından, 7, 12 ve 14 amino asit uzunluğundaki peptitler için sırası ile 50 ns, 80 ns ve 110 ns'lik moleküler dinamik simülasyonları yapılmıştır.

## 2.4 Kümeleme Analizleri

Moleküler dinamik simülasyonu boyunca birbirinden farklı olan peptit konformasyonlarından sistemi en çok domine eden peptit konformasyonu bağlanma enerjisi hesapları için seçilmiştir. Bu işlem VMD (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey ve diğ., 1996) programında eklenti olan bir yöntem olan kümeleme (clustering) ile yapılmıştır. Kümeleme metodu molekülleri RMSD (Root Mean Square

Deviation) değerlerine göre sınıflandırma yöntemidir. Bu metotta yakın RMSD değerlerine sahip olan molekül konformasyonları aynı kümede sınıflandırılır. RMSD değerleri birbirinden çok farklı olan molekül konformasyonları seçilen bir sınır (cutoff) değerine göre farklı gruplara ayrılır. RMSD ise moleküllerin ortamda ne kadar kararlı kaldıklarının bir ölçüsüdür. Bunu zaman içerisinde molekülün hareket eden atomların pozisyonları arasındaki mesafeyi ölçerek yapar. Böylece yapının ve yapıdaki atomların pozisyonlarının zamanla ne kadar yer değiştiğini gösterir. Denklem 10'da RMSD'nin nasıl hesaplandığı verilmiştir.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{atoms}} (r_i(t_1) - r_i(t_2))^2}{N_{atoms}}} \quad (2.11)$$

Denklem 2.11'de  $i$  bir değişken,  $t_1$  ve  $t_2$  zamanı  $N_{atoms}$  ise atom sayısını temsil eder.

## 2.5 Peptitlerin Altına Bağlanma Enerjilerinin Hesaplanması

Literatürde peptitlerin altına bağlanma enerjileri hesaplama metotları değişiklik göstermektedir. Peptitlerin platinyum (Pt) kristal yüzeylere bağlanma enerjileri (Oren, E. E., ve diğ., 2005) ve Au {111}-yüzeyine bağlanma enerjileri (Yu, J., ve diğ., 2011) peptitin bağlandığı durumdaki sistemin enerjisi ile bağlanmadığı durumdaki sistemin enerjisi arasındaki fark hesaplanarak bulunmuştur. Diğer bir çalışmada Guo ve diğerleri farklı proteinlerin grafen yüzeye bağlanma enerjilerini MMGBSA ile hesaplamışlardır (Guo, J., ve diğ., 2014). Bu çalışmada, peptitler tasarlanırken bağlanma enerjileri Denklem 2.1 kullanılarak hesaplanmıştır (Oren, E. E., ve diğ., 2005).



### 3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

Bu bölümde, hem literatürde deneysel olarak altına (Au {111} yüzeyine) yüksek afinite ile bağlandığı gösterilmiş olan peptitlerin hem de metot bölümünde detayları verilen yöntem ile tasarlanan peptitlerin altın ile etkileşimlerinin moleküler dinamik simülasyonları ve analizleri paylaşılacaktır.

#### 3.1 Konformasyonel Tarama Analizleri

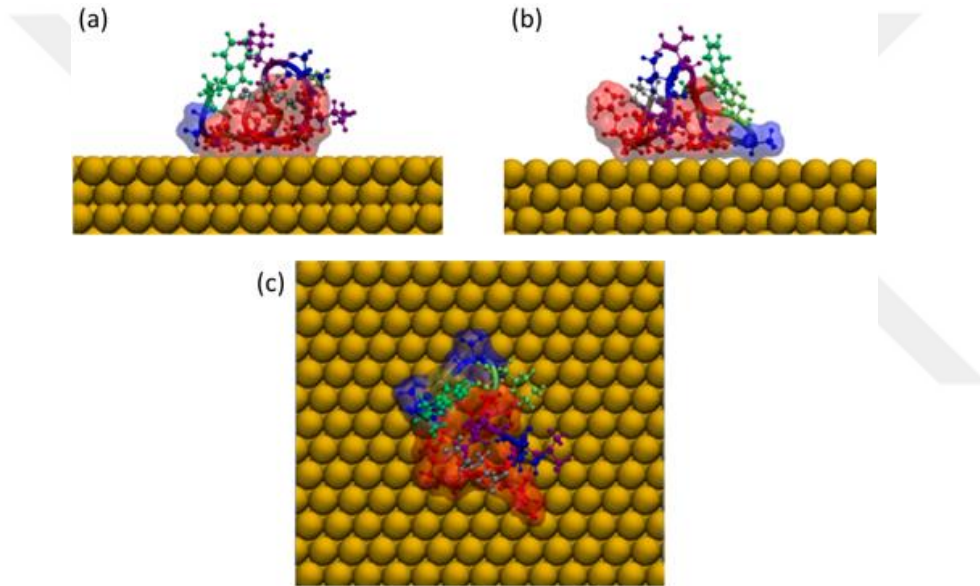
Bu tez kapsamında, öncelikli olarak literatür taramasında da bahsedildiği üzere, altına (Au {111}) yüksek afinite ile bağlandığı bilinen AuBP1, AuBP2 ve GBP peptitlerinin altın yüzeyi ile etkileşim mekanizmaları moleküler mekanik kullanılarak incelenmiştir. Bunun için AuBP1, AuBP2 ve GBP'nin moleküler yapıları HyperChem programı ile oluşturulmuştur.

Bu peptitlerin amino asit sekansları Çizelge 3.1'de peptitlerin içerdiği amino asitler farklı renklerde olacak şekilde verilmiştir. Tezin ilerleyen bölümlerinde HyperChem ve MD simülasyonlarının irdelendiği görüntülerde de peptitler bu renklere göre renklendirilecektir.

Çizelge 3.1: Peptitlerin amino asit dizilimleri ve yapılan MD simülasyonlarının süreleri

Peptit	Amino Asit Dizilimi	Simülasyon Süresi (ns)
AuBP1	WAGAKRLVLRRE	80
AuBP2	WALRRSIRRSY	80
GBP	MHGKTQATSGTIQS	110

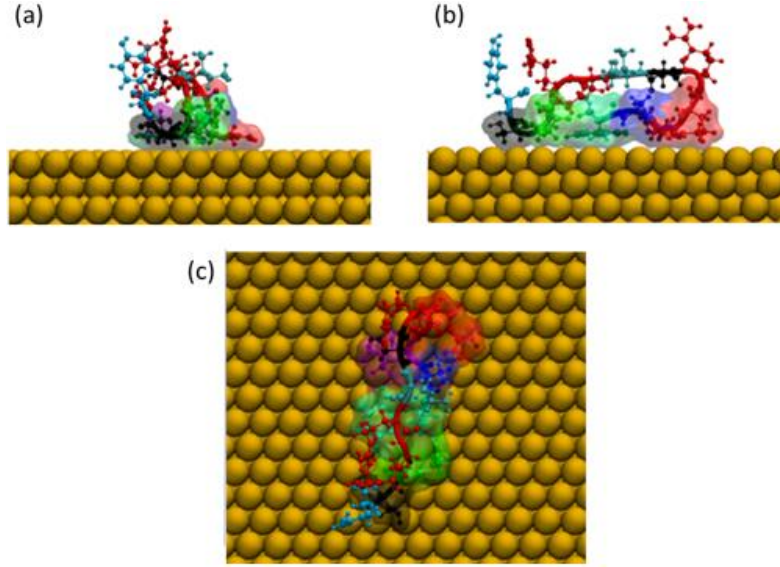
Ardından, bu peptitlerin yapı tahminleri HyperChem programının konformasyonel tarama yöntemi kullanılarak vakum altında (implicit water) yapılmıştır. Bu programda peptitler içerisinde farklı burulma (torsion) açıları seçilmiş ve bu açılar rastlantısal olarak değiştirilerek enerji minimizasyonları yapılmıştır. Yapılan 10.000 minimizasyon adımı sonunda en düşük enerjiye sahip konformasyon seçilerek bu konformasyonun Au {111} yüzeyi ile olan etkileşimi incelenmiştir. Burada Şekil 2.2’de gösterilen yöntem ile peptit Au {111} yüzeyi üzerine 36 farklı şekilde konularak enerji minimizasyonları yapılmış ve enerjiler karşılaştırılarak en iyi bağlanma konformasyonu belirlenmiştir. Bu konformasyonlar AuBP1, AuBP2 ve GBP için sırası ile Şekiller 3.1, 3.2 ve 3.3’te verilmiştir.



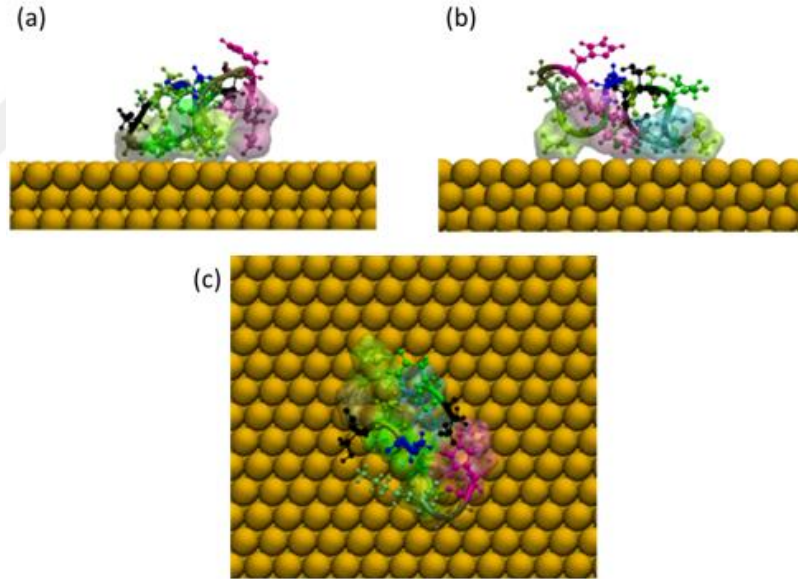
Şekil 3.1. AuBP1 (**WAGAKRLVLRRE**) başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü.

HyperChem sonuçlarından elde edilen en iyi bağlanma konformasyonu enerji minimizasyonu yapılarak incelendiğinde (Şekil 3.1) 12 aa uzunluğundaki AuBP1 peptitinin 2. (alanin, **A**), 3. (glisin, **G**), 4. (alanin, **A**), 6. (arjinin, **R**), 9. (lösin, **L**), 10. (arjinin, **R**), 11. (arjinin, **R**) amino asitlerinden bağlandığı gözlenmiştir. 12 amino asitlik AuBP2 peptitinin ise (Şekil 3.2) 1. (triptofan, **W**), 2. (alanin, **A**), 3. (lösin, **L**), 4. (arjinin, **R**), 10. (glutamin, **Q**) ve 11. (serin, **S**) amino asitlerinden bağlandığı gözlenmiştir.





Şekil 3.2 (a) AuBP2 (**WALRRSIRRQSY**) başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü.



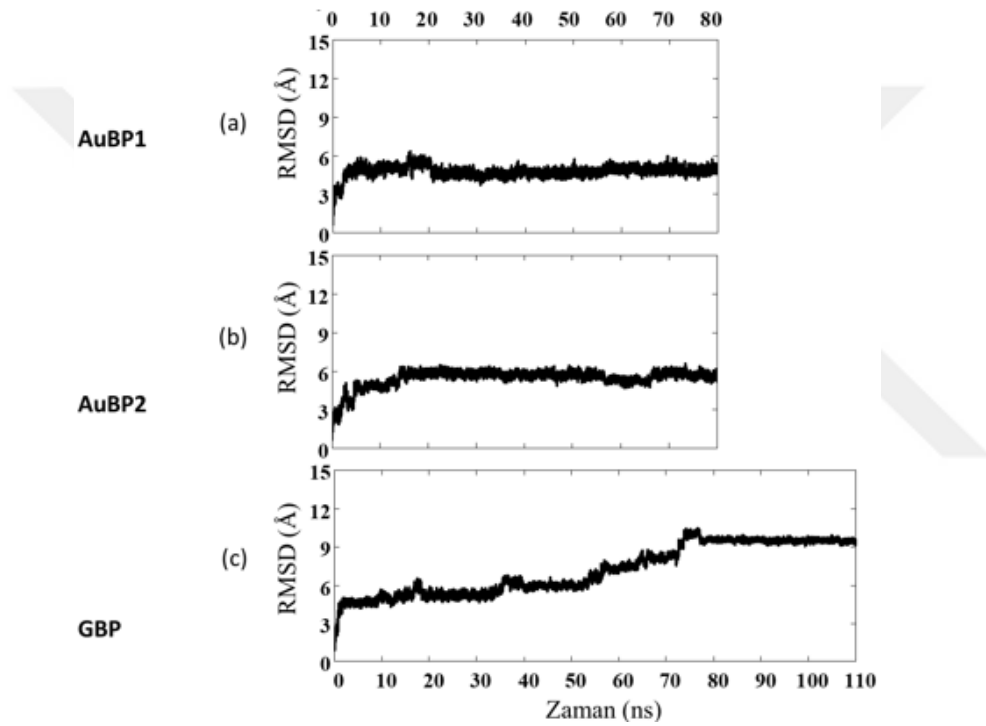
Şekil 3.3: GBP (**MHGKTQATSGTIQS**) başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü.

HyperChem sonuçlarından elde edilen en iyi bağlanma konformasyonu enerji minimizasyonu yapılarak incelendiğinde (Şekil 3.3) 14 aa uzunluğundaki GBP peptidinin 1. (metiyonin, **M**), 5. (treonin, **T**), 6. (glutamin, **Q**), 10. (glisin, **G**), 11. (treonin, **T**), 12. (izolösin, **I**) amino asitlerinden bağlandığı gözlenmiştir.

Bir sonraki bölümde bu bağlanma davranışının hem su varlığında (explicit water TIP3P) incelenmesi hem de zamana bağlı kararlılığının gözlenmesi için Moleküler Dinamik simülasyonları yapılmış ve sonuçları irdelenmiştir.

### 3.2 AuBP1, AuBP2 ve GBP Peptitlerinin MD Simülasyonları

HyperChem analizleri sonucunda altın yüzeyine en yüksek afiniteyle bağlanan peptit konformasyonları su varlığında (explicit water TIP3P) moleküler dinamik simülasyonu için başlangıç yapısı olarak kullanılmıştır (Şekiller 3.1, 3.2 ve 3.3).



Şekil 3.4. (a) AuBP1, (b) AuBP2 ve (c) GBP için RMSD grafikleri.

Kullanılan NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) moleküler dinamik programı için yöntem ve kuvvet alanları metot kısmında detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

AuBP1 ve AuBP2 için 80 ns'lik simülasyonlar yapılmış GBP için ise 110 ns'lik simülasyon yapılmıştır. Simülasyonların RMSD grafiklerinde platoya ulaşıldığı görülünce tamamlandığı kabul edilmiştir. Şekil 3.4'te her üç peptit için RMSD grafikleri verilmiştir.

AuBP1, RMSD grafiğine göre simülasyonun ilk 5 ns içerisinde, minimizasyon konformasyonunu Au {111}-yüzeyine uyarlamış ve sonrasında simülasyon süresince kararlı bir şekilde yüzeye bağlı kalmıştır (Şekil 3.4.a). Benzer bir şekilde AuBP2'nin de minimizasyon konformasyonu yüzeye adapte olduktan sonra kararlı bir yapıya ulaşmıştır (Şekil 3.4.b). Diğer taraftan GBP peptiti hızla yüzeye uyum sağlamış ancak şekil zaman içerisinde yavaş yavaş değişikliğe uğrayarak 75. ns sonunda kararlı bir yapıya ulaşmıştır (Şekil 3.4.c).

Moleküler Dinamik simülasyonları sırasında her bir koşu için her 1 ps'de moleküler yapılar kaydedilmiştir. Daha sonra bu yapılar (frame) kümeleme analizi ile incelenmiştir. Koşu sırasında alınan yapılar her bir peptit için ayrı ayrı analiz edilmiş ve en yüksek yoğunluğa (yapı sayısına) sahip 15 kümeye ayrılmıştır. Aşağıda, bu 15 kümenin ve bu kümelere dahil olmayan kümesizler grubunun yoğunlukları AuBP1, AuBP2 ve GBP peptitleri için sırası ile Çizelgeler 3.2, 3.3 ve 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.2: AuBP1'in kümeleme analiz sonuçları.

<b>Kümelere Eşik Değeri = 1.5</b>	<b>Konformasyon sayısı</b>	<b>Yüzde %</b>
<b>1</b>	40967	51.21
<b>2</b>	8002	10.00
<b>3</b>	4446	5.56
<b>4</b>	4140	5.18
<b>5</b>	3891	4.86
<b>6</b>	3482	4.35
<b>7</b>	2480	3.10
<b>8</b>	1367	1.71
<b>9</b>	1304	1.63
<b>10</b>	1303	1.63
<b>11</b>	1097	1.37
<b>12</b>	826	1.03
<b>13</b>	652	0.82
<b>14</b>	615	0.77
<b>15</b>	602	0.75
<b>Kümesiz</b>	4826	6.03

Çizelge 3.2 ve 3.3 AuBP1 ve AuBP2 peptitleri için tek bir baskın küme olduğunu gösterirken GBP için Çizelge 3.4 iki baskın kümenin olduğunu göstermektedir.

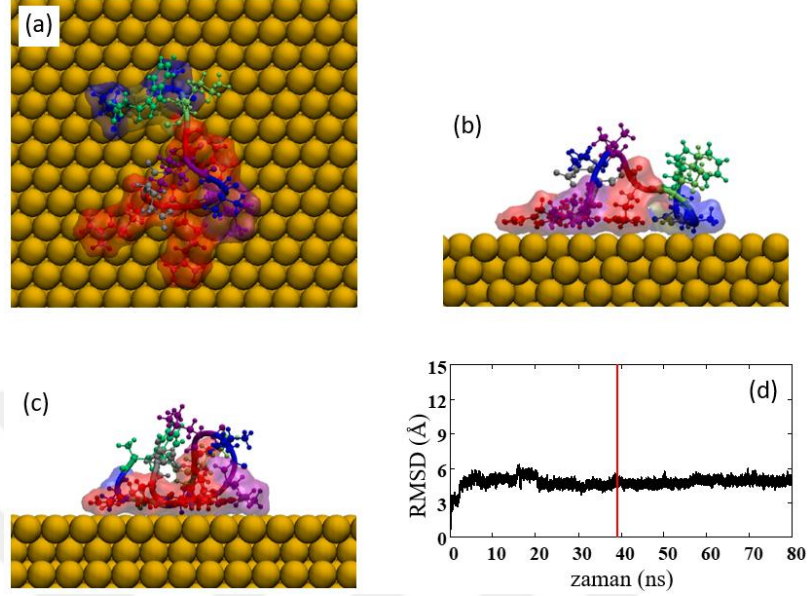
Çizelge 3.3: AuBP2'nin kümeleme analiz sonuçları.

<b>Kümeler Eşik Değeri = 2</b>	<b>Konformasyon sayısı</b>	<b>Yüzde %</b>
1	54520	68.15
2	9018	11.27
3	4800	6.00
4	3472	4.34
5	2119	2.65
6	2033	2.54
7	1830	2.29
8	429	0.54
9	427	0.53
10	313	0.39
11	219	0.27
12	164	0.21
13	130	0.16
14	127	0.16
15	95	0.12
<b>Kümesiz</b>	304	0.38

Çizelge 3.4: GBP'nin kümeleme analiz sonuçları.

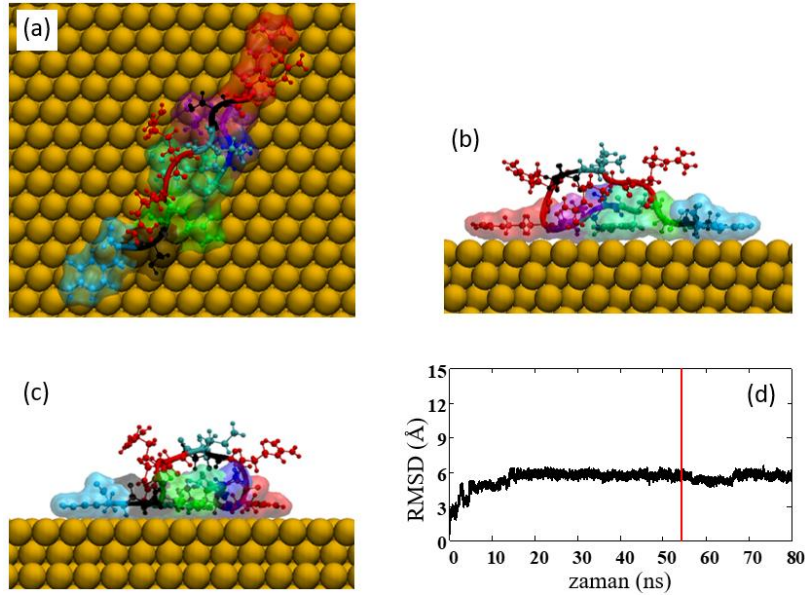
<b>Kümeler Eşik Değeri = 2.5</b>	<b>Konformasyon sayısı</b>	<b>Yüzde %</b>
1	39813	36.19
2	34192	31.08
3	13770	12.52
4	7513	6.83
5	4147	3.77
6	3339	3.04
7	2971	2.70
8	979	0.89
9	837	0.76
10	586	0.53
11	432	0.39
12	333	0.30
13	232	0.21
14	213	0.19
15	172	0.16
<b>Kümesiz</b>	471	0.43

Bu kümelerin yüzey bağlanma davranışlarını incelemek için her bir küme için temsilci yapılar hesaplanmış ve bu yapıların yüzeye bağlanma konformasyonları aşağıda değerlendirilmiştir.



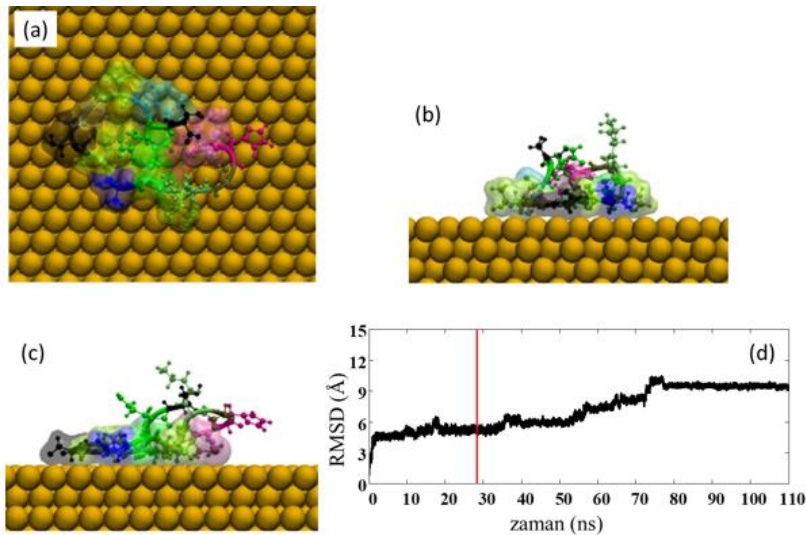
Şekil 3.5 AuBP1 (**WAGAKRLVLRRE**) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının simülasyondaki zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir.

AuBP1 ve AuBP2 için en yoğun kümenin temsilci yapısı yani küme merkezindeki yapılar Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir. Şekil 3.5'te AuBP1'in en yoğun kümesinin temsilci yapısında sırası ile 2. (alanin, **A**), 3. (glisin, **G**), 4. (alanin, **A**), 6. (arjinin, **R**), 9. (lösin, **L**), 10. ve 11. (arjinin, **R**) amino asitlerinin peptidin yüzeye bağlanmasında rol aldığı belirlenmiştir. Diğer yandan, bu peptid için 1. (triptofan, **W**), 5. (lizin, **K**), 7. (lösin, **L**), 8. (valin, **V**), 12. (glutamik asit, **E**) yüzey etkileşimlerinde rol almadığı gözlenmiştir. Şekil 3.6'da ise aynı analiz AuBP2 için yapılmış ve 1. (triptofan, **W**), 2. (alanin, **A**), 3. (lösin, **L**), 4. (arjinin, **R**), 10. (glutamin, **Q**), 11. (serin, **S**) ve 12. (tyrosin, **Y**) amino asitlerinin bağlanmada rol alırken 5. (arjinin, **R**), 6. (serin, **S**), 7. (izolösin, **I**), 8. ve 9. (arjinin, **R**) amino asitlerin simülasyon süresince yüzeye etkileşmediği gözlenmiştir.



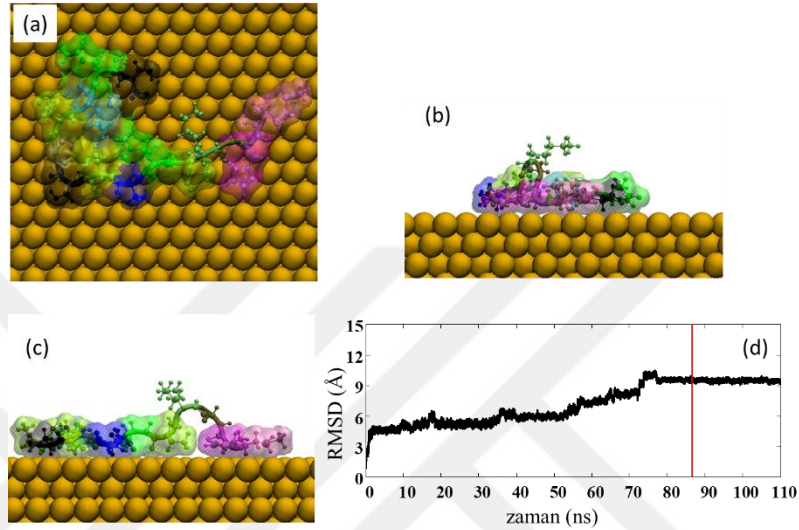
Şekil 3.6: AuBP2 (**WALRRSIRQSY**) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının simülasyondaki zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir.

GBP için yapılan MD simülasyonu ve takip eden kümeleme analizi (Çizelge 3.4) ise AuBP1 ve AuBP2'den farklı olarak iki farklı yapı kümesinin yoğun olarak bulunduğunu göstermiştir. Bu kümelere ait temsilci yapılar şekil 3.7 ve 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7: GBP (**MHGKTQATSGTIQS**) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının simülasyondaki zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir.

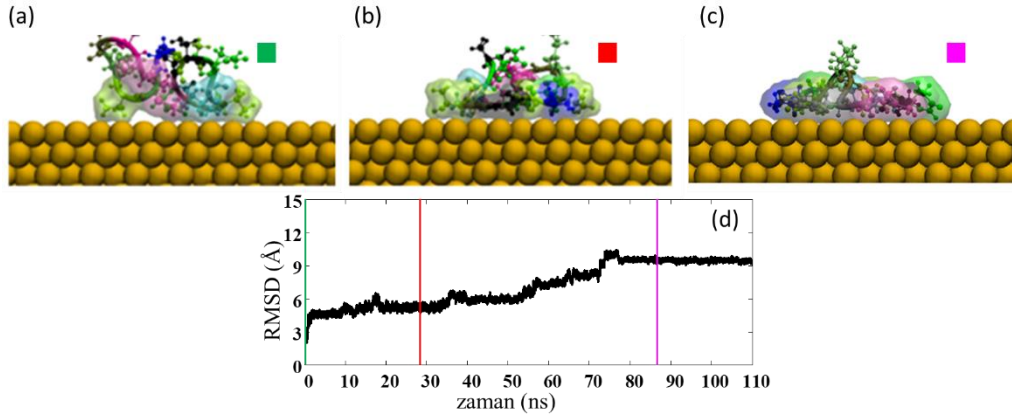
GBP'nin en yoğun kümesinde temsilci konformasyonda yüzeye etkileşen amino asitler 1. (metiyonin, **M**), 5. (treonin, **T**), 6. (glutamin, **Q**), 7. (alanin, **A**), 8. (treonin, **T**), 9. (serin, **S**), 10. (glisin, **G**), 11. (treonin, **T**), 12. (izolösin, **I**) numaralı amino asitleridir (Şekil 3.7). GBP'nin birinci yoğun kümesinde ise temsilci yapıda 2. (histidin, **H**), 3. (glisin, **G**), 4. (lösin, **K**), 13. (glutamin, **Q**) ve 14. (serin, **S**) yüzeye temas etmemektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.8: GBP (**MHGKTQATSGTIQS**) için en yoğun ikinci kümenin temsilci yapısı (a) önden görünümü (b) sağdan görünümü (c) üstten görünümü (d) temsilci yapının simülasyondaki zamansal konumu kırmızı çizgi ile gösterilmiştir.

GBP'nin ikinci kümesinde temsilci yapıda asitler 1. (metiyonin, **M**), 2. (histidin, **H**), 5. (treonin, **T**), 6. (glutamin, **Q**), 7. (alanin, **A**), 8. (treonin, **T**), 9. (serin, **S**), 10. (glisin, **G**), 11. (treonin, **T**), 12. (izolösin, **I**), 13. (glutamin, **Q**) ve 14. (serin, **S**) amino asitleridir (Şekil 3.8). GBP'de ikinci temsilci yapıda 3. (glisin, **G**) ve 4. (lösin, **K**) yüzeye temas etmemektedir.

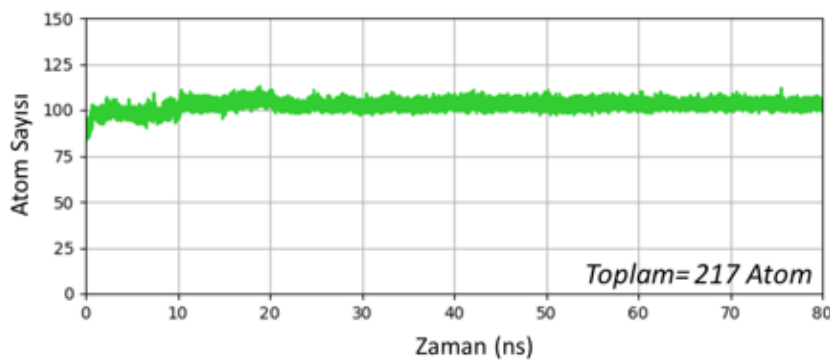
GBP'nin zaman içerisinde, Au {111}-yüzeyi ile 9 amino asit ile etkileştiği 1. temsilci yapıdan 12 amino asit ile etkileştiği ve daha kararlı olan 2. temsilci yapıya evrildiği görülmektedir. Bu yapısal değişimi daha iyi gösterebilmek için GBP'nin enerji minimizasyonu sonucu elde edilen başlangıç yapısı ile en yoğun ilk iki kümenin temsilci yapıları Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9: GBP (MHGKTQATSGTIQS)'nin (a) başlangıç yapısı, (b) en yoğun kümenin temsilci yapısı, (c) en yoğun ikinci kümenin temsilci yapısı ve (d) yapıların simülasyondaki zamansal konumları.

Şekil 3.9'da da görüldüğü üzere, GBP peptidi simülasyon süresince giderek altın yüzeyine doğru açılarak bağlanmış ve sonunda kararlı bir bağlanma konformasyonuna ulaşmıştır.

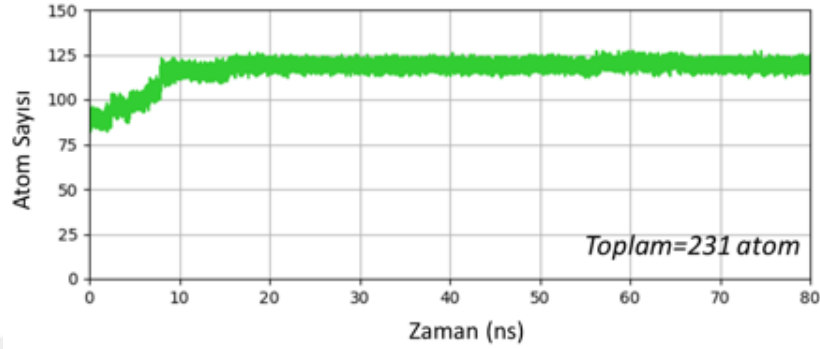
Peptitlerin altın yüzeyi ile etkileşimlerini gözlemleyebildiğimiz başka bir analiz de peptit atomlarının yüzeye olan yakınlıklarını incelenmesidir. Bu amaçla, her bir frame için peptit atomlarından kaç tanesinin yüzeye belirlenen eşik değerinden (5 Å) yakın olduğu hesaplanmıştır. Sonuçlar AuBp1, AuBP2 ve GBP için sırası ile Şekiller 3.10, 3.11 ve 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.10: AuBP1 (toplam atom sayısı: 217) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi.

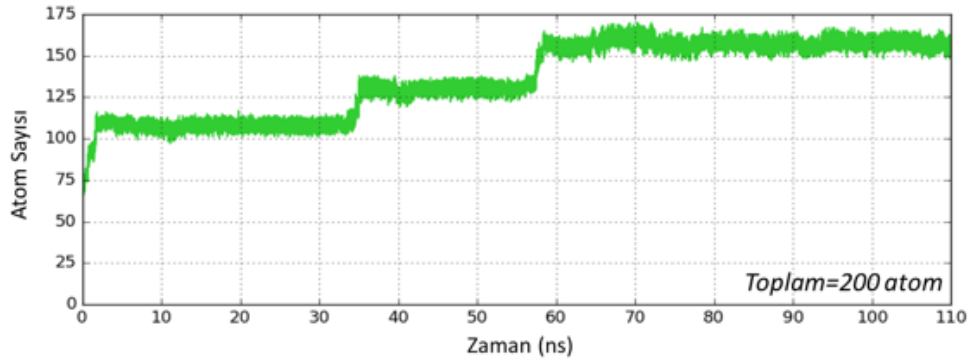


Şekil 3.10'da 217 tane AuBP1 atomlarının yaklaşık 100 tanesinin (% 46'sının) altın yüzeyi ile kararlı bir şekilde temas ettiği gözlenmiştir. Şekil 3.11'de ise 231 tane AuBP2 atomunun yaklaşık 125 tanesinin (% 54'ünün) altın yüzeyi ile etkileşim halinde olduğu belirlenmiştir.



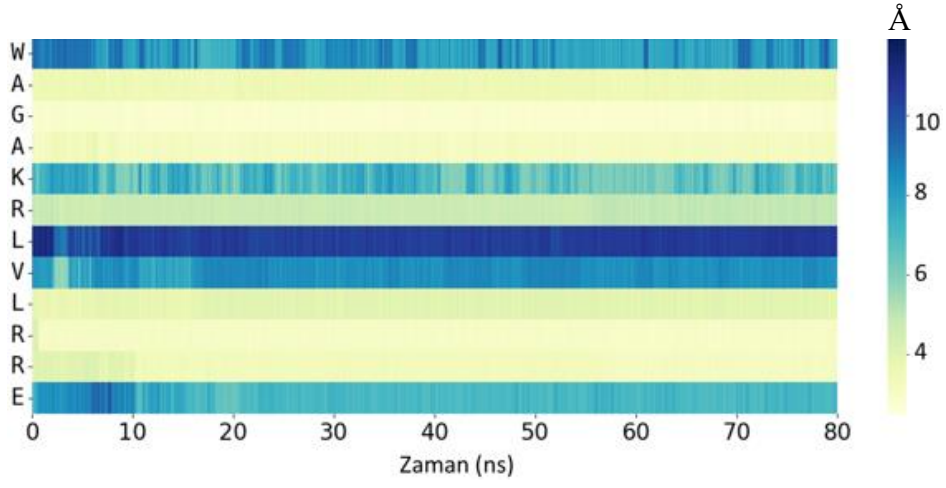
Şekil 3.11: AuBP2 (toplam atom sayısı: 231) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi.

Şekil 3.12'de ise 200 tane GBP atomunun önce yaklaşık 125 tanesinin (% 62.5'unun) yüze yayılım sonrasında ise yaklaşık 160 tanesinin (%80'inin) altın {111}-yüzeyi ile etkileşim halinde olduğu belirlenmiştir.

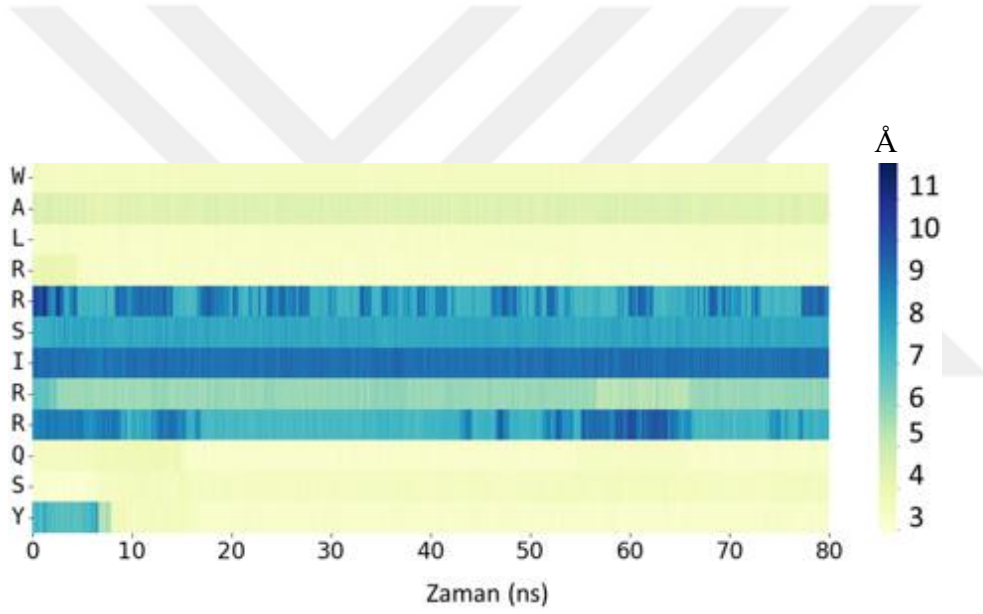


Şekil 3.12: GBP (toplam atom sayısı: 200) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi.

Yapısal analizler için ayrıca, peptitleri oluşturan amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları hesaplanmış ve zamana göre değişimleri AuBP1, AuBP2 ve GBP peptitleri için sırasıyla Şekiller 3.13, 3.14 ve 3.15'te verilmiştir.

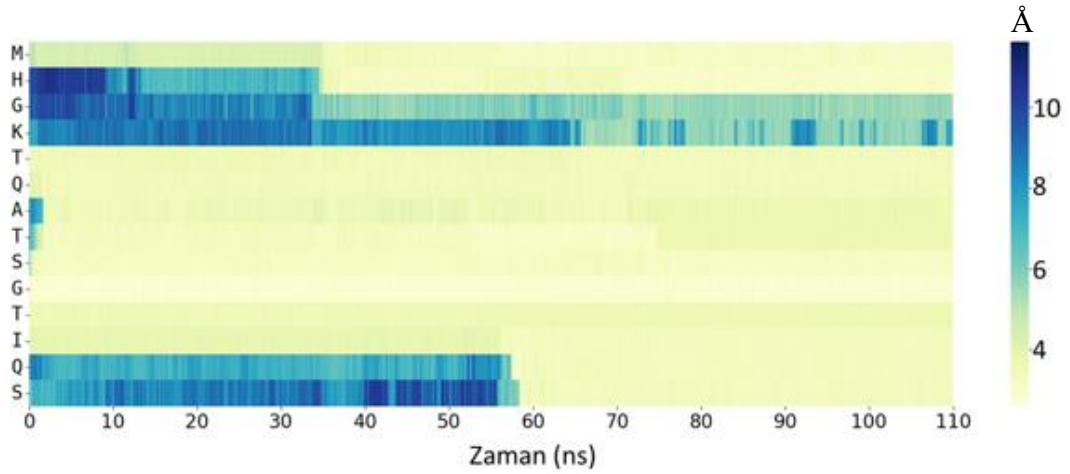


Şekil 3.13: AuBP1'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}- yüzeyine olan uzaklıkları (Å).



Şekil 3.14: AuBP2'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}- yüzeyine olan uzaklıkları (Å).

Bu şekiller peptitlerin her bir amino asitinin zamanla Au {111}-yüzeyine bağlanma sürecini de göstermektedir.



Şekil 3.15: GBP'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å).

Bu bulgular, Tang ve diğ., (2013) tarafından AuBP1, AuBP2 ve GBP ile yapılan simülasyon çalışmaları ile büyük oranda örtüşmektedir. Aynı çalışmada yapılan QCM analizleri ile de her üç peptidin yaklaşık olarak benzer bağlanma enerjilerine sahip olduğu gösterilmiştir. Çizelge 3.5'de bu çalışmada bulunan bağlanan amino asitler literatürde belirtilen amino asitleri içermekle birlikte uzun simülasyon süresi sonucunda diğer amino asitlerin de yüzeye yaklaştığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.5: Peptitlerin amino asit dizilimleri ve yapılan MD simülasyonlarının süreleri

Peptit	Bağlanan Amino Asitler Bu çalışma	Bağlanan Amino Asitler Tang ve diğ., 2013	Bağlanma Enerjileri Tang ve diğ., 2013
AuBP1	<b>WAGAKRLVLRRE</b>	<b>WAGAKRLVLRRE</b>	$-37.6 \pm 0.9$ kJ/mol
AuBP2	<b>WALRRSIRRQSY</b>	<b>WALRRSIRRQSY</b>	$-36.4 \pm 0.3$ kJ/mol
GBP	<b>MHGKTQATSGTIQS</b>	<b>MHGKTQATSGTIQS</b>	$-37.6 \pm 1.0$ kJ/mol

Tezin bir sonraki bölümünde ayrı ayrı amino asitlerin bağlanmaları incelenerek yeni peptitler tasarlanacaktır.

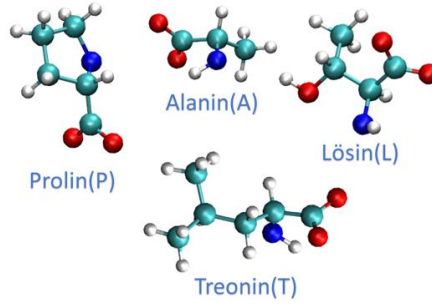
### 3.3 Peptitlerin Tasarımı

Bu bölümdeki amacımız, tek tek amino asitlerden başlayıp adım adım 7 amino asit uzunluğunda altına afinite gösteren peptitler tasarlamaktır. Peptitlerin Au {111}-yüzeyi etkileşimleri su molekülleri içerisinde enerji minimizasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Bu tasarım yönteminde, öncelikle peptitin (su içerisindeki) en düşük enerjiye sahip konformasyonu bulunmuş (Au yüzeyine 20 Å uzaklıkta) daha sonra da bu en düşük enerjili peptit konformasyonunun Au {111} yüzeyindeki etkileşimleri (Au yüzeyine 5 Å uzaklıkta) incelenmiştir. Peptitler altın yüzeyine yaklaştırıldığında farklı yüzeylerin etkileşimlerini karşılaştırabilmek için 60 derecelik açılarla döndürülmüş (rotation) ve eğilmiştir (tilt). Her bir peptit için 36 farklı etkileşim için minimizasyonlar yapıp en düşük enerjili yapılar bulunarak bu yapılardan bağlanma enerjileri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6: 20 temel amino asitin Au {111}-yüzeyine bağlanma enerjileri.

Amino Asit aa	$E_{aa/Au}$ (kcal/mol)	$E_{aa} + E_{Au}$ (kcal/mol)	$E_{bağlanma}$ (kcal/mol)
<b>Pro (P)</b>	-72679.9	-72360.9	-319.0
<b>Ala (A)</b>	-72685.4	-72375.6	-309.8
<b>Ser (S)</b>	-72693.5	-72412.9	-280.7
<b>Gly (G)</b>	-72759.4	-72490.8	-268.6
<b>Asn (N)</b>	-72785.4	-72560.2	-225.2
<b>His (H)</b>	-72610.6	-72387.6	-223.1
<b>Ile (I)</b>	-72613.5	-72425.4	-188.1
<b>Tyr (Y)</b>	-72537.1	-72351.2	-185.9
<b>Asp (D)</b>	-72718.8	-72533.1	-185.7
<b>Arg (R)</b>	-72784.9	-72599.9	-185.0
<b>Cys (C)</b>	-72675.4	-72520.6	-154.8
<b>Gln (Q)</b>	-72651.1	-72502.0	-149.1
<b>Lys (K)</b>	-72564.8	-72430.4	-134.4
<b>Glu (E)</b>	-72730.3	-72600.2	-130.1
<b>Val (V)</b>	-72621.3	-72492.7	-128.6
<b>Met (M)</b>	-72592.0	-72486.2	-105.8
<b>Trp (W)</b>	-72535.1	-72440.0	-95.1
<b>Phe (F)</b>	-72531.3	-72446.8	-84.5
<b>Thr (T)</b>	-72771.3	-72720.4	-50.9
<b>Leu (L)</b>	-72585.1	-72552.8	-32.4

Bağlanma enerjileri (Çizelge 3.6) karşılaştırıldığında altın yüzeyine göreceli olarak en yüksek afinite ile bağlanan iki amino asit prolin (P) ve alanindir (A). En zayıf bağlanan amino asitler ise lösin (L) ve treonin (T) olarak belirlenmiştir. Bahsedilen amino asitlerin konformasyonel araştırma sonrası açığa çıkan yapıları şekil 3.16’de gösterilmiştir.

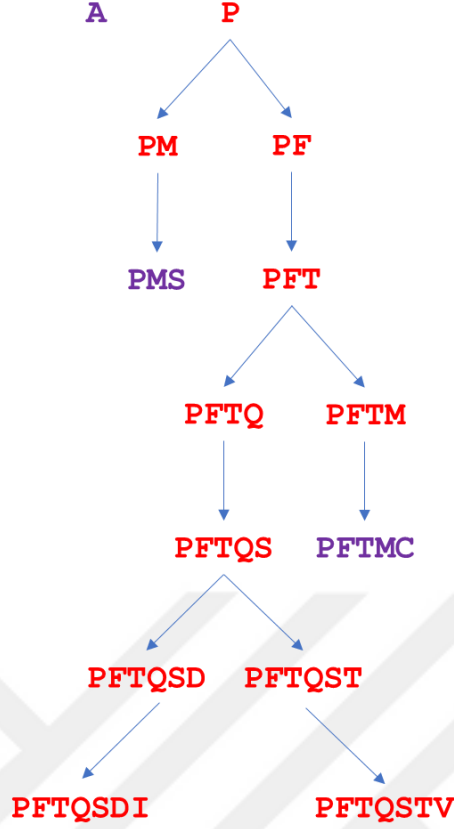


Şekil 3.16: Prolin (P), alanin (A), treonin (T), lösin (L) amino asitlerinin başlangıç yapıları.

Buradan en iyi bağlandığı bulunan iki amino asit seçilip arkasından her birine 20 amino asit tek tek eklenerek 40 farklı iki amino asitlik peptit üretilmiştir. Bu peptitlerin her biri için önce Au yüzeyi ile etkileşmeden ve sonra da Au yüzeyi ile etkileşim halindeki konformasyonları NAMD de enerji minimizasyonları ile hesaplanarak en iyi bağlanma enerjisine sahip ikili peptitler seçilmiştir.

7 amino asitlik tüm olası peptitlerin enerjilerinin hesaplanması için astronomik süreler gerekmektedir. 7 amino asit uzunluğunda  $20^7 = 1.280.000.000$  farklı sayıda peptit oluşturulabilir ve her birinin hesaplanması pratik olarak mümkün değildir. Bu nedenle bu tez kapsamında kullanılan tasarım metodu, görece çok kısa sürelerde peptitler tasarlamamızı sağlamaktadır. Bu peptitlerin tasarımında, her ne kadar her olasılık denenmemiş, dolayısı ile en yüksek afiniteye sahip peptit bulunamamış olsa da elde edilen peptitlerin yüksek afiniteye sahip olması beklenmektedir.

Bu tasarım algoritması ile daha sonra 3’lü, 4’lü, 5’li, 6’lı ve son olarak 7’li peptit sekansları bulunmuştur. Şekil 3.17’de bu sekansların oluşum basamakları verilmiştir.



Şekil 3.17: Tasarım basamakları ve her bir basamak için en iyi bağlanan sekanslar.

Tez çalışmasında geliştirilen ekleme metodu sonucunda 7 amino aside sahip peptitlerin tasarımında her bir basamak ayrı ayrı verilmemiş olmakla birlikte Çizelge 3.7’de en iyi bağlanma enerjisine sahip olan ilk iki 6’lı sekansa eklenen amino asitlerin hesaplanan bağlanma enerjileri gösterilmiştir.

Tablolarda gösterilen “?” sembolü altına göreceli olarak yüksek afinite ile bağlanan, ekleme metodunun uygulandığı bir önceki peptite eklenen her bir amino asiti temsil etmektedir.

Çizelge 3.7’ye göre altın yüzeyine kuvvetli bağlanan 7 amino asite sahip peptitler arasından en iyi bağlanma enerjisine sahip ilk ikisi sırasıyla PFTQSTV ve PFTQSDI peptitleridir.

Çizelge 3.7: 7 amino asit uzunluğundaki peptitlerin bağlanma enerjileri

PFTQST + ?	$E_{bağlanma}$ (kcal/mol)	PFTQSD + ?	$E_{bağlanma}$ (kcal/mol)
Val	-401.9	Ile	-401.8
Ala	-386.9	Lys	-284.3
Pro	-327.2	Ser	-259.8
Gln	-304.9	Asn	-253.9
Trp	-297.6	Met	-241.6
Met	-297.4	Cys	-237.0
Gly	-277.7	Phe	-234.1
Asp	-261.7	Glu	-221.8
Asn	-261.0	Leu	-208.6
Glu	-228.8	Val	-200.6
Arg	-222.8	Pro	-196.2
Leu	-213.7	Asp	-194.9
Phe	-204.0	Trp	-177.3
Thr	-166.0	Thr	-167.7
Cys	-131.0	Arg	-138.8
Lys	-101.9	His	-129.9
Ile	-81.2	Gly	-119.2
Tyr	-65.3	Gln	-115.5
Ser	-38.6	Ala	-99.0
His	-33.3	Tyr	-93.8

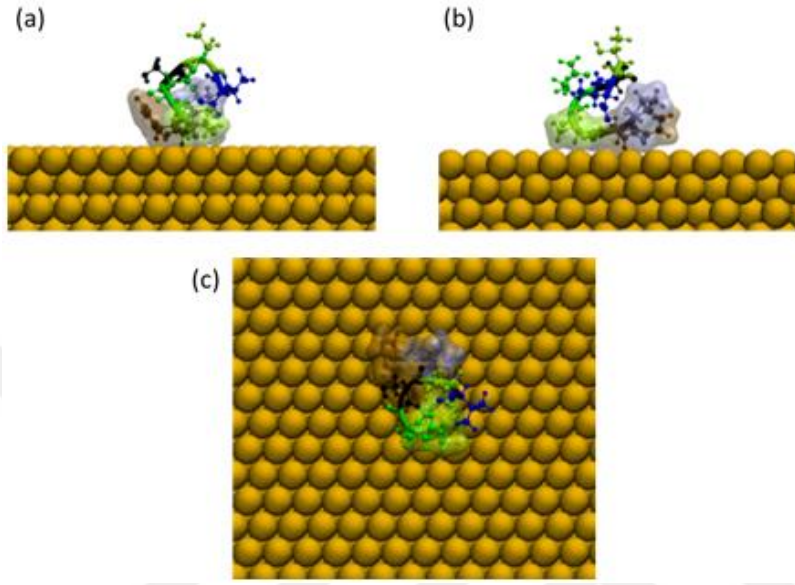
### 3.4 Tasarlanan Peptitlerin MD Simülasyonları

Tez çalışmasının bu bölümünde daha önce literatürde Au {111} yüzeyine yüksek afinite ile bağlandığı bilinen AuBP1, AuBP2 ve GBP peptitlerine yapılan MD analizleri bir önceki bölümde tasarlanan 7 amino asite sahip peptitlere uygulanmıştır. Çizelge 3.8’de, tasarlanan ve moleküler dinamiği yapılan peptitlerin amino asit dizilimleri ve moleküler dinamik simülasyon süreleri gösterilmiştir.

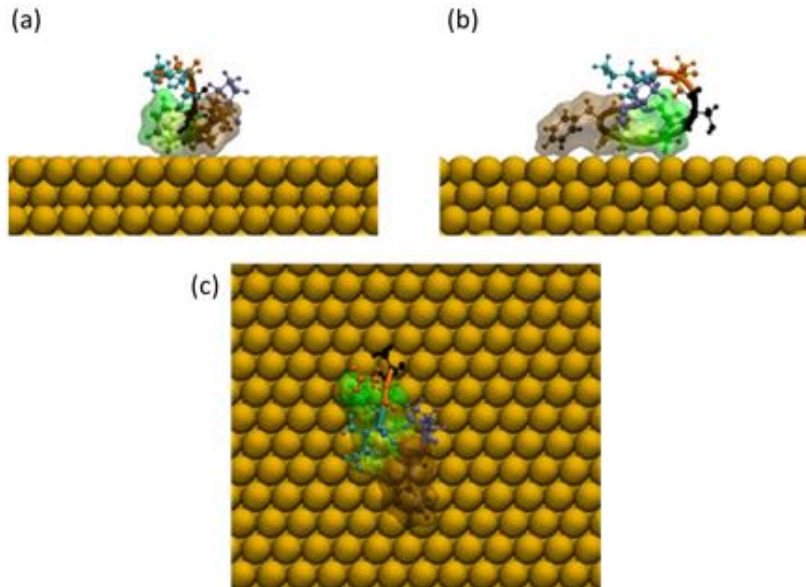
Çizelge 3.8: Tasarlanan peptitler ve moleküler dinamik süreleri.

Peptit	Amino Asit Dizilimi	Simülasyon Süresi (ns)
T1	PFTQSTV	50
T2	PFTQSDI	50

Tasarlanan Tas-1 (**PFTQSTV**) ve Tas-2 (**PFTQSDI**) peptitlerinin, pozisyonlandırma ve minimizasyon aşamalarından sonra elde edilen en düşük enerjili pozisyonları ve dolayısıyla moleküler dinamik simülasyonlarındaki başlangıç yapıları sırasıyla şekil 3.18 ve 3.19’da verilmiştir.



Şekil 3.18: (a) **PFTQSTV** başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü.



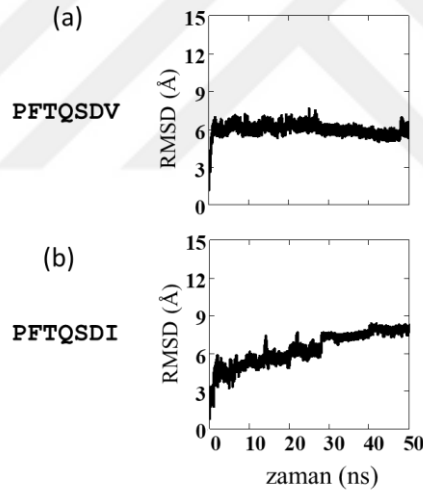
Şekil 3.19: (a) **PFTQSDI** başlangıç yapısı (a) önden, (b) sağdan ve (c) üstten görünümü.



Enerji minimizasyonları sonucu elde edilen elde edilen en iyi bağlanma konformasyonu incelendiğinde (Şekil 3.18) 7 aa uzunluğundaki Tas-1 peptidinin 1. (prolin, **P**), 2. (fenilalanin, **F**) ve 3. (treonin, **T**) amino asitlerinden bağlandığı gözlenmiştir. 7 amino asitlik Tas-2 peptidinin ise (Şekil 3.19) 2. (fenilalanin, **F**), 3. (treonin, **T**) ve 4. (glutamin, **Q**) amino asitlerinden bağlandığı gözlenmiştir.

Yukarıda verilen başlangıç bağlanma konformasyonları kullanılarak bu bağlanma davranışının hem su varlığında (explicit water TIP3P) incelenmesi hem de zamana bağlı kararlılığının gözlenmesi için Moleküler Dinamik simülasyonları (NAMD: Nanoscale Molecular Dynamics) yapılmış ve sonuçları aşağıda irdelenmiştir.

Tas-1 ve Tas-2 peptitleri için 50 ns'lik simülasyonlar yapılmıştır. Simülasyonların RMSD grafiklerinde platoya ulaşıldığı görülünce tamamlandığı kabul edilmiştir. Şekil 3.20'de her üç peptit için RMSD grafikleri verilmiştir.



Şekil 3.20: Tas-1 (PFTQSTV) ve Tas-2 (PFTQSDI) peptitlerinin RMSD değerleri.

Tas-1, RMSD grafiğine göre simülasyonun ilk 1-2 ns içerisinde, minimizasyon konformasyonunu Au {111}-yüzeyine adapte etmiş ve sonrasında simülasyon süresince kararlı bir şekilde yüzeye bağlı kalmıştır (Şekil 3.20.a). Diğer taraftan Tas-2 peptidinin yüzey adaptasyonu 30. ns civarında tamamlanmış ve sonunda kararlı bir yapıya ulaşmıştır (Şekil 3.20.b).

Moleküler Dinamik simülasyonları sırasında her bir koşu için her 1 ps’de moleküler yapılar kaydedilmiştir. Daha sonra bu yapılar (frame) kümeleme analizi ile incelenmiştir. Koşu sırasında alınan yapılar her bir peptit için ayrı ayrı analiz edilmiş ve en yüksek yoğunluğa (yapı sayısına) sahip 15 kümeye ayrılmıştır. Aşağıdaki çizelgelerde bu 15 kümenin ve bu kümelerden hiç birine dahil olmayan kümesizler grubunun yoğunlukları Tas-1 ve Tas-2 peptitleri için sırası ile Çizelgeler 3.9 ve 3.10’da verilmiştir.

Çizelge 3.9: Tas-1’in kümeleme analizi sonuçları.

<b>Küme Eşik Değeri =1.5</b>	<b>Konformasyon sayısı</b>	<b>Yüzde %</b>
<b>1</b>	23200	46.40
<b>2</b>	9261	18.52
<b>3</b>	6740	13.48
<b>4</b>	3626	7.25
<b>5</b>	2633	5.27
<b>6</b>	1371	2.74
<b>7</b>	679	1.36
<b>8</b>	474	0.95
<b>9</b>	421	0.84
<b>10</b>	362	0.72
<b>11</b>	346	0.69
<b>12</b>	215	0.43
<b>13</b>	177	0.35
<b>14</b>	136	0.27
<b>15</b>	87	0.17
<b>Kümesiz</b>	272	0.54

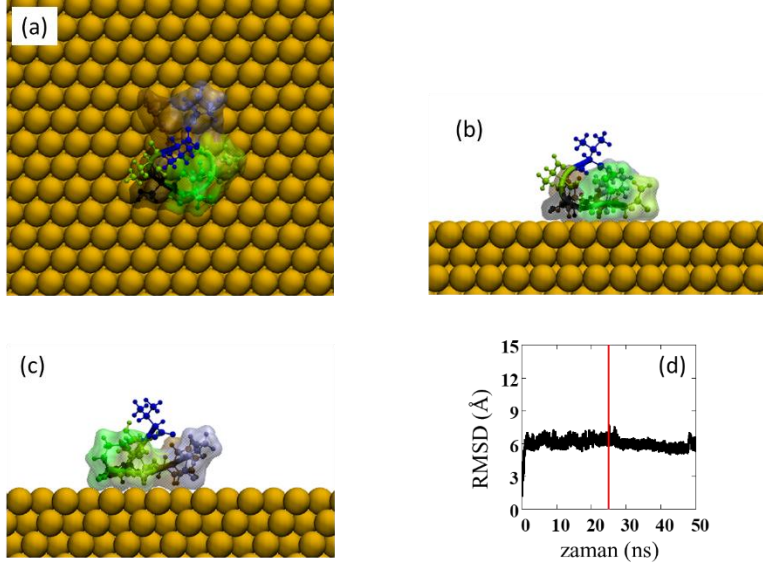
Çizelge 3.9 ve 3.10 Tas-1 ve Tas-2 peptitleri için tek bir baskın küme olduğunu göstermektedir. Simülasyonların dengeye geldikleri göz önüne alınca simülasyon sürelerinin uzatılması bu baskın kümelerin yoğunluklarını arttıracaktır.

Çizelge 3.10: Tas-2'nin kümeleme analizi sonuçları.

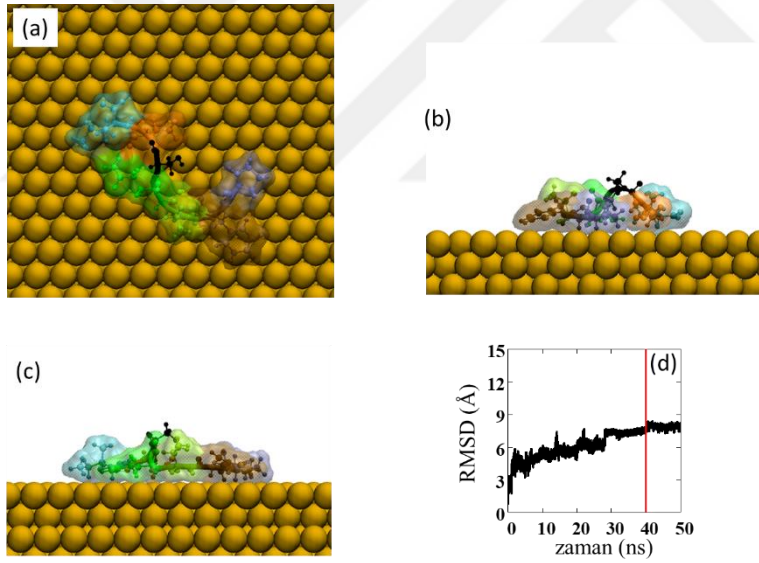
Kümeleler Eşik Değeri = 2	Konformasyon sayısı	Yüzde %
1	17763	35.53
2	5810	11.62
3	5670	11.34
4	5032	10.06
5	4414	8.83
6	2904	5.81
7	1246	2.49
8	997	1.99
9	985	1.97
10	944	1.89
11	738	1.48
12	672	1.34
13	514	1.03
14	504	1.01
15	450	0.90
<b>Kümesiz</b>	1357	2.71

Bu kümelerin yüzey bağlanma davranışlarını incelemek için daha önce yapıldığı şekilde her bir küme için temsilci yapılar hesaplanmış ve bu yapıların yüzeye bağlanma konformasyonları aşağıda değerlendirilmiştir.

Tas-1 ve Tas-2 için en yoğun kümenin temsilci yapısı yani küme merkezindeki yapılar sırası ile Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de verilmiştir. Şekil 3.21'de Tas-1'in en yoğun kümesinin temsilci yapısında sırası ile 1. (prolin, **P**), 2. (fenilalanin, **F**), 3. (treonin, **T**), 4. (glutamin, **Q**), ve 5. (serin, **S**) amino asitlerinin peptitin yüzeye bağlanmasında rol aldığı belirlenmiştir. Şekil 3.22'de ise aynı analiz Tas-2 peptiti için yapılmış ve 1. (prolin, **P**), 2. (fenilalanin, **F**), 3. (treonin, **T**), 4. (glutamin, **Q**), 6. (aspartik asit, **D**) ve 6. (izolösin, **I**) amino asitlerinin simülasyon süresince yüzeye etkileştiği gözlenmiştir.

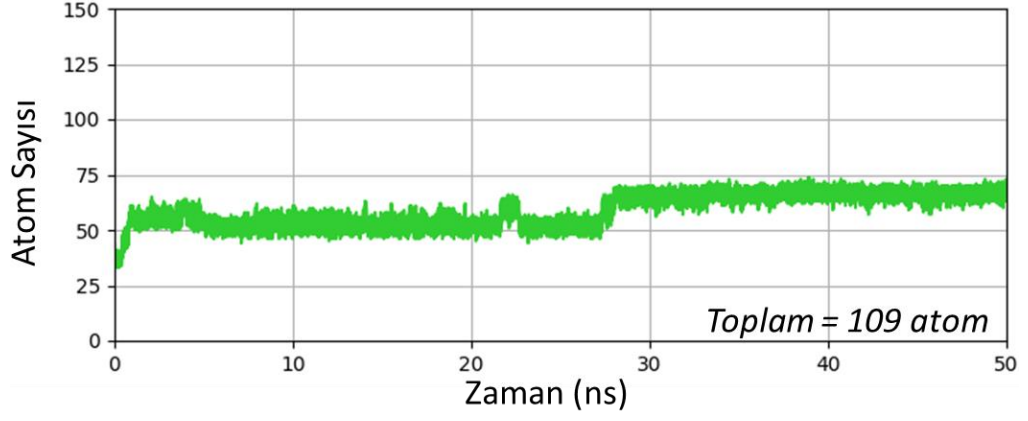


Şekil 3.21: Tas-1 (**PFTQSTV**) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) üstten görünümü (b) önden görünümü (c) sağdan görünümü (d) simülasyondaki yeri.



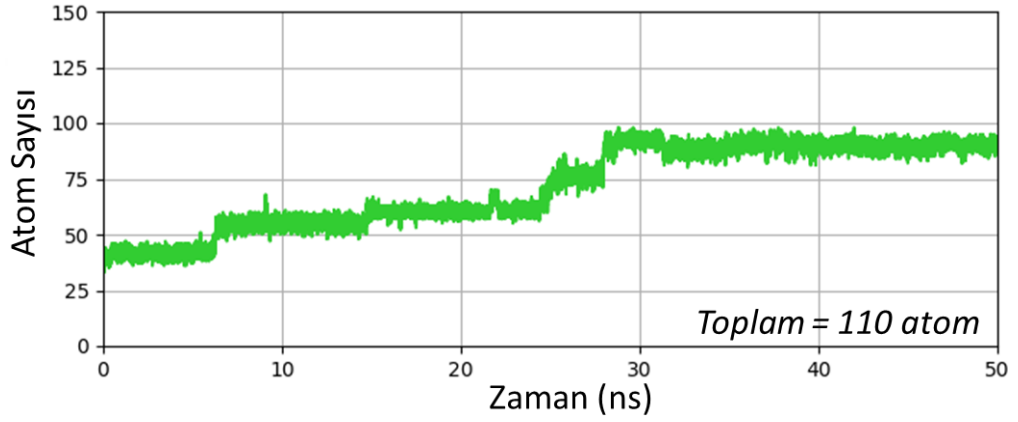
Şekil 3.22: Tas-2 (**PFTQSDI**) için en yoğun kümenin temsilci yapısı (a) üstten görünümü (b) önden görünümü (c) sağdan görünümü (d) simülasyondaki yeri.

Tasarlanan peptitlerin altın yüzeyi ile etkileşimlerini gözlemleyebilmek için peptit atomlarının yüzeye olan yakınlıkları incelenmiştir. Burada, her bir frame için peptit atomlarından kaç tanesinin yüzeye belirlenen eşik değerinden (5 Å) yakın olduğu hesaplanmıştır. Sonuçlar Tas-1 ve Tas-2 için sırası ile Şekiller 3.23 ve 3.24'te verilmiştir.



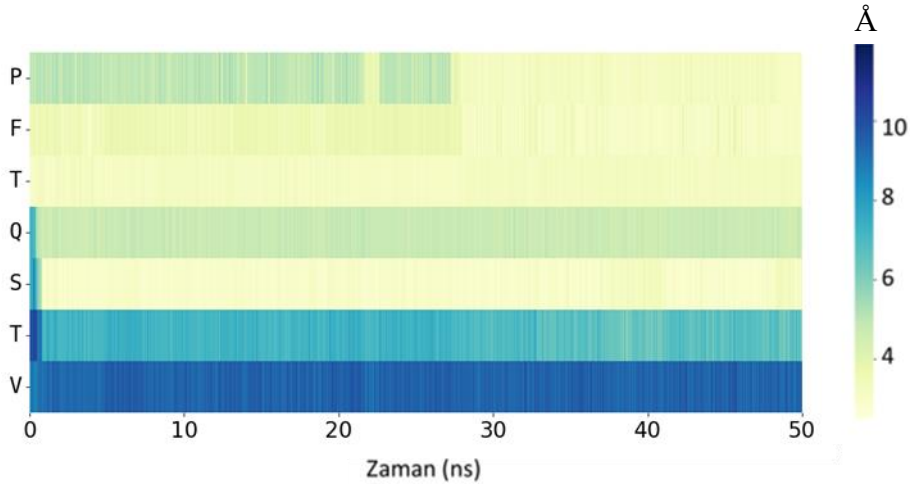
Şekil 3.23: Tas-1 (toplam atom sayısı: 109) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5 Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi.

Şekil 3.23'te 109 tane Tas-1 atomlarının yaklaşık 72 tanesinin (% 66'sının) Au {111}-yüzeyi ile kararlı bir şekilde temas ettiği gözlenmiştir. Şekil 3.24'te ise 110 tane Tas-2 atomunun yaklaşık 90 tanesinin (% 82'sinin) Au {111}-yüzeyi ile etkileşim halinde olduğu belirlenmiştir.

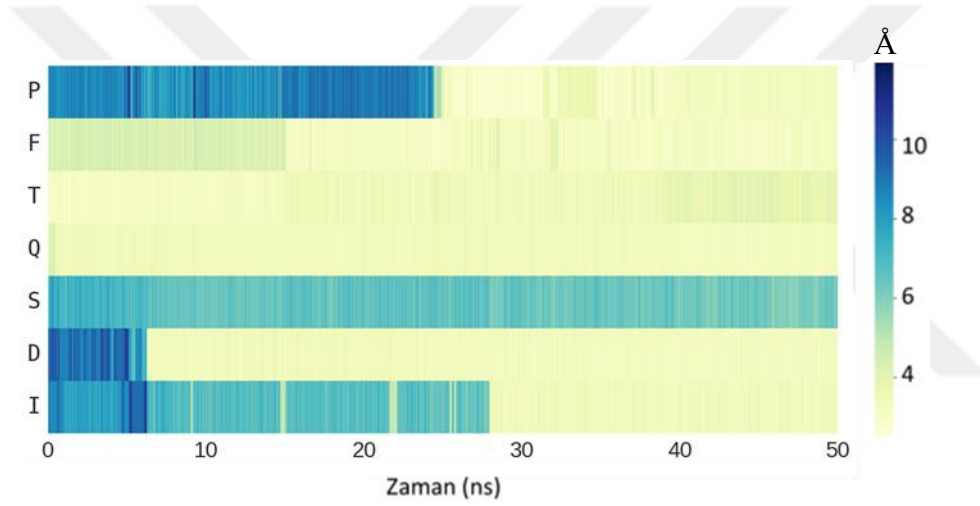


Şekil 3.24: Tas-2 (toplam atom sayısı: 110) atomlarının, Au {111}-yüzeyine 5 Å mesafeden daha yakın olanlarının sayısının zamana göre değişimi.

Yapısal analizler için ayrıca, peptitleri oluşturan amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları hesaplanmış ve zamana göre değişimleri Tas-1 ve Tas-2 peptitleri için sırasıyla Şekiller 3.25 ve 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.25: Tas-1'in yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}-yüzeyine olan uzaklıkları (Å).



Şekil 3.26: Tas-2'nin yapısındaki amino asitlerin kütle merkezlerinin Au {111}- yüzeyine olan uzaklıkları (Å).

Bu şekiller peptitlerin her bir amino asitinin zamanla Au {111}-yüzeyine bağlanma sürecini de göstermektedir.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, peptitlerin altın {111}-yüzeyi ile etkileşimleri ve bağlanma mekanizmaları incelenmiştir. Literatürde altına iyi bağlandığı deneysel olarak gösterilmiş AuBP1, AuBP2 ve GBP peptitlerinin moleküler dinamik simülasyonları ve bu simülasyonların analizleri yapılmıştır. Bu peptitlerin hangi amino asitlerden yüzeye bağlandığı irdelenmiştir. Aynı zamanda geliştirilen ekleme metoduyla 7 amino aside sahip peptitler tasarlanmıştır. Tasarlanan peptitlerin moleküler dinamik simülasyonları yapılmıştır.

Sonuç olarak, literatürde altına iyi bağlandığı bilinen peptitlerin her birinin moleküler dinamik simülasyonlarında zaman geçtikçe daha kararlı yapılar ulaştığı gözlenmiştir. AuBP1 ve AuBP2 peptitleri yaklaşık 5 ns'de kararlı yapılarına geçerken, GBP peptiti hızla yüzeye uyum sağlamış ancak yapı zaman içerisinde yavaş yavaş değişikliğe uğrayarak 75. ns sonunda kararlı bir yapıya ulaşmıştır. Bunun sebebi GBP peptitinin görece daha fazla amino aside sahip olması ve minimizasyon sürecinin vakum ortamında yapılmasından dolayı genel minimaya diğer peptitlere oranla daha az yaklaşması olabilir. Sonuç olarak, her bir peptit simülasyon sonunda kararlı yapıya ulaşmıştır ve bu yapılardaki altın yüzeyine bağlanan amino asitler elde edilmiştir. Bu amino asitlerin aynı peptitler ile yapılmış diğer simülasyon çalışmaları ile uyumluluk gösterdiği belirlenmiştir: Bu amino asitler, Tang ve diğerlerinin çalışmasıyla karşılaştırıldığında her iki çalışmada da AuBP1'deki 4. (alanin, A), 6. (arjinin, R), 10. ve 11. (arjinin, R) amino asitlerinin altın {111}-yüzeyine bağlandığı görülmüştür. AuBP2 peptitinde ise ortak olan amino asitler 1. (triptofan, W), 4. (arjinin, A), 12. (tyrosin, Y)'dir. GBP'de ortak olan amino asitler ise 1. (metiyonin, M), 2. (histidin, H) ve 6. (glutamin, Q) amino asitleridir.

Yedi amino asit uzunluğunda bir sekans tasarlamak için, 20 amino asit kullanılarak, normalde 1 milyar 280 milyon simülasyon yapılması gerekirken bu sayı tez çalışmasında uygulanan metot ile 240 simülasyona düşürülmüştür. Tasarlanan Tas-1

ve Tas-2 peptitlerinin arasından altın (111) yüzeyine ortak olarak bağlanan amino asitler (prolin, P), 2. (fenilalanin, F), 3. (treonin, T) amino asitleridir. Bu amino asitler arasından fenilalanin varlığı literatürle korelasyon içindedir. Vera ve diğerleri fenilalaninin altın yüzeyine bağlanmada etkili olduğunu göstermişlerdir.

Gelecek çalışması olarak, bu çalışmada geliştirilen ekleme metodu, daha fazla amino asit sayısına sahip peptitlerin altın yüzeyine bağlanması için uygulanabileceği gibi farklı inorganik yüzeyler için de kullanılabilir. Bu metot eş zamanlı olarak bir malzemeye (örneğin altın) bağlanan ama başka bir malzemeye bağlanmayan (örneğin silika) dolayısı ile malzemeye spesifik peptitlerin tasarımı için de kullanılabilir.

Bu çalışmada tasarlanan peptitlerin ya da tasarım metodunun geliştirilmesi ile ilerlendiğinde biyogörüntüleme, biyosensörler, kanser tedavisi ve ilaç taşınımı gibi pratik uygulamalarda kullanılacak olası uygun peptitlerin kullanılması sağlanabilir.



## KAYNAKLAR

- Allinger, N. L.** (1977). Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. of the Am. Chem. Soc.*, 99(25), 8127–8134.
- Ball, P.** (2001). Life's lessons in design. *Nature*, 409, 413–16.
- Borrel, A.** (2016). Development of computational methods to predict protein pocket druggability and profile ligands using structural data. Ph. D. Thesis, University Paris Diderot.
- Boyer, D.** (2002). Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297(5584), 1160–1163.
- Branden, C.-I., Tooze, J.** Introduction to Protein Structure, 2<sup>nd</sup> Edition, (Garland, New York, 1999).
- Braun, R., Sarikaya, M., Schulten, K.** (2002). Genetically engineered gold-binding polypeptides: structure prediction and molecular dynamics. *J. of Biomater. Sci., Polymer Edition*, 13(7), 747–757.
- Brown, S.** (1997). Metal-recognition by repeating polypeptides, *Nat. Biotechnol.*, 15, 269-272.
- Brown, S., Sarikaya, M., Johnson, E.** (2000). A genetic analysis of crystal growth 1 Edited by M. Gottesman. *J. of Mol. Biology*, 299(3), 725–735.
- Cariolou, M. A., Morse, D. E.** (1988) Purification and characterization of calciumbinding conchiolin shell peptides from the mollusk, *Haliotis-rufescens*, as a function of development. *J. Comp. Physiol. B* 157, 717–729.
- Carvalho, F. A., Santos, N. C.** (2012). Atomic force microscopy-based force spectroscopy - biological and biomedical applications. *IUBMB Life*, 64(6), 465–472.
- Castner, D. G., Ratner, B. D.** (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*, 500(1-3), 28–60.
- Choi, Y., Ho, N.-H., Tung, C.-H.** (2007). Sensing phosphatase activity by using gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(5), 707–709.
- Cobley, C. M., Chen, J., Cho, E. C., Wang, L. V., Xia, Y.** (2011). Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, 40(1), 44–56.

- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Kollman, P. A.** (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. of the Am. Chem. Soc.*, 117(19), 5179–5197.
- De la Rica, R., Matsui, H.** (2010). Applications of peptide and protein-based materials in bionanotechnology. *Chem. Soc. Rev.*, 39(9), 3499.
- Evans, J. S., Samudrala, R., Walsh, T. R., Oren, E. E., Tamerler, C.** (2008). Molecular design of inorganic-binding polypeptides. *MRS Bulletin*, 33(05), 514–518.
- Fernandez-Fernandez, A., Manchanda, R., McGoron, A. J.** (2011). Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, Image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Appl. Biochem. and Biotech.*, 165(7-8), 1628–1651.
- Guo, J., Yao, X., Ning, L., Wang, Q., Liu, H.** (2014). The adsorption mechanism and induced conformational changes of three typical proteins with different secondary structural features on graphene. *RSC Advances*, 4(20), 9953.
- Gaskin, D. J. H., Strack, K., Vulfson, E. N.** 2000. Identification of inorganic crystal-specific sequences using phage display combinatorial library of short peptides: a feasibility study. *Biotech. Lett.* 22:1211–16
- Gromiha, M. M.** (2010). Proteins. *Protein Bioinformatics*, 1–27.
- Heinz, H., Lin, T.-J., Kishore Mishra, R., Emami, F. S.** (2013). Thermodynamically consistent force fields for the assembly of inorganic, organic, and biological nanostructures: The INTERFACE force field. *Langmuir*, 29(6), 1754–1765.
- Hnilova, M., Oren, E. E., Seker, U. O. S., Wilson, B. R., Collino, S., Evans, J. S., ... Sarikaya, M.** (2008). Effect of molecular conformations on the Adsorption behavior of gold-binding peptides. *Langmuir*, 24(21), 12440–12445.
- Hoess, R. H.** (2001) Protein design and phage display. *Chem. Rev.*, 101, 3205–3218.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.** (1996). VMD-visual molecular dynamics, *J. Molec. Graphics*, 14, 33-38.
- HyperChem™ Professional 7.51, (2003)., HyperChem 7.5 Edition., Hypercube Ltd.; Wiley, Gainesville, FL; U.S.A.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., Klein, M. L.** (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The J. of Chem. Phys.*, 79(2), 926–935.
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., Tirado-Rives, J.** (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. of the Am. Chem. Soc.*, 118(45), 11225–11236.

- Kim, J., Rheem, Y., Yoo, B., Chong, Y., Bozhilov, K. N., Kim, D., ... Myung, N. V.** (2010). Peptide-mediated shape- and size-tunable synthesis of gold nanostructures. *Acta Biomaterialia*, 6(7), 2681–2689.
- Kröger, N.** (1999). Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286, 1129–1132.
- Lee, W. S., Mao, C., Flynn, C.E., Belcher, A. M.** 2002. Ordering quantum dots using genetically engineered viruses. *Science* 296. 892–95
- Lewars, E. G.** Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics, 2<sup>nd</sup> Edition, (Springer, New York, 2011).
- Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M.** (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105(4), 1103–1170.
- Ma, M., Guo, L., Anderson, D. G., Langer, R.** (2013). Bio-inspired polymer composite actuator and generator driven by water gradients. *Science*, 339(6116), 186–189.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Karplus, M.** (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3586–3616.
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., Simmerling, C.** (2015) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8), 3696–3713.
- Mann, S.** (1988) Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332,119–124.
- Naik, R. R., Brott, L., Carlson, S. J., Stone, M. O.** 2002. Silica precipitating peptides isolated from a combinatorial phage display libraries. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2:95–100.
- Naik R. R., Stringer S. J., Agarwal G., Jones S. E., Stone M. O.** (2002) Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nat. Mater.* 1, 169–72.
- Niemeyer, C. M.** (2001). Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (22), 4128–4158.
- Nochomovitz, R., Amit, M., Matmor, M., Ashkenasy, N.** (2010) Bioassisted multi-nanoparticle patterning using single-layer peptide templates. *Nanotechnology*, 21, 1-7.
- Nam, Y. S., Magyar, A. P., Lee, D., Kim, J.-W., Yun, D. S., Park, H., ... Belcher, A. M.** (2010). Biologically templated photocatalytic nanostructures for sustained light-driven water oxidation. *Nature Nanotechnology*, 5(5), 340–344.

- Oren, E. E., Tamerler, C., Sarikaya, M.** (2005). Metal recognition of septapeptides via polypod molecular architecture. *Nano Letters*, 5(3), 415–419.
- Oren, E. E., Tamerler, C., Sahin, D., Hnilova, M., Seker, U. O. S., Sarikaya, M., Samudrala, R.** (2007). A novel knowledge-based approach to design inorganic-binding peptides. *Bioinformatics*, 23(21), 2816–2822.
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., Van Gunsteren, W. F.** (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. of Comp. Chem.*, 25(13), 1656–1676.
- Park, T. J., Lee, S. Y., Lee, S. J., Park, J. P., Yang, K. S., Lee, K.-B., ... Choi, I. S.** (2006). Protein nanopatterns and biosensors using gold binding polypeptide as a fusion partner. *Analytical Chemistry*, 78 (20), 7197–7205.
- Park, T. J., Zheng, S., Kang, Y. J., Lee, S. Y.** (2009) Development of a whole-cell biosensor by cell surface display of a gold-binding polypeptide on the gold surface. *FEMS Microbiol. Lett.*, 293, 141-147.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K.** (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 26, 1781– 1802
- Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., Chidsey, C. E. D.** (1987). Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. of the Am. Chem. Soc.*, 109(12), 3559–3568.
- Reece, J. B., Hogan, K., Simon, E. J, Dickey, J. L., Taylor, M. R., Campbell, N. A.** Campbell biology concepts & connections. 9<sup>th</sup> Edition (Pearson, New York, 2015).
- Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K.-Y., Schulten, K., Baneyx, F.** (2003). Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials*, 2(9), 577–585.
- Sarikaya, M., Tamerler, C., Schwartz, D. T., Baneyx, F.** (2004) *Annu. Rev. Mater. Res.*, 34, 377.
- Schneider, G., ve Wrede, P.** (1998) Artificial neural networks for computer-based molecular design. *Biophys. Mol. Biol.* 70, 175–222.
- Seeman, N. C., Belcher, A. M.** (2002). Emulating biology: Building nanostructures from the bottom up. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(Supplement 2), 6451–6455.
- Slocik, J. M., Stone, M. O., Naik, R. R.** (2005). Synthesis of gold nanoparticles using multifunctional peptides. *Small*, 1(11), 1048–1052.
- Smith, G.** (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315–1317.

- Soh, N.** (2003). A surface plasmon resonance immunosensor for detecting a dioxin precursor using a gold binding polypeptide. *Talanta*, 60(4), 733–745.
- Subramani, K., Khraisat, A., George, A.** (2008). Self-assembly of proteins and peptides and their applications in bionanotechnology. *Current Nanoscience*, 4(2), 201–207.
- Tamerler, C., Sarikaya, M.** (2009). Genetically designed peptide-based molecular materials. *ACS Nano*, 3(7), 1606–1615.
- Tamerler, C. (a), Duman, M., Oren, E. E., Gungormus, M., Xiong, X., Kacar, T., ... Sarikaya, M.** (2006). Materials specificity and directed assembly of a gold-binding peptide. *Small*, 2(11), 1372–1378.
- Tamerler, C., Khatayevich, D., Gungormus, M., Kacar, T., Oren, E. E., Hnilova, M., Sarikaya, M.** (2010). Molecular biomimetics: GEPI-based biological routes to technology. *Biopolymers*, 94(1), 78–94.
- Tamerler, C. (b), Oren, E. E., Duman, M., Venkatasubramanian, E., Sarikaya, M.** (2006). Adsorption kinetics of an engineered gold binding peptide by surface plasmon resonance spectroscopy and a quartz crystal microbalance. *Langmuir*, 22(18), 7712–7718.
- Tang, Z., Palafox-Hernandez, J. P., Law, W.-C., Hughes, Z. E., Swihart, M. T., Prasad, P. N., ... Walsh, T. R.** (2013). Biomolecular recognition principles for bionanocombinatorics: An integrated approach to elucidate enthalpic and entropic factors. *ACS Nano*, 7(11), 9632–9646.
- Thai C. K., Dai H, Sastry M. S. R., Sarikaya M., Schwartz T., Baneyx F.** 2004. Identification and characterization of Cu<sub>2</sub>O and ZnO binding polypeptides by Escherichia coli cell surface display: towards an understanding of metal oxide binding. *J. Biotech. Bioeng.* 87(2), 129–37.
- Umetsu, M., Mizuta, M., Tsumoto, K., Ohara, S., Takami, S., Watanabe, H., ... Adschiri, T.** (2005). Bioassisted room-temperature immobilization and mineralization of Zinc Oxide—The structural ordering of ZnO Nanoparticles into a Flower-Type Morphology. *Adv. Mater.*, 17(21), 2571–2575.
- Verde, A. V., Acres, J. M., Maranas, J. K.** (2009). Investigating the specificity of peptide adsorption on gold using molecular dynamics simulations. *Biomacromolecules*, 10(8), 2118–2128.
- Vera, A. M., Cárcamo, J. J., Aliaga, A. E., Gómez-Jeria, J. S., Kogan, M. J., Campos-Vallette, M. M.** (2015). Interaction of the CLPFFD peptide with gold nanospheres. A Raman, surface enhanced Raman scattering and theoretical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 251–256.

- Whaley S. R., English D. S., Hu E. L., Barbara P. F., Belcher A. M.** 2000. Selection of peptides with semiconducting binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature* 405:665–68
- Willett, R. L., Baldwin, K. W., West, K. W., Pfeiffer, L. N.** (2005). Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 7817–7822.
- Wittrup, K. D.** (2001). Protein engineering by cell-surface display. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(4), 395–399.
- Yu, J., Becker, M. L., Carri, G. A.** (2011). The influence of amino acid sequence and functionality on the binding process of peptides onto gold surfaces. *Langmuir*, 28(2), 1408–1417. doi:10.1021/la204109r
- Zhang, S.** (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1171–1178.
- Zhang, W., Xi, J., Zhang, Y., Su, Z., Wei, G.** (2017). Green synthesis and fabrication of an electrochemical and colorimetric sensor based on self-assembled peptide-Au nanofibril architecture. *Arabian Journal of Chemistry*.