





**AMİLOİD A $\beta$  YAPILARININ MOLEKÜLER DİNAMİK  
SİMÜLASYONLARI**

**MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF AMYLOID  
A $\beta$  STRUCTURES**

**RECEP KESKİN**

**DOÇ. DR MEHMET DİLAVER**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak hazırlanmıştır.

2023



**RECEP KESKİN**'inin hazırladığı “**AMİLOİD Aβ YAPILARININ MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **FİZİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şahin UYAYER

Başkan .....

Doç. Dr. Mehmet DİLAVER

Danışman .....

Prof. Dr. Fatih YAŞAR

Üye .....

Prof. Dr. Mustafa POLAT

Üye .....

Doç. Dr. Aytaç ERKİŞİ

Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak ..... / ..... /..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

\_\_\_ / \_\_\_ / 20

RECEP KESKİN





## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

..... / ..... / .....

(İmza)

RECEP KESKİN



## ÖZET

# AMİLOİD A $\beta$ YAPILARININ MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI

**Recep KESKİN**

**Yüksek Lisans, Fizik Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet DİLAVER**

**Haziran 2023, 93 sayfa**

Amiloid- $\beta$  izoformlarından olan A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 fibrillerinin varlığı ve birbirleri ile etkileşimleri Alzheimer hastalığının patolojik özelliklerin biridir. Birçok klinik vaka çalışmasında, SARS-COV-2 virüsü Alzheimer hastalığının seyrini kötüleştirdiği ve ölüm oranlarının artmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Araştırmamızın odak noktası, SARS-COV-2 virüsünün amiloidojenik Ser<sup>55</sup>PheTyrValTyrSerArgValLys<sup>63</sup> (SK9) peptiti varlığında A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 proteinlerinin 1:1 oranda çapraz tohumlanmasıyla elde edilen heterojen (A $\beta$ 40/A $\beta$ 42) ve homojen (A $\beta$ 40) fibril modellerinin kararlılıklarının nasıl etkilendiğini incelemek olmuştur. Gerçekleştirdiğimiz simülasyonlar neticesinde, SARS-COV-2 virüsü varlığı altında heterojen fibril modelinin ile homojen fibril modeline kararlılıkları arasında anlamlı sayılabilecek farklılıklar gözlemlenmemiştir. Ancak, heterojen fibril modelinin merkezi hidrofobik bölgesinin karboksil ucu hidrofobik bölgesinin rezidüleriyle homojen fibril modeline göre daha fazla etkileşim içinde olduğu görülmüştür (yayınlanmamış veri).

**Anahtar Kelimeler:** Moleküler Dinamik, Moleküler Kenetleme, Alzheimer, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40/A $\beta$ 42, SARS-COV-2

## **ABSTRACT**

# **MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF AMYLOID A $\beta$ STRUCTURES**

**Recep KESKİN**

**Master of Science, Department of Physics Engineering**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet DİLAVER**

**June 2023, 93 pages**

The existence of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42, their aggregates, and their interaction are some pathological characteristics of Alzheimer's disease. Numerous clinical case studies throughout the COVID-19 pandemic revealed that the SARS-COV-2 causes aggravate the course of Alzheimer's disease and upsurge mortality rates. The investigation element of our study is to probe how the stability of the homogeneous (A $\beta$ 40) fibril model and 1:1 cross-seeded A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 fibrils of the heterogeneous (A $\beta$ 40/A $\beta$ 42) fibril model are impressed by the presence of the amyloidogenic Ser<sup>55</sup>PheTyrValTyrSerArgValLys<sup>63</sup> (SK9) peptide of the SARS-COV-2 E-protein (envelope protein). Our analysis demonstrated that there are no prominent dissimilarities between the stability of the heterogeneous and the homogeneous fibril model. However, we observed the central hydrophobic region of the heterogeneous fibril model interacts more with the residues of the carboxyl-terminal hydrophobic region (unpublished data).

**Keywords:** Molecular Dynamics, Molecular Docking, Alzheimer, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40/A $\beta$ 42, SARS-COV-2

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başlangıcında benim için bir kapı aralayıp yol gösteren ve çalışma süresince gelişimimi dikkatlice takip eden, değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Dilaver' sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Özellikle belirtmek isterim ki Karmaşık Sistemler Simülasyon Grubu'nun lideri, Kuramsal ve Hesaplamalı Fizik Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih Yaşar, bütün bu serüven boyunca yanımda olduğu, görüşlerine ve yardımına gereksinim duyduğum zamanlarda kıymetli vaktini bir an bile esirgemedi, ihtiyaç duyduğum tüm imkanları fazlasıyla sağlayarak üzerime büyük ölçüde emek harcadı, ufkumu genişlettiği için kendisine içtenlikle teőekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca beni anlayışla karşılan, maddi ve manevi olarak destek sağlamış değerli aileme teşekkür ederim.

Bu tez alışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Fonu tarafından desteklenen FBA-2021-19028 ve FAY-2022-20007 numaralı projeler kapsamında yapılmıştır.

Saygılarımı sunarım...





# İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. Yanlış Katlanmış Proteinler .....	7
2.1. Kendiliğinden Düzensiz Proteinler .....	7
2.2. Yanlış Katlanmış Proteinler.....	8
2.2.1. Amiloid- $\beta$ ( $A\beta$ ).....	9
2.2.2. $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ Syn) .....	10
2.2.3. Tau Protein .....	11
2.2.4. PrP Protein.....	12
2.3. Protein Kümeleşmesi .....	12
2.4. Amiloidler.....	13
2.4.1. Amiloid Yapısı .....	14
2.4.2. Oluşum Mekanizması.....	15
2.4.3. Tohumlanma ve Çapraz-Tohumlanma .....	15
2.4.4. Amiloidlerde Simetri .....	16
3. Moleküler Modelleme.....	19
3.1. Moleküler Modellemede Sınır Koşulları .....	19
3.2. Moleküler Modellemede Kuvvet Alanları.....	20
3.3. Moleküler Modellemede Su Modelleri.....	22
3.4. Moleküler Kenetleme Simülasyonu.....	24
3.4.1. Arama Algoritması .....	26

3.4.2.	Puanlama Fonksiyonları.....	31
3.4.3.	AutoDock Vina Moleküler Kenetleme Yazılımı .....	33
3.5.	Moleküler Dinamik Simülasyonu .....	36
3.5.1.	Moleküler Dinamikte İstatiksel Kümeler.....	38
3.5.2.	İntegrasyon Algoritmaları .....	38
3.5.3.	Enerji Minimizasyon Algoritması.....	41
3.5.4.	Sıcaklık Çiftlenimi Algoritmaları .....	42
3.5.5.	Basınç Çiftlenimi Algoritmaları.....	45
3.5.6.	Kısıtlama Algoritmaları .....	47
3.5.7.	GROMACS Yazılım Paketi .....	49
4.	Simülasyon Çalışması.....	51
4.1.	Bileşenlerinin Temini .....	51
4.2.	Sistem Hazırlığı.....	52
4.3.	Moleküler Dinaamik Simülasyonu Protokolü.....	53
4.4.	Kullanılan Yazılımlar .....	54
4.5.	Sonuçlar ve Tartışma.....	55
5.	Yorum.....	67
6.	KAYNAKLAR.....	71
	ÖZGEÇMİŞ.....	93

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 A $\beta$ oluşum mekanizması[41].....	10
Şekil 2.2 $\alpha$ -sinüklein monomerinin şematik gösterimi[44]. .....	11
Şekil 2.3 Polipeptit zinciri biyosentezi şematik gösterimi[49]. .....	13
Şekil 2.4 Çekirdeklenmeye bağlı polimerizasyon mekanizması[56].....	15
Şekil 2.5 Tohumlama ve çapraz tohumlama fenomeni[57].....	16
Şekil 2.6 Amiloidlerde simetri[59]. .....	17
Şekil 3.1 İki boyutlu periyodik sistemde sınır koşulları. ....	19
Şekil 3.2 Su modellerinin şematik gösterimi. ....	23
Şekil 3.3 Moleküler kenetleme temel protokolü.....	25
Şekil 3.4 Tipik bir MD simülasyonu protokolü. ....	36
Şekil 4.1 NMR yapılarından elde edilen fibril modelleri: a) heterojen ve b) homojen fibril modeli. ....	51
Şekil 4.2 a) SARS-COV-2 zarf proteini. Sarı rengine boyanmış bölgeler SK9 peptidini temsil eder. (b) Çubuk gösterimiyle SK9 peptidi ve rezidüleri. ....	52
Şekil 4.3 a) 6TI7-SK9 kompleks sistemi ve b) 6TI5-SK9 kompleks sistemi.....	56
Şekil 4.4 Üç örnekli zamana göre global RMSD grafikleri: a) heterojen fibril modeli ve b) homojen fibril modeli. ....	57
Şekil 4.5 Zincir çiftlerinin zamana göre lokal RMSD grafikleri: a) heterojen fibril modeli ve b) homojen fibril modeli. ....	58
Şekil 4.6 Bireysel zincirlerin zamana göre lokal RMSD grafikleri: a) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri, b) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 zincirleri ve c) homojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri.....	58
Şekil 4.7 Rezidüye göre RMSF grafikleri: a) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri b) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 zincirleri, c) homojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri.....	60
Şekil 4.8 Rezidüye göre zincirler arası (istiflenme) temas olasılığı haritası: a) heterojen fibril modeli ve b) homojen fibril modeli. ....	65

Şekil 4.9 Rezidüye göre rezidü içi temas olasılığı haritası: a) heterojen fibril modeli A $\beta$ 40 zincirleri b) heterojen fibril modeli A $\beta$ 42 zincirleri ve c) homojen fibril modeli A $\beta$ 40 zincirleri .....66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Heterojen ve homojen fibril modellerinin SK9 ile bağlanma ilginlikleri....	55
Çizelge 4.2 Heterojen ve homojen fibrillerinin istiflenme serbest enerjileri. ....	61
Çizelge 4.3 Heterojen ve homojen fibrillerinin paketlenme serbest enerjileri.....	62
Çizelge 4.4 SASA, hidrojen-bağı sayısı ve % $\beta$ -yaprağı analizleri.....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\Delta$	Delta
Å	Angström
T	Sıcaklık
P	Basınç
r	Konum
v	Hız
p	Momentum
$\mu$	Kimyasal Potansiyel

### Kısaltmalar

AD	Alzheimer Hastalığı
PD	Parkinson Hastalığı
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
APP	Amiloid Öncü Proteini
APPs $\beta$	Amiloid Öncü Proteini $\beta$ Bölgesi
APPs $\alpha$	Amiloid Öncü Proteini $\alpha$ Bölgesi
AICD	Amiloid Hücre İçi Bölgesi

NAC	Amiloidojenik Olmayan Bileşen
AMP	Antimikrobiyal Peptit
PMD	Yanlış Katlanmış Protein Hastalıkları
PQC	Protein Kalite Kontrolü
IDP	Kendiliğinden Düzensiz Proteinler
IDPR	Kendiliğinden Düzensiz Protein Bölgeleri
A $\beta$	Amiloid- $\beta$
$\alpha$ Syn	alfa-sinüklein
PrP	Enfeksiyöz Proteinli Partiküller
MD	Moleküler Dinamik
MT	Mikrotübül
FTD	Frontotemporal Demans
TSE	Süngerimsi Ensefalopatiler
NDP	Çekirdeklenmeye Bağlı Polimerizasyon
ff	Kuvvet Alanı
LJ	Lennard-Jones
TIP3P	3 Nokta ile Aktarılabılır Moleküller Arası Potansiyel
TIP4P	4 Nokta ile Aktarılabılır Moleküller Arası Potansiyel
SPC	Basit Nokta Yüğü
SPC/E	Genişletilmiş Basit Nokta Yüğü
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
GA	Genetik Algoritma
LGA	Lamarckian Genetik Algoritması
TS	Tabu Arama
PSO	Parçacık Sürü Optimizasyonu

SA	Benzetilmiş Tavlama
EM	Enerji Minimizasyonu
NVE	Mikrokanonik Küme
NVT	Kanonik Küme
NPT	İzobarik İzotermik Küme
PDB	Protein Veri Bankası
2F8L	2 Katlı 8 Katmanlı
SK9	Ser <sup>55</sup> PheTyrValTyrSerArgValLys <sup>63</sup>
CPU	Merkezi İşlem Birimi
GPU	Grafik İşlem Birimi
GNU	GNU Unix Değildir
GPL	Genel Kamu Lisansı
nm	nanometre
µm	mikrometre
ps	pikosaniye
fs	femtosaniye



# 1. GİRİŞ

Nöronlar, beyin ve omuriliği içeren merkezi sinir sisteminin işleyişinin temel mekanizmasında yer alan; bilişsel, iletişim, hareket gibi becerilerde kritik rollere sahip olan sinir hücrelerdir. Bebeklik döneminde sinir kök hücreler tarafından üretilen sinir hücrelerinin sayıları yetişkinlikte yaşlanmanın etkisiyle giderek azılır. Ayrıca, sinir hücrelerinin yapısının veya işlevlerinin bozulması oldukça önemli sağlık sorunlarına sebep olur. Birçok nörodejeneratif hastalıkta yer alan nörodejenerasyon, sinir hücrelerinin yapısı veya fonksiyonlarının ilerleyici kaybını içeren bir süreçtir[1].

Bu hastalıklar, yanlış katlanmış proteinler ve kümeleriyle patolojik ve klinik olarak ise, sinir hücrelerinin fonksiyonel bozuklukları, sinaptik bağlantıların kaybı ve beyin hasarı ile karakterize edilirler[2]. Protein kümeleşme hastalıkları, yanlış katlanmış proteinlerin çeşitli organlarda birikmesi sonucu fonksiyonel bozukluklara neden olduğu hastalıklardır[3].

$\beta$ -yaprağı yapısındaki amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) fibrilleri, beyinde varlık göstermesi ve kümeleşmesi (agregasyonu) Alzheimer hastalığına (AD) sebep olur. Amiloid- $\beta$ ' ların biri 40 rezidülü  $A\beta_{40}$  diğeri ise  $A\beta_{40}$ 'ın karboksil ucunda fazladan Ile<sup>41</sup> ve Ala<sup>42</sup> amino asitlerini bulunduran 42 rezidüye sahip  $A\beta_{42}$  isimli iki izoformu vardır.  $A\beta$  peptidi, amiloid öncü proteinin “*Amyloid Precursor Protein*” (APP) sıralı proteolizi sonucu meydana gelir[4]. APP'nin önce  $\beta$ -sekretaz ardından  $\gamma$ -sekretaz aracılığıyla sıralı proteolitik bölünmesinden iki farklı  $A\beta$  izoformları oluşur[5]. Bu iki izoformun aralarında bulunan büyük ölçüdeki benzerliğe rağmen  $A\beta_{42}$  kümeleşmeye daha yatkın ve zehirli (toksik) olduğu bulunmuştur[6].

AD hakkında daha detaylı bilgiler elde etmek adına,  $A\beta$  proteinin diğer proteinler ve ligandlar ile etkileşimlerinin ne şekilde olduğu, hangi koşullar altında kararlılığı, kümeleşmesi ve toksisitesinin değiştiğinin irdelenmesi oldukça önemlidir.  $A\beta$  fibril ve monomerlerinin yapısı, kümeleşmesi ve diğer proteinlerle etkileşimlerinin, hücrel ve

moleküler mekanizmaları üzerine geçtiğimiz on yıllarda ve günümüzde birçok bilimsel çalışma yapılmıştır[6–14].

2019 yılında başlayan SARS-COV-2 (şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2) virüsü kaynaklı COVID-19 (koronavirüs hastalığı 2019) salgını, dünya çapında milyonlarca insanın sağlığını büyük ölçüde etkilemiş ve ölüme sebep olmuştur. SARS-COV-2 virüsünün solunum yolu hastalığına sebep olması yanı sıra, koku, tat kaybı ve diğer nörolojik bozukluklara da neden olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, uzun vade de ortaya çıkabilecek potansiyel nörolojik etkileri hakkında henüz yeterli bilgi mevcut değildir. Son araştırmalar, COVID-19' un AD'nin seyrini kötüleştirdiği ve ölüm oranlarında artışa sebep olduğu göstermiştir[15–18].

Alzheimer hastalığının patofizyolojik mekanizmasında yer alan “sitokin fırtınası” olarak da bilinen sistemik enflamasyon, şiddetli COVID-19 vakalarında da görülmüştür. Sistemik enflamasyon, kan beyin bariyerinin bozulmasına, sinir ve gliyal hücrelerinde hasar yaratarak uzun vadeli komplikasyonlara neden olur. Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin salınması, mikrogliyal hücrelerinin amiloid- $\beta$  parçacıklarını temizleme kapasitesini azaltarak amiloid kümeleşmesini artırır.

Virüsün neden olduğu sistemik enflamasyon, kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bu nedenle, merkezi sinir sistemine erişen enflamasyon araçları beyinde sinir iltihabı ve nörodejenerasyonun şiddetlenmesini artırır[19]. Soscia vd.[20], yapmış olduğu in vivo (canlı organizma içinde) çalışmada elde ettikleri bulgulara göre, A $\beta$ 'nin insan antimikrobiyal proteinin (AMP) LL-37'ye eş değer antimikrobiyal aktivite gösterdiği sonucuna varmıştır.

Buna ek olarak AD olan beyin, olmayan örneklere göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediğini bildirmiştir. SARS-COV-2 virüsünün A $\beta$  kümeleşmesi, kararlılığı ve toksikliği üzerinde nasıl etkisi olduğunun kapsamlı bir şekilde araştırılması bu ilişkinin çözülmesinde oldukça önemli olacaktır.

Moleküler dinamik (MD) simülasyonu, proteinlerin yapılarını, dinamiklerini ve fonksiyonlarını moleküler düzeyde incelemek için bilimsel araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılan güçlü bir hesaplamalı yöntemdir.

MD simülasyonları çıktısı temel analizlerle birlikte bağlanma enerjisi, temas olasılığı haritası (contact map) vb. gibi yöntemlerle analiz edilerek; protein yapısı, protein katlanması, protein-protein ve protein-ligand etkileşimleri incelenir.

MD simülasyonu, Newton'un hareket yasalarını kullanarak moleküllerin zamana göre davranışlarını modellemek için kullanılan bir hesaplamalı yöntemdir. MD simülasyonlarında atomlar arası etkileşimler "kuvvet alanı" olarak bilinen potansiyel enerji fonksiyonları ile tanımlanır. Simülasyonda her adımda her bir atom üzerine, tanımlanmış potansiyel enerji fonksiyonundan kaynaklı kuvvetler etki eder. Bu kuvvetlerin zamana göre integrasyonundan atomların konum ve hızları belirlenir ve sistemin yörüngesi tanımlanır. Ardından elde edilen yörünge analiz edilerek sistemin davranışı incelenir. Birçok algoritma, simülasyon adımları gerçekleştirmek ve çıktıyı analiz etmek adına sayısal yöntemlerden ve istatistik biliminden yararlanarak geliştirilmiştir.

MD simülasyonlarının etkili çözüm kabiliyetleri, Alzheimer hastalığı gibi birçok nörodejeneratif hastalığın protein kümeleşme mekanizması hakkında literatüre oldukça önemli katkılar sunmuştur. Kullanılan algoritmalar geliştirildikçe, hesaplama kapasiteleri ve hızları arttıkça hastalıklar hakkında daha da gerçekçi öngörüler ve etkili tedavi edici stratejilerin geliştirilmesi kaçınılmaz olacaktır.

Bu tez çalışmasında SARS-COV-2 virüsünün Alzheimer hastalığını seyri üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu anlamak adına, SARS-COV-2 virüsünün zarf proteinin karboksil ucunda bulunan dokuz rezidüden oluşan amiloidojenik peptidi SK9'un (Ser<sup>55</sup>PheTyrValTyrSerArgValLys<sup>63</sup>), Aβ yapılarının kararlılığını ne ölçüde etkilediği incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, homojen Aβ40 ve Aβ42 proteinlerinin 1:1 oranında çapraz tohumlanmasıyla oluşturulan 6TI7[21] Protein Veri bankası (PDB)

kimlik numaralı heterojen A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 ile PDB kimlik numarası: 6TI5[21] olan homojen A $\beta$ 40 fibril modelleri seçilmiştir.

SARS-COV-2 peptidi, Michigan Eyalet Üniversitesi FEIG Hesaplamalı Biyofizik Laboratuvarı tarafından yapısı çözülen SARS-COV-2 zarf proteini <https://github.com/feiglab> adresinden temin edilmiştir. Başlangıç konformasyonlarını elde etmek adına SK9 peptidi, heterojen ve homojen fibril modelleri ile AutoDock Vina[22,23] yazılımı kullanılarak moleküler kenetleme yöntemiyle kenetlenmiştir. Elde edilen başlangıç konformasyonu ve CHARMM36m[24] kuvvet alanı ile GROMACS-2022.2 [25] yazılım paketi kullanılarak örnekleme sayısı 3 olarak belirlediğimiz MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasının temelinde yatan problem ve çözüm yaklaşımı, bu bölümde genel bir çerçeve ile sunulmuştur. Çalışma kapsamında problem ve çözümü anlamak adına ihtiyaç olan temel bilgiler, simülasyon hazırlığı, sonuçlar ve yorum aşağıda belirtildiği sırada sunulmuştur.

Tez çalışmasında belirlenen problemi anlamak adına ikinci bölüm oldukça önemlidir. Bu bölümde, yanlış katlanmış proteinler ve amiloidler üzerine yoğunlaşmış ve Alzheimer hastalığına yol açan A $\beta$  proteini ile birlikte diğer nörolojik hastalıklara neden olan yanlış katlanmış proteinler hakkında detaylı bilgiler verilmiştir.

Tez çalışmasında belirlenen problemin çözümü için başvuru moleküler modelleme yöntemleri hakkında detaylı bilgiler çalışmanın üçüncü bölümünde ele alınmıştır. Bu bölümün odak noktası, moleküler kenetleme ve dinamik simülasyonlarının ne olduğu ve simülasyonlarda kullanılan algoritmalar olmuştur.

Modellemenin başarılı olmasında etkili olan sınır koşulları, kuvvet alanları ve su modelleri hakkında birtakım bilgiler üçüncü bölümün ilk üç alt başlığında verilmiştir.

Moleküler kenetleme yönteminde, arama algoritmaları ve puanlama fonksiyonlarının kenetleme işleminin başarısı için neden önemli olduklarına değinilmiştir. Günümüze kadar bu alanda geliştirilmiş olan algoritmalara ve puanlama fonksiyonları hakkında bilgiler verilmiştir. Moleküler kenetleme alt başlığının son kısmı tez çalışması kapsamında kullanılan kenetleme yazılımına ayrılmıştır.

Üçüncü bölümün diğer önemli alt başlığı, moleküler dinamik simülasyonları üzerine olmuştur. Bu kısımda, istatistiksel kümeler, integrasyon, enerji minimizasyonu, kısıtlama, sıcaklık ve basınç çiftlenimi algoritmaları hakkında bilgiler sunulmuştur. Son olarak, moleküler dinamik simülasyonunu gerçekleştirmek için kullanılan GROMACS yazılım paketi hakkında kısaca bahsedilmiştir.

Dördüncü bölümde, tez çalışmasında gerçekleştirilen MD simülasyonlarının hazırlık aşamasında bileşenlerin temini, sistem hazırlığı ve simülasyon protokolü hakkında açıklamalar yer verilmiştir. Buna ek olarak, analizde kullanılan programlar, sonuç ve tartışma bu bölümün içinde değinilmiştir.

Tez çalışmasının son bölümü, simülasyon çıktılarından yapmış olduğumuz analizlerin değerlendirilmesi, yorumlanması ve bu çalışmanın nasıl genişletileceği hakkında bilgiler sunulmuştur.



## 2. YANLIŞ KATLANMIŞ PROTEİNLER

Son yıllarda ve günümüzde üzerinde çalışılan popüler bilimsel araştırma konulardan biri protein yanlış katlanması ve kümeleşmesi olmuştur. Gösterilen bu ilginin sebebi Dünya’da başta Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere yanlış katlanmış protein hastalıklarının “*Protein Misfolding Diseases*” (PMD) yaygınlaşması olmuştur[26].

Protein yanlış katlanması, canlı hücrelerde sıklıkla meydana gelen bir olaydır. Sağlıklı ve genç hücrelerde yanlış katlanmış proteinler, protein kalite kontrolü (PQC) mekanizmaları tarafından hücre dışına çıkması sağlanarak ve hücre içinde birikmesi engellenir. Yaşlanma veya genetik hastalıklar PQC mekanizmasının etkinliği azalır ve bu durum yanlış katlanmış proteinlerin kümeleşmesine sebep olur[27].

### 2.1. Kendiliğinden Düzensiz Proteinler

Kendiliğinden düzensiz proteinler “Intrinsically Disordered Proteins” (IDP) hücre içi veya dışında geçici oligomerler ve amiloid fibriller halinde kümeleşmesi birçok nörodejeneratif ve yanlış katlanmış protein hastalıklarına (PMDs) yol açtığı bilinir. Günümüzde dünya çapında yaklaşık olarak 50 milyon AD ve 10 milyon PD hastası insan olduğu tahmin edilir[28].

Fonksiyonel proteinler, kendilerine özgü üç boyutlu yapılarıyla birlikte atomlarının ve omurga Ramachandran açılarının denge konumları etrafında düşük genlikli termal dalgalanmalarıyla karakterize edilir. Çok sayıda dinamik fragman içeren başka bir fonksiyonel protein sınıfı ise kısmen veya tamamen düzenli yapıdan yoksunluğu ile karakterize edilir.

Bu proteinler diğer proteinler gibi tek bir, iyi tanımlanmış denge yapısından yoksundur. Bu yapıların konformasyonel özellikleri heterojen konformer kümeler halinde olur. Bir başka deyişle, konformasyonel özelliklerini tek bir koordinat kümesi ve omurga

Ramachandran açılırları ile tanımlamak mümkün değildir[29]. Bu şekilde tek bir ve kendine özgü üç boyutlu yapıdan yoksun proteinlere, kendiliğinden düzensiz proteinler “*Intrinsically Disordered Proteins*” (IDP) denilir.

Üç boyutlu yapı yoksunluğunun sebebi olarak; kendiliğinden düzensiz proteinlerin amino asit dizilimlerinden kaynaklandığı düşünülür. Kendiliğinden düzensiz proteinler; Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val, Cys ve Asn gibi düzeni sağlayan amino asitlerden önemli ölçüde yoksun olmakla birlikte, Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys ve Pro gibi düzensizliğe sebep olan amino asitlerden oldukça zengindir[30,31]. Kendine özgü tek bir üç-boyutlu bir yapının olmamasının bir başka nedeni ise bu proteinlerin yüksek net yük ve düşük hidrofobiklik özelliklerine sahip olmalarıdır[31].

Birçok IDP başka bir biyomolekülle bağlandığı zaman düzenli yapıya veya kısmen düzenli yapıya geçerler. IDP’ler sinyal iletimi, transkripsiyonel düzenleme, hücre büyümesi ve homeostaz gibi birçok hücre fonksiyonunda kritik rol oynar[32–34]. Ancak bu önemli faydalarına rağmen, amiloid- $\beta$  A $\beta$  ve tau veya  $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ Syn) gibi monomerik formlarında kısmen veya tamamen düzensiz olan proteinler pek çok amiloidoz, kanser, kardiovasküler ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olur[35,36].

## 2.2. Yanlış Katlanmış Proteinler

Normalde hücreler biyogenezdeki hatalardan, hastalığa neden olan mutasyonlardan ve fizyolojik stresten kaynaklanan yanlış katlanmış protein akışına karşı kontrol mekanizmaları vardır. Sağlıklı hücrelerde şaperon (chaperone) proteinler, yeni oluşan polipeptitlere ribozomdan çıktıkça bağlanarak doğru bir şekilde katlanmalarına yardımcı olur. Aynı zamanda, yanlış katlanmış proteinleri bozar ve doğru bir şekilde yeniden katlar.

Ancak, hücre yaşlanma ve proteotoksik stres veya hastalık yapıcı mutasyonların varlığı gibi etkenlerden dolayı yanlış katlanmış proteinler hücrelerin kontrol mekanizmasından kaçabilirler. Bu durum, yanlış katlanmış proteinlerin hücre içi veya dışında oligomerler, amorf yapılar, amiloid fibriller ve plakalar biçiminde kümeleşmesi ile sonuçlanır[37].



Toksik birikme ile sonuçlanan bu durum sinir hücrelerine zarar verir ve çoğu zaman ilerleyici sinir hücresi kaybına neden olur.

### **2.2.1. Amiloid- $\beta$ (A $\beta$ )**

Genellikle yaşlı nüfusta görülen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan AD, patolojik olarak beyinde amiloid- $\beta$  ve tau yumak kümeleşmesi ile karakterize edilir. Hastalığın klinik tanı semptomları; nörofibril yumak oluşumu, sinir hücresi kaybı, anormal sinaptik aktivite ve beyin atrofisidir[38]. Hastalık ilk evrelerinde hafıza bozukluğuna sonraki aşamalarında ise dil ve görsel-uzaysal bozukluklar gibi zihinsel fonksiyon kayıplarına neden olur[39].

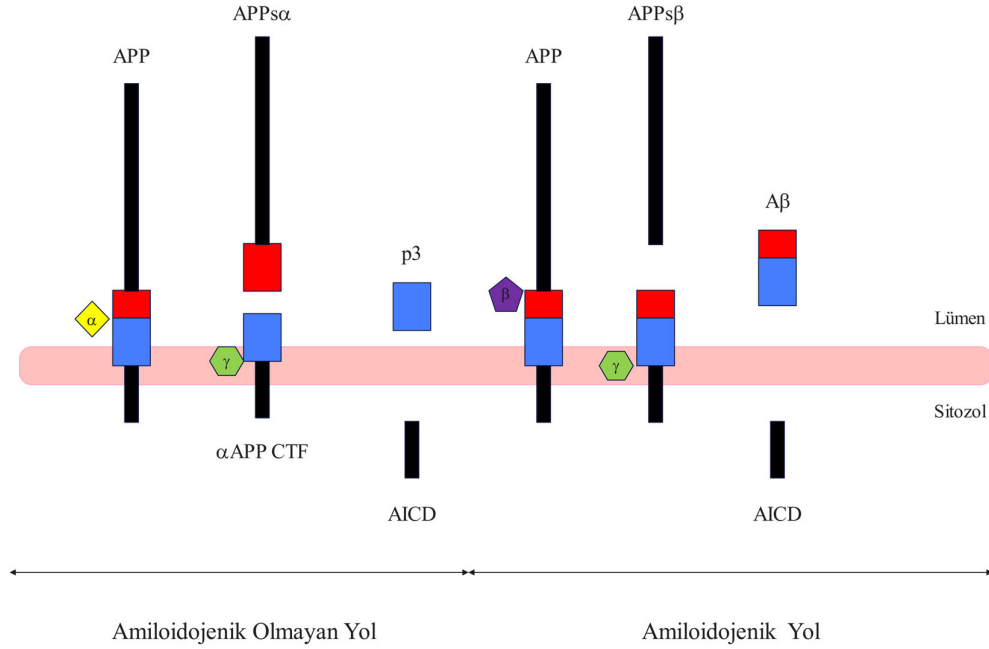
Literatüre geçmiş çok sayıdaki deneysel kanıt, amiloid- $\beta$  birikiminin sinir hücresi kaybına ve AD patolojisinin ilerlemesine sebep olduğunu göstermiştir. Beyinde A $\beta$ , ağırlıklı olarak A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 şeklinde iki izoform halinde bulunur. Yapılan canlı organizma çalışmaları A $\beta$ 42'nin A $\beta$ 40'a göre daha fazla sinirsel toksisiteye neden olduğunu göstermiştir. A $\beta$ 42 sahip olduğu amfifilik doğası ve yüksek hidrofobik özellikleri ile A $\beta$ 40'a göre daha çok kümelenme eğilimi gösterir.

Genel kanı A $\beta$ 42 izoformunu, hücre sitotoksitesinde yer alan baskın form olduğu yönündedir. A $\beta$  monomerinin yapısı, 1-6 rezidülerini içeren bir hidrofilik amino ucu (N-terminali), 17-21 rezidülerini içeren hidrofobik merkez, 22-30 rezidülerini içeren hidrofilik bağlayıcı bölge ve 31-42 rezidülerini içeren hidrofobik karboksi ucundan (C-terminalinden) oluşur[40].

#### **2.2.1.1. A $\beta$ Oluşum Mekanizması**

Amiloid öncü proteini (APP), amino ucu lümen/hücre dışı boşlukta ve karboksil ucu sitozol içinde olan bir tip I zar geçişi proteinidir. Nörotoksik bir peptit olan A $\beta$ , APP'nin sıralı proteolizi sonucu oluşur. Bu işlem sekretazlar olarak bilinen enzimler tarafından gerçekleştirilir. "Amiloidojenik yol" diye adlandırılan süreçte APP sırasıyla olarak önce  $\beta$ -sekretaz daha sonra  $\gamma$ -sekretaz aracılığı ile bölünmesi sonucunda, A $\beta$  peptiti oluşur.

Diğer sıralı bölünme süreci olan “amiloidojenik olmayan yol ’da” APP önce  $\alpha$ -sekretaz ile bölünür ve bu işlemler sonunda patolojik olmayan p3 peptidi oluşur[41].



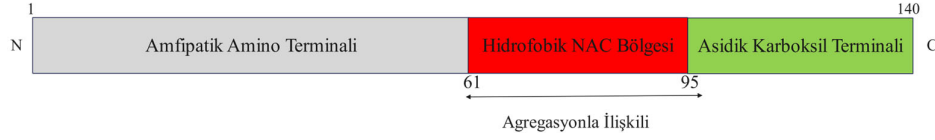
Şekil 2.1 A $\beta$  oluşum mekanizması[41].

Önce  $\beta$ -sekretaz, APP'nin APPs $\beta$  kısmını böler daha sonra  $\gamma$ -sekretaz APP' in karboksil ucunu bölerek A $\beta$  peptidini ve sitozole salınan hücre içi sinyalleşmede kullanılan AICD oluşturur. Oluşan A $\beta$ 'lar plazma veya beyin omurilik sıvısı gibi hücre dışı sıvılarda birikirler[41,42]. Amiloidojenik olmayan yolda APP,  $\alpha$ -sekretaz tarafından A $\beta$  bölgesini böler. Bu işlemde, A $\beta$  bölgesinin amino ucu kısmından yoksun olan APP CTF ( $\alpha$ APP CTF) üretilir. Daha sonra  $\gamma$ -sekretaz tarafından  $\alpha$ APP CTF kesilerek patolojik olarak bir önemi olmayan zar içi p3'ü ve sitozole salınan ne nükleer sinyalleşmede kullanılan APP hücre içi alanı AICD üretilir[41].

### 2.2.2. $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ Syn)

Nöropatolojik ve genetik olarak Parkinson hastalığı (PD) ile ilişkili olan  $\alpha$ -sinüklein ( $\alpha$ Syn) bir presinaptik nöral proteindir. Bu proteinin protofibriller olarak da adlandırılan anormal çözünür oligomerik konformasyonları, sinaptikler de dahil olmak üzere çeşitli

hücre içi hedefleri etkileyerek PD patolojisine katkıda bulunur. Toksik olan bu etkiler hücrel homeostazın bozulmasına ve sinir hücre kaybına neden olur[43].



Şekil 2.2 α-sinüklein monomerinin şematik gösterimi[44].

Fizyolojik koşullar altına monomer αSyn kendiliğinden düzensizdir ancak, patolojik bir hal aldığı zaman oligomer veya fibril formunda görülür. αSyn monomeri Şekil 2.2' de gösterildiği üç bölgeden gibi oluşur.

Amino ucu bölgesi, apolipoprotein lipid bağlayıcı motifler içeren amfipatik özelliktedir. 1-60 rezidülerini içeren bu bölge zarlara ve misellere bağlandığı zaman iki adet α-sarmal oluşturur. Amiloid olmayan (NAC) β-bileşeni olarak da adlandırılan merkezi hidrofobik bölge 61-95 rezidülerini bünyesinde barındırır. Kümeleşme ile ilişkili olan bu bölge toksik yapıdadır. 96-140 rezidülerini içeren son bölüm, asidik ve amiloidojenik olmayan karboksil ucu bölgesidir[43,44].

### 2.2.3. Tau Protein

Tau proteini, gelişmekte olan sinir hücrelerinde belirgin bir şekilde bulunan, hücre kutuplanması ve akson büyümesinin saplanması önemli rol oynar. Ağırlıklı sinir hücrelerinin aksonlarında bulunan yapısal proteinlerinden biri olan tau proteini, sinir hücresinin morfolojisini düzenleyen mikrotübül (MT) demetlerini stabilize eder[45-47].

Tau proteinleri, insanlarda 17. Kromozom üzerinde yer alan MAPT geni olan tarafından kodlanır. Bu gen, ekson 2, 3, ve 10'u içeren veya içermeyen şekilde altı farklı izoform veren bir nükleer RNA'ya kopyalanır[47]. Tau proteini AD, frontotemporal demans (FTD) ve ilerleyici supranükleer felç gibi nörodejeneratif hastalıklara patolojisinde tauopatiler olarak bilinir[46].

#### 2.2.4. PrP Protein

Prionlar, çoğu nükleik modifikasyon prosedürüne karşı dirençli olan enfeksiyöz proteinli partiküller (PrP) olarak bilinen küçük proteinli enfeksiyöz parçacıklardır. Bulaşıcı süngerimsi ensefalopatiler (TSE'ler) olarak da adlandırılan Prion hastalıkları insanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünün motor ve bilişsel işlevlerini etkileyen ölümcül nörodejeneratif hastalıklara sebep olur.

Henüz tam olarak işlevi bilinmeyen bir glikoprotein olan hücresel prion proteini (PrP<sup>c</sup>) hücre plazmalarında bulunur. Nörodejeneratif hastalıklara sebep olan PrP' nin patojenik bir izoformu PrP<sup>sc</sup>, PrP<sup>c</sup>'nin yanlış katlanmasıyla oluşur. Bazı prion hastalıklarında PrP<sup>sc</sup> gözlenmemişken PrP<sup>c</sup>'nin nörotoksik olan zar geçiş proteini PrP<sup>tm</sup> gözlemlenmiştir[48].

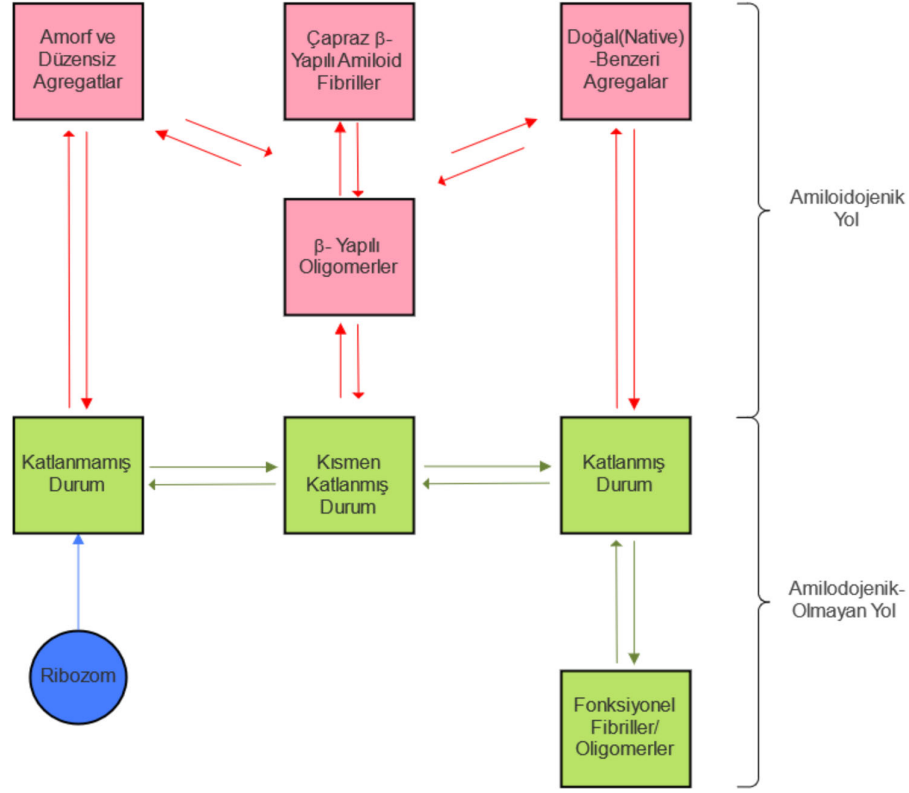
#### 2.3. Protein Kümeleşmesi

Proteinler, doğal durumlarında birbirinden farklı yapısal özellikleriyle pek çok biyolojik fonksiyonda görev alan karmaşık biyolojik makro moleküllerdir. Aynı zamanda, düzensiz, kısmen veya tamamen yanlış katlanmış konformasyonel durumlarda oligomerler veya fibriller halinde kümeleşerek çeşitli nörodejeneratif hastalığa sebep olurlar[49].

Bir proteinin amino asit dizisi, onun potansiyel olarak alabileceği konformasyonel durumları belirler (Şekil 2.3). Amiloidojenik olmayan yolda doğal ve çözünür proteinler, biyolojik olarak aktif olabildiği minimum enerji konformasyonlarında bulunurlar. Ancak amiloidojenik yolda, mutasyonlar, stres ve çevresel faktörler gibi şartlardan dolayı yanlış katlanarak; fonksiyonel olmayan ve sitotoksik konformasyonlar halinde bulunurlar[49]. Protein kümeleşmesi, doğal olarak katlanmamış, kendiliğinden düzensiz, kısmen veya tamamen yanlış katlanmış proteinlerden oluşur.

Alzheimer hastalığında; A $\beta$  peptidi monomerik formundan kendiliğinde düzensizdir ve fibril formunda kümeleşme davranışı sergiler. Kümeleşme sürecinde, monomerler topaklanarak oligomerleri oluştururlar. Daha sonra bu oligomerler çapraz- $\beta$  yapılı

fibrillere, amorf düzensiz yapılar veya doğal benzeri yapıların konformasyonlarına dönüşebilirler[49].



Şekil 2.3 Polipeptit zinciri biyosentezi şematik gösterimi[49].

## 2.4. Amiloidler

Amiloidlerin yapısal araştırmaları, 1930’larda Astbury ve Dickinson[50] X-ışını kırınımı yöntemiyle gerilmiş katlanmamış protein kümelerinin yapılarını incelerken, tesadüfen yaklaşık 4.7Å ve 10Å’da iki birincil ekvator bandı ile karakterize edilen bir modeli gözlemlenmeleri ile başlamıştır.

Bu bantlar, gerilmiş kümenin ekseni boyunca birbirine paralel şekilde hizalanmış uzun peptit zincirleridir. Daha sonra bu bantlara olarak sırasıyla omurga ve yan zincirler isimlendirilmiştir. Sonraki yıllarda “çapraz-β” motifi olarak adlandırılan bu model

amiloidleri karakterize eden bir özellik haline gelmiş ve birbirine paralel ancak büyüme yönüne dik uzanan kısa peptit zincirlerin hizalanması şeklinde yorumlanmıştır[12].

Bir biyopolimer sınıfı olan amiloidler, birbirlerine kovalent olmayan bir şekilde bağlanmış yanlış katlanmış polipeptitlerin ipliksi biçimde kümeleşmesiyle oluşur. Elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu görüntülenme yöntemleri ile amiloidlerin nanometre (nm) çapında ve birkaç mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) uzunluğundaki ipliksi yapıları gözlemlenebilir.

Amiloid fibrilleri,  $\beta$ -yapraklarına bağlanan Kongo Kırmızısı boyasının polarize ışıkta elma yeşili çift kırılımı ve iki-boyutlu X-ışını kırınımında karakteristik çapraz- $\beta$  motifi göstermelerdir. Diğer fiziksel özellikleri ise iyonik deterjanlara karşı direnç ve thioflamin-T (ThT) ve thioflamin-S'ye (ThS) bağlanma eğilimi göstermeleridir[7,51].

Son on yıllarda ve günümüzde yapılan bilimsel araştırmalar, proteinlerin kendiliğinden yanlış bir şekilde katlanarak çeşitli organlarda ve dokularda amiloid kümeleri oluşturma eğiliminde olduğunu göstermiştir.

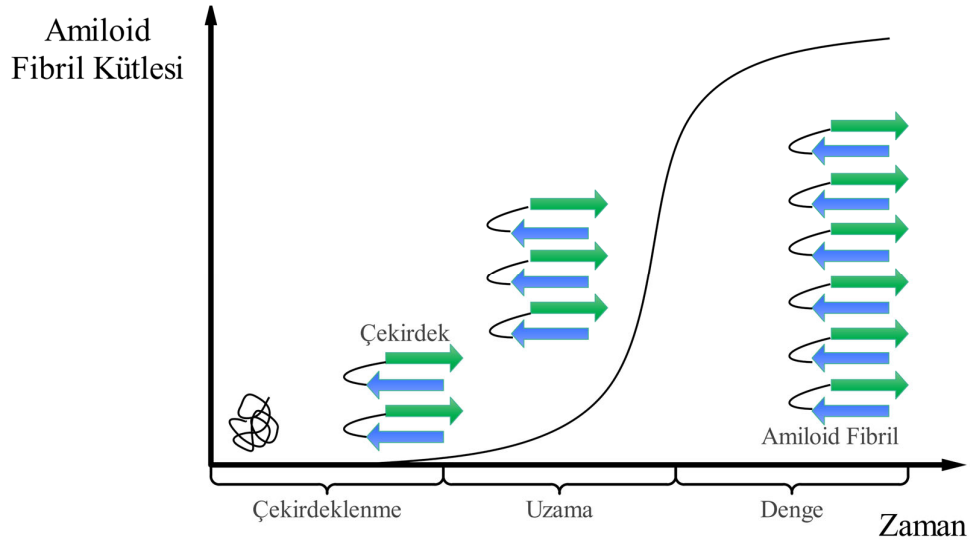
Amiloid kümeleşmesi, öbikleşme eğilimi gösteren özdeş amino asit dizilerinin kendi kendilerine çapraz- $\beta$  yapısı oluşturma süreci olarak tanımlanır[52]. Bugüne kadar yapılan bilimsel çalışmalar, bu sürecin başla AD olmak üzere birçok nörodejeneratif ve amiloidojenik hastalıkla doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir.

#### **2.4.1. Amiloid Yapısı**

Amiloidler, birbirlerine kovalent olmayan şekilde bağlanan ve büyüme eksenine dik bir şekilde düzenlenen  $\beta$ -yaprak ikincil yapılarının çapraz- $\beta$  yapısı oluşturmak üzere polimerize olması ve kümeleşme davranışı göstermesiyle tanımlanır[51]. Bu kümeler, spesifik yapısal özelliklere sahip çözünmez ipliksi proteinlerdir[53]. Komşu  $\beta$ -yaprakları birbirleriyle moleküller arası hidrojen bağıyla bağlanır, bu sayede protofibriller halinde istiflenirler. Bu protofibriller ise birkaç nm çapında ve birkaç mikron uzunluğunda

fibriller halinde kümelenirler. Jimenez vd.[54] yapmış olduğu modelleme çalışmasında amiloid fibrillerin protofilament olarak bilinen alt yapılardan oluştuğunu göstermiştir. Bu protofilamentler genellikle 2-7 nm çapında 30 nm uzunluğunda birbirleri etrafında dönen ve yanal olarak birleşen yapılardır. Amiloid fibrillerinin kararlılığı komşu  $\beta$ -yaprak ikincil yapıları arasındaki hidrojen bağından ve hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanır[55].

#### 2.4.2. Oluşum Mekanizması



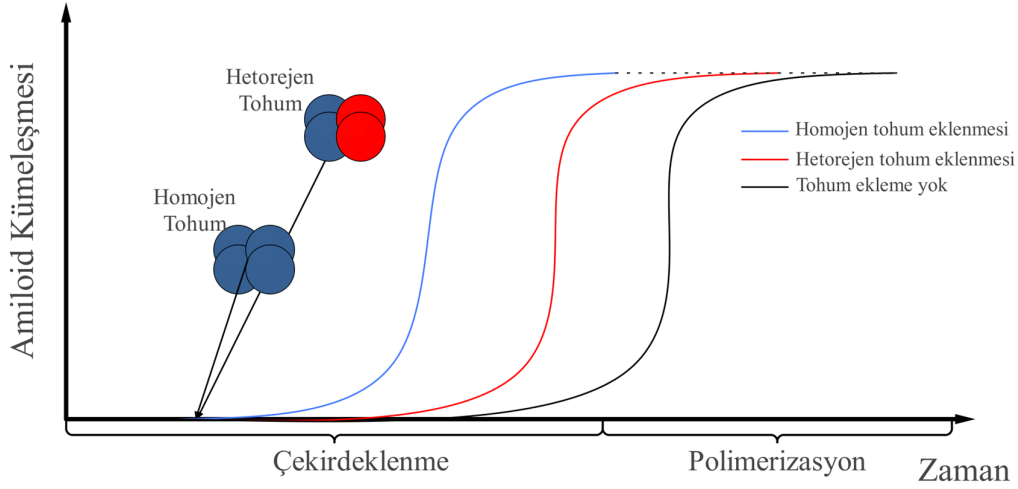
Şekil 2.4 Çekirdeklenmeye bağlı polimerizasyon mekanizması[56].

Şekil 2.4’de gösterildiği gibi tipik amiloid fibrillerin oluşumu, genellikle bir tür kristalleşme olarak kabul edilen, çekirdeklenmeyi ve uzamayı içeren, çekirdeklenmeye bağlı polimerizasyon (NDP) mekanizması ile tanımlanır. Zamana göre amiloid fibrillerin kütle artışını uzama fazına uzamadan önceki induksiyon periyoduna ise gecikme fazı denilir. Ağırlıklı olarak çekirdeklenme ve uzama zamanının oranı fibrilleşme profilini belirler[56].

#### 2.4.3. Tohumlanma ve Çapraz-Tohumlanma

Şekil 2.5’de amiloidlerde tohumlama ve çapraz-tohumlamada sürecinin, çekirdeklenme ile polimerizasyon davranışı şematize edilmiştir. Çekirdeklenme veya gecikme fazı

sırasında yanlış katlanmış protein tohumları meydana gelir. Polimerizasyon fazında bu tohumlar, normal olarak katlanmış monomerik proteinin hızlı ve üstel bir şekilde kümeleşmesini indükler. Bu süreç sonunda küçük çözümlü oligomerlerden büyük fibrillere kümelerine kadar çok çeşitli yanlış katlanmış yapılar oluşur[57].



Şekil 2.5 Tohumlama ve çapraz tohumlama fenomeni[57].

Homojen (tohumlama), aynı monomerik proteinlerin ve heterojen (çapraz-tohumlama) ise farklı monomerik proteinlerin bir araya gelmesidir[58]. Bu tohumlama işlemi homojen veya heterojen olabilir.

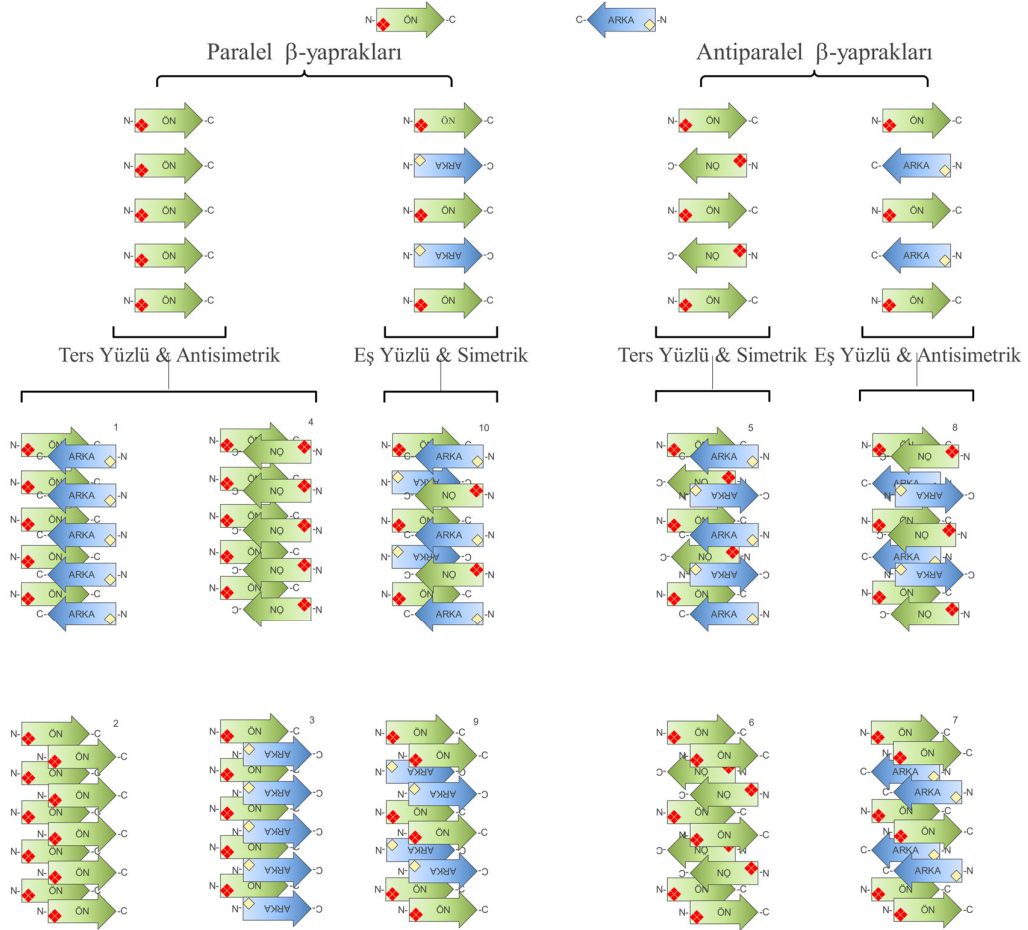
#### 2.4.4. Amiloidlerde Simetri

Amiloidler, her bir  $\beta$ -yaprağındaki amino asitlerin yan zincirlerinin birbirine kenetlenmesiyle bir sterik fermuar oluşturan iki  $\beta$ -yaprak ikincil yapısı ile meydana gelirler. Bu sterik fermuarlar ise protofilamentleri oluştururlar. Sterik fermuarların oluşmasında bir dizi simetri görülmüştür[49].

Temel olarak  $\beta$ -yaprağı geometrisi paralel ve antiparalel düzenlenim altında dört temel simetri sınıfından oluşur. Şekil 2.6 'ın en üstünde gösterilen dört temel simetriden ikisi paralel sınıfı altında olan  $\beta$ - yaprakların ters yüzlü antisimetrik ile eş yüzlü simetrik şeklinde iken, diğer ikisi antiparalel sınıfı altında olan ters yüzlü simetrik ile eş yüzlü antisimetrik simetridir. Paralel simetride  $\beta$ -yaprakların amino ve karboksil uçları aynı



şekilde dizilirken, antiparalel simetride amino ve karboksil uçları ters bir şekilde dizilirler. Şekil 2.6’da bu dört temel simetri altında oluşan on farklı simetri sınıfının nasıl dizildiği gösterilmiştir[59].



Şekil 2.6 Amiloidlerde simetri[59].



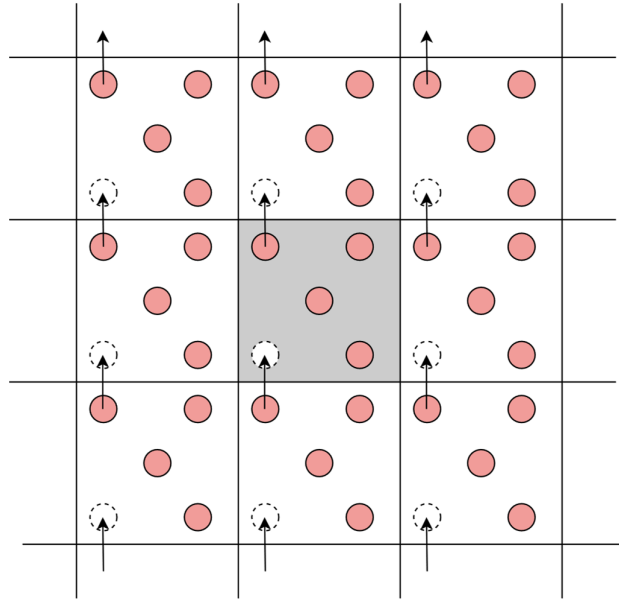
### 3. MOLEKÜLER MODELLEME

Moleküler modelleme, bilgisayar ortamında çeşitli yazılım ve algoritmalar aracılığıyla moleküllerin veya moleküler sistemlerin üç-boyutlu yapılarını oluşturma ve davranışlarını sayısal yöntemler ile tahmin etmektir. Aynı zamanda, belirli koşullar altında birtakım özelliklere sahip yeni moleküler veya moleküler sistem tasarımıdır.

Moleküler modellemede kullanılan iki önemli araçtan biri olan moleküler kenetleme “*molecular docking*”, protein ve ligandan oluşan iki ayrı molekülün birbiri ile bağlanma eğilimini ve bu eğilimlerin hangi konformasyonda bulunacağını tahmin etme yöntemidir. Diğer araç ise atomların veya moleküllerin zaman içerisinde nasıl evrileceğini tahmin eden moleküler dinamik (MD) simülasyonu yöntemidir.

#### 3.1. Moleküler Modellemede Sınır Koşulları

N moleküllü V hacimli kübik kutuda merkez kutunun 26 komşu kutusu olur. İki boyutta L kenar uzunluğuna sahip kare bir hücrede N moleküllü bir sistem modelleniyorsa Şekil 3.1’deki gibi gösterildiği gibi merkez hücrenin 8 adet komşu vardır[60].



Şekil 3.1 İki boyutlu periyodik sistemde sınır koşulları.

Merkez hücrenin sınırlarında herhangi bir duvar veya yüzey molekülü bulundurulmaz ve simülasyon sırasında, Şekil 3.1’de gösterildiği gibi bir molekül orijinal hücrede hareket ederken, her bir komşu hücredeki görüntüsü de tamamen aynı şekilde hareket eder.

Merkez hücredeki bir  $j$  atomu hücreden çıkarken komşu görüntülerinden birisi merkez hücreye girecektir. Böylece merkez hücrede bulunan  $j$  atom veya molekülü  $r_j$  konumunda ise  $L$  hücre boyutu,  $\alpha$  ve  $\beta$  bir tam sayı sabiti olmak üzere;

$$R = r_j + \alpha L + \beta L \quad (3.1)$$

Eşitlik (3.1)’da ifade edilen konumlarda görüntü atom veya molekülleri bulunur. Nihai olarak merkez hücredeki parçacık sayısı  $N$  olarak değişmez kalarak sınır koşullarından etkilenmeden merkez hücredeki atom veya moleküller sadece birbirleri ile etkileşirler.

### 3.2. Moleküler Modellemede Kuvvet Alanları

Proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin moleküler modellemede sistemin potansiyel enerjisi, sistemi oluşturan atomların uzaydaki konumlarının türevlenebilir bir matematiksel fonksiyonu ve bir dizi sabit etkileşim parametreleri ile tanımlanır. Kuvvet alanı “*force field*” ( $ff$ ) olarak bilinen bu matematiksel fonksiyon ve parametreler bütünü, sistemin yörüngesi ve enerjisinin hesaplanabilmesine olanak sağlar. Kuvvet alanları büyük ölçüde, bağ uzunluğu, bağ açısı, torsiyonel açılar, van der Waals ile elektrostatik diğer etkileşim faktörlerinden kaynaklanan potansiyel enerji fonksiyonlarıyla birlikte bu etkileşimlerle ilgili parametrelerden oluşur.

Proteinlerin yapılarını ve katlanma özelliklerini irdelemek adına akademik çalışma grupları ve ticari kuruluşlar tarafından geliştirilmiş birçok kuvvet alanı vardır. Yaygın olarak kullanılan kuvvet alanlarından birkaç tanesi şunlardır; AMBER[61], CHARMM[62], GROMOS[63] ve OPLS-AA[64]. En genel anlamda kuvvet alanları; bağlı olan, bağlı olmayan ve diğer etkileşimler şeklinde Eşitlik (3.5)’da verildiği gibi üç gruba ayrılır [65].

$$V_{bağlı} = \sum_{bağ} \frac{k_b}{2} (b - b_0)^2 + \sum_{açı} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 \quad (3.2)$$

$$+ \sum_{dihedral} \frac{k_\alpha}{2} (1 + \cos(n\alpha - \gamma))^2$$

$$V_{bağlı-olmayan} = \sum_{i=0}^N \sum_{j=i+1}^N \left[ 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \left( \frac{1}{4\pi\epsilon_0} * \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \right] \quad (3.3)$$

$$V_{diğer} \quad (3.4)$$

$$V_{toplam} = V_{bağlı} + V_{bağlı-olmayan} + V_{diğer} \quad (3.5)$$

### Eşitlik

(3.2)'de gösterildiği gibi olan bağlı terimler; bağların gerilme, değerlik açılarının bükülme ve dihedrallerin dönme enerjilerini içerir. Denklemdaki birinci terim tüm bağlı atom çiftlerin toplamıdır. Bağların gerilmesini tanımlayan bu terim Hooke yasasından gelir. Burada, b atomlar arası mesafe (bağ uzunluğu),  $b_0$  bağın denge konumu ve  $k_b$  yay sabitidir.

Açıların bükülmesini tanımlayan ikinci terim A atomunun B atomuna ve B atomunun C atomuna bağlı olduğu üçlü grupların toplamından gelen katkıları içerir. Burada,  $\theta$  bağ yapan iki bağ vektörünün oluşturduğu açı,  $\theta_0$  bağ açısının denge noktası ve  $k_\theta$  açını katılığını tanımlar. Eşitliğin üçüncü ve son terimi ise A, B, C ve D atomlarının oluşturduğu dördümlü grupların dihedral açılarının dönmesini yani burulmayı tanımlar. A atomu B atomuna, B C atomuna, C de D atomuna bağlıdır. Bu şekilde dönmeler periyodik olduğundan ilk iki terim gibi kuadratik değil, bir kosinüs fonksiyonu cinsindedir. Burada,  $\alpha$  dihedralin açısıdır (burulma açısı),  $k_\alpha$  bariyer yüksekliğini belirleyen enerji parametre olup, n periyodikliği ve  $\sigma$  fazı temsil eder.

İkinci kısım (Eşitlik (3.3)) olan bağlı-olmayan terimler, moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri ifade eder; dispersiyon, Pauli-Dışlama ve elektrostatik etkileşimler. Bir başka deyişle, Eşitlik (3.3) sistemdeki; ayrı moleküllerdeki atomlar arasında, aynı

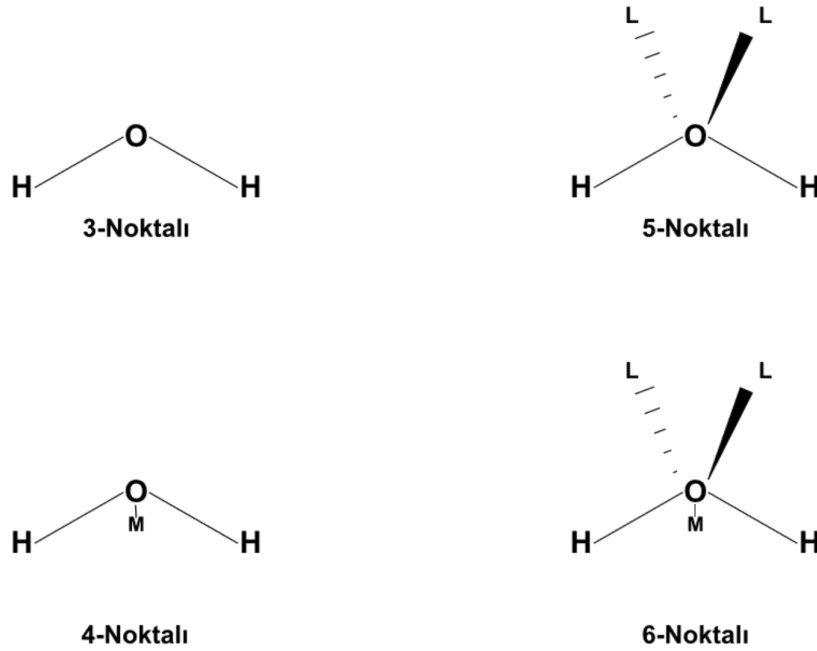
molekülde üç veya daha fazla bağla ayrılmış atomlar arasında meydana gelen etkileşimleri tanımlar. Bu eşitlik iki bölümden oluşur.  $4\epsilon_{ij}$  faktörlü köşeli parantezli olan birinci kısmı, Lennard-Jones (LJ) denklemi olarak adlandırılır. LJ denkleminin ilk terimi itici olan kısa mesafeli Pauli-Dışlama kuvvetini, ikinci terimi ise çekici olan uzun mesafeli London Dispersiyon kuvvetidir ve ikisi birden genellikle van der Waals etkileşim terimi olarak bilinir. Burada,  $\sigma_{ij}$  atomlar arası potansiyelin sıfır olduğu uzaklık ve  $r_{ij}$  atomlar arası mesafedir.

Eşitlik (3.3)'in ikinci kısmı Coulomb yasasıdır ve bağlı-olmayan atom çiftleri arasındaki elektrostatik etkileşimleri modeller. Burada ve  $r_{ij}$  atomlar arası mesafe iken ve  $q_i$  ve  $q_j$  sırasıyla i. ve j. atomlar üzerindeki etkin yüklerdir. Etkin yükler, bir molekülün genel yük dağılımını temsil eder ve tamsayı olmayan kısmi atomik yüklerdir. Eşitlik (3.4)'da verilen diğer kısım ise kuvvet alanına özgü terimlerdir.

### 3.3. Moleküler Modellemede Su Modelleri

Doğadaki en önemli ve bol bulunan çözücü olan sıvı su, aynı zamanda biyolojik sistemlerin faaliyetlerinin devam etmesini sağlayan en kritik maddedir. Suyu bu kadar önemli yapan ve hem birbirleriyle hem de diğer moleküller ile etkileşmesini sağlayan elektrostatik, dispersiyon, itme gibi kuvvetleri, hidrojen bağ yapıları, yüksek dielektrik sabiti, kendi kendine iyonlaşma ve güçlü kalıcı dipol momenti gibi birtakım etkileşim öğelerine sahip olmasıdır[66].

Şu ana kadar sıvı suyun makroskobik özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiş, ancak mikroskobik özellikleri halen tam olarak anlaşılammıştır[67,68]. Suyun atomik düzeyde özelliklerini ve davranışını incelemek amacıyla MD simülasyonları güçlü bir araç olmuştur. Biyomoleküller çözücü olarak genelde sıvı su içinde bulunur. Bu nedenle sıvı su sulu çözeltileri simüle etmek ve biyomoleküllerin MD simülasyonlarının doğruluğunu artırmak adına kuramsal olarak pek çok su modeli oluşturulmuştur(Şekil 3.2). Günümüzde moleküler sistemleri simüle etmek adına hemen hemen her modelleme paketinde bulunan sabit-yüklü, katı ve kutuplaşmamış olarak sınıflandırılan pek çok su modeli geliştirilmiştir[69,70].



Şekil 3.2 Su modellerinin şematik gösterimi.

Bir su modeli, su molekülünün geometrisini yük dağılımını bağ uzunlukları ve açılarını, LJ denklemini ve yük dağılımını gibi parametreleri içeren potansiyel enerji fonksiyonudur[66]. Biyomoleküllerin MD simülasyonlarını gerçekleştirmek için uygun su modeli seçimi, simülasyon sonuçları ve doğruluğu açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle farklı su modellerinin sınırlamalarını, avantaj ve dezavantajlarını iyi irdelemek önemlidir.

Biyomoleküllerin MD simülasyonlarında yaygın olarak TIP3P (3 Nokta ile Aktarılabılır Moleküller Arası Potansiyel)[71], TIP4P (4 Nokta ile Aktarılabılır Moleküller Arası Potansiyel)[71], SPC (Basit nokta yükü)[72] ve SPC/E (Genişletilmiş basit nokta yükü)[73] su modelleri kullanılır.

Diğer kullanılan su modeli Harvard Moleküller Mekaniğinde Kimya (CHARMM[62]) kuvvet alanında Lennard-Jones potansiyeline hidrojenlerin eklenmesiyle modifiye edilmiş mTIP3P[62] olarak da anılan modifiye edilmiş TIP3P su modelidir.

TIP3P su modelinin potansiyeli[74];

$$E_{ab} = \sum_i^{a \text{ üzerinde}} \sum_j^{b \text{ üzerinde}} \left[ k_c \frac{q_{a_i} q_{b_j}}{r_{a_i b_j}} + 4\epsilon_{a_i b_j} \left[ \left( \frac{\sigma_{a_i b_j}}{r_{a_i b_j}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{a_i b_j}}{r_{a_i b_j}} \right)^6 \right] \right] \quad (3.6)$$

Eşitlik (3.6) ile ifade edilen  $E_{ab}$ , rijit suyun biri a diğeri ise b olan iki su molekülünün potansiyel fonksiyonudur. Burada  $k_c$  değeri  $332.1 \text{ \AA} \cdot \text{kcal}/(\text{mol} \cdot e^2)$  olan elektrostatik sabit,  $q_{a_i}$  ve  $q_{b_j}$  sırasıyla a molekülünün i. ve b molekülünün j. atomları üzerindeki kısmi yükler,  $r_{a_i b_j}$  a molekülünün i. atomu ile b molekülünün j. atomu arasındaki mesafe ve  $\sigma_{a_i b_j}$  angström mertebesinde moleküler çap ve  $\epsilon_{a_i b_j}$  ise kcal/mol biriminde potansiyelin kuyu derinliğidir.

### 3.4. Moleküler Kenetleme Simülasyonu

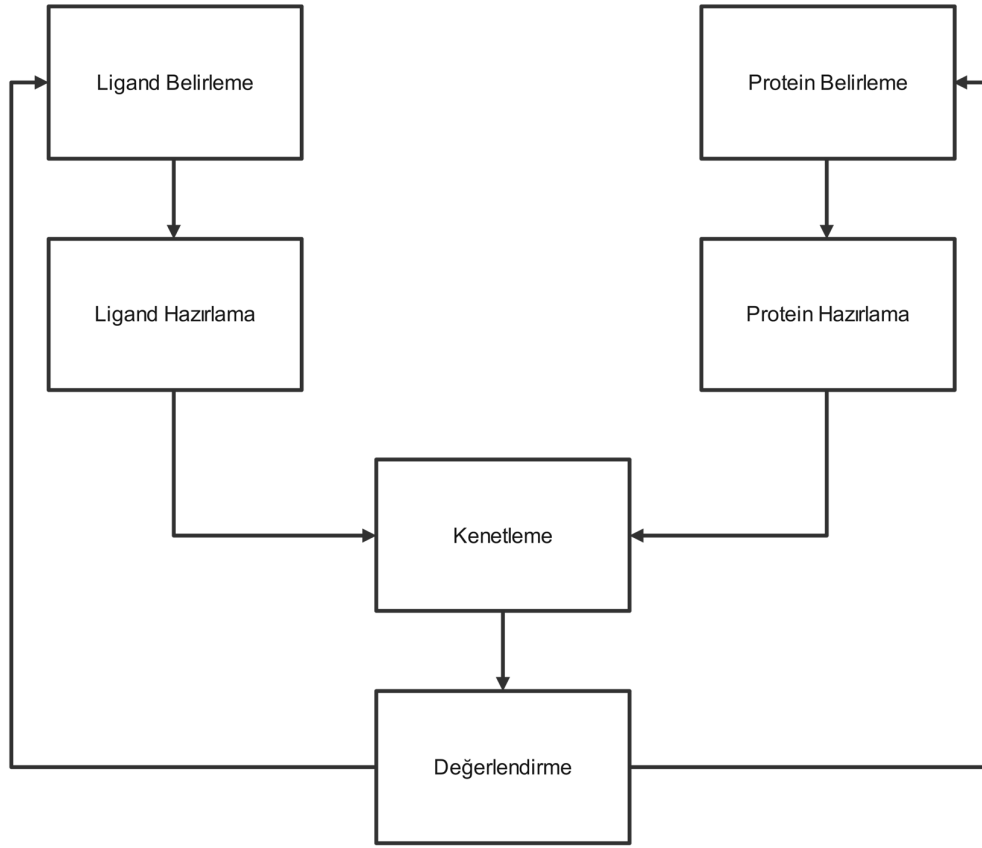
İlaç keşfi çalışmalarında ligandların, hedef molekül (reseptör) ile etkileşmesi aktif moleküllerin tanımlanması ve optimize edilmesi; ilaç adayı veya öncü-bileşen belirlemede gerçekleştirilen süreçlerdir. Geçtiğimiz on yıllarda hesaplamalı tekniklerin ve bilgisayarların hesaplama hızlarının gelişmesi; ilaç keşfi çalışmalarının bilgisayar ortamında yapılmasına vesile olmuştur. Bir moleküler modelleme yöntemi olan ve bilgisayar ortamında gerçekleştirilen moleküler kenetleme “*Molecular Docking*” olarak bilinen simülasyonda, ligandın protein ile tercih ettiği konformasyon ve bağlanma ilginliği tahmin edilir.

Moleküler kenetleme, bir ligand (küçük molekül) ve bir protein (reseptör veya hedef) arasındaki etkileşimleri modellemek için kullanılan hesaplamalı bir yöntemidir. Moleküler kenetleme, bileşenlerinin üç-boyutlu yapıları kullanılarak bir kompleks yapı modeli oluşturma sürecidir[75]. Moleküler kenetleme, genellikle ilaç tasarımı ve keşfi alanlarında kullanılan yapı temelli bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemidir[76,77]. Moleküler kenetleme, konformasyon tahmini, bağlanma ilginliği ve sanal tarama şeklinde



üç ana başlıktan oluşur. Bu bağlamda kullanılan yazılımlar, bağlanma modu tahmini, sanal tarama ve aktivitenin kantitatif tahmini için kullanılır[78].

En olası bağlanma konformasyonlarının belirlenmesi: (i) konformasyonel alanın keşfi, (ii) etkileşim enerjilerinin doğru tahmini, şeklinde iki aşamada gerçekleşir[79]. Kenetleme prosedürün protokolleri arama algoritması ve puanlama fonksiyonunun kombinasyonundan oluşur[80].



Şekil 3.3 Moleküler kenetleme temel protokolü.

Şekil 3.3'de gösterildiği gibi bir kenetleme işlemi birbiri ile ilişkili belli başlı adımların izlenmesi ile oluşur.

İlk önce NMR veya X-Işını kristalografi yöntemi ile üç boyutlu yapısı bilenen ve hedef molekül olacak olan makromolekül ardından hedef moleküle bağlanılacak olan küçük molekül gerek ligand kütüphaneleri veya literatür araştırması sonucunda belirlenir. İkinci

aşamada kullanılan yazılım aracılığıyla, reseptör ve ligand simülasyona uygun hale getirilir. Daha sonra seçilen arama algoritması ve puanlama fonksiyona ile kenetleme işlemi yapılır ardından elde edilen sonuçlar değerlendirilir.

### **3.4.1. Arama Algoritması**

Esas olarak moleküler kenetleme, konformasyonların konumsal, oryantasyonel ve dönebilir bağ açılarının olasılıksal seçenekleri arasında verimli örnekleme yapılabildiğini gerektiren oldukça zorlu bir minimizasyon problemidir. Moleküler kenetleme simülasyonlarında kenetleme tahminlerinin doğruluğu, protein ligand kompleksinin oluşturduğu konformasyonel uzayın keşfedilmesine önemli ölçüde bağlıdır.

Günümüze kadar kenetleme yazılımı geliştiren enstitüler ve ticari kuruluşlar tarafından, farklı kullanım senaryoları ve amaçlar için konformasyonel uzay keşfetmek adına birçok arama algoritması geliştirilmiştir. Esnek ligand katı protein yaklaşımında; sistematik, stokastik, deterministik ve hibrid arama yöntemleri başlıca kullanılan yöntemlerdir.

#### **3.4.1.1. Sistematik Arama Yöntemi**

Sistematik arama yöntemleri, ligandın yapısal parametrelerini ve serbestlik derecelerini sistematik olarak değiştirerek konformasyonel uzayda tüm konformasyonları keşfetmeyi çalışır. Kapsamlı, fragmentasyonel arama ve konformasyonel topluluk yöntemleri bu yöntemin adı altında yaygın olarak kullanılanlardan bazılarıdır[80]. Örneğin moleküler kenetleme yazılımlarından Glide[81] bu arama yöntemlerini kullanır.

#### **Kapsamlı Arama Algoritması**

Kapsamlı arama algoritması, önceden belirlenmiş bir değer aralığında ligandın tüm dihedral açılarını bir dizi başlangıç sıralamasına göre döndürerek konformasyonel uzay keşfeder[82]. Bu yöntem arama uzayını başarılı bir şekilde keşfetmesine rağmen kombinasyonların sayısı, dönebilir bağların sayısı arttıkça konformasyonların sayısı üstel olarak artmakta ve bu durum kombinatoriyal patlama sorununa neden olur[83].

### **Fragmantasyonel Arama Algoritması**

Fragmantasyonel arama algoritması, problemde tanımlanan ligandı ilk önce parçalara ayırarak kenetleme sürecine başlar. Ardından proteinin bağlanma bölgesine, ligandın parçalarını birbirlerine kovalent bir şekilde bağlayarak kenetler[84]. DOCK[85], LUDI[86] gibi yazılım paketleri bu algoritmaları kullanan birkaç tanesidir.

### **Konformasyonel Topluluk Yöntemi**

Kenetleme işleminde katı protein-ligand yaklaşımı kullanan bu yöntemde ligand esnekliği, ligandın önceden hazırlanmış katı ve farklı konformasyonlarından bir topluluk oluşturularak sağlanır. Kenetleme sonucunda elde edilen bağlanma enerjileri ve konformasyonlar bir puanlama fonksiyonu tarafından yapılır[83]. Bu algoritmaları temel alan yazılım paketlerinde bazıları; FLOG[87], MS-DOCK[88].

#### **3.4.1.2. Stokastik Arama Yöntemi**

Bu arama algoritmaları biri, konformasyonların öteleme, dönme ve yönelimlerinde rastgele değişikliklerin yapıldığı diğeri ise, yapılan değişiklikler sonucunda elde edilen yeni konformasyonların bir olasılık kriterine göre kabul edilmesi şeklinde olan iki temel adımdan oluşur[75]. Monte Carlo (MC), genetik algoritma (GA), tabu arama (TS) ve parçacık sürüsü optimizasyonu (PSO) algoritmaları bu arama yönteminde yaygın olarak kullanılanlardan dört tanesidir.

#### **MC Algoritması**

Monte Carlo algoritması, kenetleme işleminin başlangıçta proteinin aktif bölgesinde ligandın öteleme ve dönme parametrelerinden rastgele bir şekilde bir konformasyonu oluşturulur. Ardından birtakım kriterlere göre bu ilk yapıya bir puan atanır. Daha sonra konformasyonun yapısal parametrelerinde değişiklikler yapılır. Yeni konformasyonun puanı eski halinden daha yüksek ise korunur değilse, Metropolis[89] kriterine göre değerlendirilerek kabul veya reddedilir. Kenetleme sürecinde istenilen konfigürasyon sayısı elde edilene kadar bu işlem sırası devam eder[84]. DockVision[90] Monte Carlo algoritmasını kullanan kenetleme yazılımlarına örnek olarak verilebilir.

## **Genetik Algoritma (GA)**

Genetik algoritma, evrim teorisinin minimizasyon problemlerine uygulanması ile ortaya çıkan ve doğası gereği rastgeleliği içinde barındıran stokastik bir algoritmadır. MC algoritmasının aksine GA kenetleme sürecine ligandın farklı konformasyonlarından oluşan bir popülasyon ile başlar. Her konformasyon, ligandın proteine göre ötelenmesi, oryantasyonu gibi bir dizi durum değişkeni (genler) tarafından tanımlanır. Ligandın, bu durum değişkenlerinin tamamı genotip atomik koordinatları fenotip olarak tanımlanır.

Mutasyonlar, geçişler ve göçler gibi genetik operatörler, örnek konformasyon popülasyonuna uygulanarak konformasyonel alan taranır ve konformasyonlar bir uygunluk fonksiyonu tarafından değerlendirilerek nihai popülasyona ulaşılmaya çalışılır[75]. Genetik algoritmayı kullanan popüler moleküler kenetleme programlarının başında GOLD[91] ve AutoDock[92] yazılımları gelir.

## **Tabu Arama (TS) Yöntemi**

İlk olarak TS stratejisi Glover[93] tarafından yöneylem araştırmalarında karşılaşılan kombinatoriyal problemleri çözmek için kullanılmıştır. Ancak, daha sonraki zamanlarda iki molekül arasındaki kimyasal mesafenin değerlendirilmesi gibi kombinatoriyal optimizasyon problemlerinde etkili bir çözüm olarak dikkat çekmesi ile moleküler kenetleme yönteminde kullanılan stokastik arama algoritmalarından biri haline gelmiştir[94]. TS yöntemi, en düşük enerjiyi bulmak için, kenetleme işlemine bir ilk konformasyon ile başlar ve genetik algoritmalarındaki mutasyona benzer bir şekilde konformasyonda bir dizi değişiklikler yaparak konformasyonel uzayı keşfeder. Elde edilen konformasyonlar birtakım kriterlere göre puanlanır, sıralanır ve daha önce bulunan en düşük enerjiyi veren konformasyonların oluşturduğu “*Tabu listesi*” adı verilen bir kütüphane kullanılarak değerlendirilir. Elde edilen konformasyonlarda tabu listesindekilerine benzer bir sonuç verdiyle “tabu” olarak kabul edilir. En düşük enerjili konformasyon, o ana kadarki en düşük enerjili konformasyonlardan daha düşükse, kabul edilir ve tabu olmayan en iyi konformasyon olarak seçilir. Hiçbir kriter karşılanmadığı zaman algoritma çalışmayı durdurur[82,94]. PRO\_LEADS[94] paket programları TS yöntemini kullanan moleküler kenetleme programlarına bir örnek olarak verilebilir.

### **Parçacık Sürüsü Optimizasyonu (PSO) Algoritması**

Parçacık sürüsü optimizasyonu (PSO), kuş, balık ve böcek gibi sürü davranışı sergileyen canlılardan ilham alınarak tasarlanmış bir algoritmadır. 1995 yılında Eberhart[95] ve Kennedy[96] tarafından, evrimsel algoritma ve yapay yaşam araştırma alanlarından türetilmiş sürü tabanlı bir stokastik optimizasyon yöntemidir[97].

PSO algoritması, parçacık adı verilen aday bir konformasyon popülasyonu ile kenetlemeye başlar. Bu parçacık sürüsüne arama (optimizasyon) sırasında bir hız verilerek arama uzayında hareket etmeleri sağlanır. Parçacıklar hem kendi hareketlerinden hem sürünün hareketlerinden etkilenir ve bu davranışlar sonucunda en düşük enerjili konformasyon belirlenir[98,99]. PSOVina[100] son yıllarda geliştirilmiş ve parçacık sürüsü optimizasyonu algoritmasını kullanan yazılımlardan biridir.

#### **3.4.1.3. Deterministik Arama Yöntemi**

Enerji minimizasyonu (EM) ve moleküler dinamik gibi deterministik yaklaşımlar, başlangıç koşullarına bağlı bir şekilde, sistemin bir sonraki durumunu mevcut durum vasıtasıyla belirler. EM, global minimumu potansiyel enerjinin gradyanını kullanarak bulma çalışır fakat, bu durum yerel minimuma hapsolme eğilimi göstermesine neden olur. Enerji ortamının daha verimli keşfedebilmesi için enerji bariyerlerini aşması gerekir.

MD simülasyonu yaklaşımında, sıcaklık ve basınç gibi termodinamik nicelikler ve açık çözücüler de hesaba katılarak sistemin zaman içindeki evrimi incelenerek konformasyonel alanın keşfi gerçekleştirilir. Ancak bunlara rağmen yerel minimuma hapsolme eğilimi mevcuttur.

Bu problemi aşmak adına hem EM hem de MD diğer yöntemler ile kullanılmalıdır fakat, hesaplama maliyeti yüksek olduğu için tercih edilebilirliği diğer yöntemlere göre azdır[82]. Deterministik arama yöntemini yazılım paketi bünyesinde barındıran programlardan biri CDOCKER[101] yazılımıdır.

#### **3.4.1.4. Hibrid Arama Yöntemleri**

Moleküler kenetleme yöntemine, bir ligandın bir reseptör ile nasıl etkileşimde bulunduğunu tahmin etme probleminin çözülmesi amaçlanır. Algoritmik bakış açısıyla bu problem, ligandın hedef moleküle bağlanırken ligandın en iyi konumunu, oryantasyonunu ve ligandın tüm döner bağlarının açıları gibi parametreleri belirlemek olan bir konformasyonel arama problemidir. Bu problemi çözmek adına temel arama algoritma yaklaşımlarının eksik kaldığı veya çözmesinin uzun zaman aldığı senaryolarda kullanmak adına hibrit algoritmalar geliştirilmiştir.

#### **Lamarckian Genetik Algoritması (LGA)**

Esnek ligand ve katı protein moleküler kenetleme probleminde global minimumu bulmak amacıyla kullanılan algoritmalarından biri olan GA, yüksek serbestlik derecesi içeren ligandların bulunduğu senaryolarda kombinatoriyal patlama sorunu yaşamasıyla bilinir. Bu sorunu çözmek amacıyla evrimsel algoritma ve yerel arama yaklaşımlarının kombinasyonundan oluşan hibrit bir optimizasyon tekniği olan Lamarckian genetik algoritması (LGA) geliştirilmiştir.

LGA yaklaşımı, genetik algoritmasında olduğu gibi bir başlangıç konformasyon oluşturularak kenetleme işlemine başlar. Ancak, farklı olarak birbirini izleyen nesillerde bireyler (konformasyonlar) mutasyona uğrar yani, konformasyon parametrelerinde değişiklikler gerçekleştirerek biyolojik evrime benzer şekilde konformasyonların rekabet etmesi sağlanır. En düşük bağlanma enerjisine sahip konformasyonların seçimi bu şekilde belirlenir.

“Lamarckian” ifadesi GA’ ya eklenen, bireylerin yerel konformasyonel alanlarının incelenmesine, yerel minimumlarının bulunmasına ve buradan elde edilen bilgilerin gelecek nesillere aktarılmasına sağlayarak global minimumun bulunmasını amaçlayan bir özelliği belirtir[102,103]. Moleküler kenetleme yönteminde yaygın bir şekilde kullanılan AutoDock 4[92] yazılımı LGA algoritmasını kullanır.

### 3.4.2. Puanlama Fonksiyonları

Moleküler kenetleme gibi hesaplamalı araçların önemi hem protein fonksiyonu çalışmalarında hem de yapı tabanlı ilaç tasarımında üç boyutlu protein yapılarının sayısı arttıkça yıllar içinde vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Bu hesaplamalı teknikte, protein ligand etkileşmelerini doğru bir şekilde tanımlamasında enerji puanlama fonksiyonları kritik bir görev üstlenir.

Moleküler kenetlemede puanlama fonksiyonları; bir ligandın protein üzerindeki bölgesinin belirlenmesi, ligand ve protein arasındaki mutlak bağlanma ilginliğinin tahmin edilmesi ve sanal veritabanı taraması ile potansiyel ilaç adaylarını belirleme şeklinde üç temel görevi vardır. Bu üç görev birbirleri ilişkilidir ve ideal puanlama fonksiyonu bu üç görevin hepsini sağlamalıdır. Puanlama fonksiyonları genel olarak kuvvet alanı tabanlı, ampirik ve bilgi tabanlı şeklinde sınıflandırılır ancak bu temel üç kategorinin kombinasyonlarından oluşan fonksiyonlar da mevcuttur[104].

#### 3.4.2.1. Kuvvet Alanı Tabanlı Puanlama Fonksiyonları

Kuvvet alanına dayalı puanlama fonksiyonları, bağlı olmayan etkileşimlerin toplamını hesaplayarak bağlanma enerjisini bulmaya çalışırlar. Elektrostatik enerjiler mesafeye bağlı bir dielektrik fonksiyon ile modüle edilen Coulomb formülasyonu ile hesaplanır. Protein ile ligand atomları arası mesafeyi belirleyen ve potansiyelin sertliğini kontrol eden bir Lennard-Jones potansiyel fonksiyonu ile van der Waals terimleri tanımlanır. Bağlı olmayan etkileşimleri kontrol altına almak için bir kesme mesafesi uygulanır, ancak bu uzun menzilli etkileşimlerin hassasiyetini azaltır.

Moleküler kenetleme yöntemi geliştikçe kuvvet alanına dayalı puanlama fonksiyonlarına hidrojen bağları, entropi ve solvasyon gibi faktörler de dahil edilerek fonksiyonun doğruluğu artırılmıştır[83].

$$V = \sum_i \sum_j \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right] \quad (3.7)$$

Eşitlik (3.7)' de tipik bir kuvvet alanı tabanlı puanlama fonksiyonu verilmiştir. Burada  $r_{ij}$  proteinin  $i$ . atomu ile ligandın  $j$ . atomu arasındaki mesafeyi,  $A_{ij}$  ve  $B_{ij}$  van der Waals parametrelerini,  $q_i$  ve  $q_j$  sırasıyla proteinin  $i$ . atomunun kısmi yükü ve ligandın  $j$ . atomunun kısmi yükünü temsil eder. Bu kategoride geliştirilmiş bazı kuvvet alanı puanlama fonksiyonlarına örnek olarak AMBER[105] ve CHARMM[106] verilebilir. Kuvvet tabanlı puanlama fonksiyonlarını kullanan bazı popüler yazılımlara, DOCK[107], GOLD[91] ve AutoDock[103] verilebilir.

### 3.4.2.2. Ampirik Puanlama Fonksiyonları

Ampirik puanlama fonksiyonları Eşitlik (3.8)'de verildiği gibi bir dizi ağırlıklı enerji terimleri kullanarak ligandın proteine bağlanma afinitesini tahmin çalışır. Bu enerji terimleri,  $\Delta G_i$  ile VDW, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, desolvasyon enerjisi, entropi, hidrofobik etkileşimleri temsil edilir ve bu enerji terimlerine karşılık gelen katsayılar  $W_i$  ile gösterilir[104].

$$\Delta G = \sum_i W_i \Delta G_i \quad (3.8)$$

Bu tür puanlama fonksiyonlar, bağlanma enerjileri ve konformasyonlar gibi deneysel veriler bilgisayar ortamında yeniden elde etmeye amaçlayan ve bunu için parametreleştirilmiş birkaç fonksiyonun toplamı olarak geliştirilmiş fonksiyonlardır[108]. Birçok ampirik puanlama fonksiyonu, çeşitli enerji terimleri ve farklı protein-ligand kompleksleri içeren veri kümeleri ile geliştirilmiştir. Score[109], ChemScore[110] ve X-Score[111] gibi yazılım paketleri bu tür fonksiyonları kullanan moleküler kenetleme yazılımlarından birkaç tanesidir.

### 3.4.2.3. Bilgi Tabanlı Puanlama Fonksiyonları

Bilgi tabanlı puanlama fonksiyonları, bağlanma enerjileri yerine protein-ligand kompleksi yapısını üretmek için geliştirilmiştir. Bu fonksiyonlar, yapısı bilenen protein-ligand komplekslerinden elde edilen ikili potansiyelleri kullanırlar.



İkili potansiyeller, ters Boltzmann ilişkisi ile elde edilir ve gerçek kuvvet potansiyellerinden ziyade ortalama kuvvet potansiyelleridir. Bu puanlama fonksiyonunun nihai amacı, belirli bir protein-ligand kompleksinin atomlarının optimal düzenlenmesini tahmin etmektir[112].

$$V_{bağlanma} = \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^R w_{ij}(r) = \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^R -k_B T \ln[g(r)] \quad (3.9)$$

$$g(r) = \frac{\rho_{ij}(r)}{\rho_{ij}^*(r)} \quad (3.10)$$

Protein-ligand kompleksleri için potansiyeller Eşitlik (3.9) ile hesaplanır. Burada  $k_B$  Boltzmann sabiti, T sistemin mutlak sıcaklığı,  $\rho(r)$  r mesafesindeki protein-ligand atom çiftinin sayı yoğunluğu,  $\rho^*(r)$  atomlar arası etkileşimin sıfır olduğu referans durumundaki çift yoğunluğu ve  $g(r)$  ise çift dağılım fonksiyonudur[113]. DrugScore[114,115], SMOG[116] bu kategorideki fonksiyonları kullanan yazılım paketlerinden birkaç tanesidir.

#### 3.4.2.4. Konsensus Puanlama Fonksiyonları

Her kategorideki puanlama fonksiyonlarının kendilerine özgü eksiklikleri vardır. Bu sebeple gerçek bir puanlama fonksiyonunun varlığından henüz yoktur. Farklı puanlama fonksiyonları bir özelliği diğerlerinden bağımsız olarak tahmin eder. Her puanlama fonksiyonu farklı ölçeklerde kusurla sahip olduğundan, bu kusurları dengelemek adına farklı fonksiyonların kombinasyonu kullanılır[117].

#### 3.4.3. AutoDock Vina Moleküler Kenetleme Yazılımı

AutoDock Vina[23], Oleg Trott ve Arthur Olson tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan The Scripps Araştırma Enstitüsü bünyesinde ilaç keşfi ve moleküler modelleme gibi alanlarda kullanılması amacıyla 2010 yılında kullanıma sunulan ve 2021 yılında AutoDock Vina 1.2.0 sürümü ile güncellenen[22] protein ligand etkileşmelerini tahmin etmeye çalışan bir moleküler kenetleme yazılımıdır.

AutoDock Vina, GNU (GNU Unix değildir) Genel Kamu Lisansı (GPL) altında lisanslanmış açık kaynak kodlu bir yazılımdır. Bununla birlikte, çok çekirdekli merkezi işlem birimi (CPU) ve grafik işlem birimi (GPU) üzerinde paralel olarak çalışmakta ve moleküler kenetleme sürecini otomatik şekilde yapabilir. Aynı zamanda, grafik arayüzüne sahip olması ve Windows, Mac ve Linux işletim sistemlerinde çalışabilmesi yaygın bir şekilde kullanılmasına vesile olmuştur.

#### **3.4.3.1. AutoDock Vina Arama Algoritması**

AutoDock Vina geliştirilirken, arama sürecini hızlandırmak adına stokastik arama algoritmalarından GA[118], PSO[95,96] ve Benzetilmiş tavlama[119] “*Simulated Annealing*” (SA) ile çeşitli yerel optimizasyon metotları incelenmiş. Nihai olarak, Abagyan[120] yapmış oldukları çalışmada bahsedilen global optimizasyona benzeyen “*Iterated Local Search Global Optimizer*” “*Yenilenen Yerel Arama Global Optimize Edici*[121,122]” arama algoritması kullanılmıştır. Bu algoritma Metropolis kriterine[89] görüne kabul edilen bir mutasyon ve yerel optimizasyon adımı içeren hibrit bir algoritmadır. Yerel arama için, yalnızca puanlama fonksiyonun değerini değil, aynı zamanda argümanlarına (konum, oryantasyon, aktif dönebilir bağlar ve esnek rezidüler) göre gradyanını kullanan bir yarı-Newton metodu olan Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno[123] (BFGS) algoritması kullanılmıştır[23].

#### **3.4.3.2. AutoDock Vina Puanlama Fonksiyonu**

AutoDock Vina yazılımında, geliştiricileri tarafından türetilen ve “*Vina Scoring Function*” “*Vina Puanlama Fonksiyonu*” olarak adlandırılan konsensus sınıfına ait, bir bilgi tabanlı ve ampirik puanlama fonksiyonun kombinasyonundan türetilmiş puanlama fonksiyonu kullanılır. Fonksiyon geliştirilirken genel olarak X-Score[111]’ dan esinlenilmiş ancak ondan farklı olarak doğrusal olmayan regresyon kullanılmıştır.

Buna ek olarak, Vina puanlama fonksiyonu hem molekül içi hem de moleküller arası katkıları, X-Score ise sadece moleküller arası katkıları dikkate alarak konformasyonları sıralar. X-Score’a benzer şekilde puanlama fonksiyonunu ayarlamak amacıyla

PDBbind[124,125] kullanılmıştır. Puanlama fonksiyonunda, deneysel afinite ölçümleri ve protein-ligand komplekslerinin konformasyonları ile bilgi-tabanlı potansiyeller kullanılmıştır[23]. Vina puanlama fonksiyonunun konformasyona bağımlı genel formu şu şekildedir:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (3.11)$$

Burada, her  $i$  ve  $j$  atomunun tipi  $t_i$  ve  $t_j$  ile atanır, atomlar arası mesafe  $r_{ij}$  ve bir simetrik etkileşimler fonksiyonları kümesi  $f_{t_i t_j}$  ile tanımlanır.

Eşitlik (3.11)'deki toplam, 1-4 etkileşimleri yani, ardışık üç kovalent bağla birbirinden ayrılan atomlar hariç, birbirine göre hareket eden tüm atom çiftleri üzerindedir. Bu  $c$  değeri moleküller arası ve molekül içi katkıların toplamıdır.

$$c = c_{arası} + c_{içi} \quad (3.12)$$

Bölüm 3.4.3.1'de bahsedilen puanlama fonksiyonu değeri Eşitlik (3.11)'teki  $c$  değeridir.

Algoritma bu değeri kullanarak global minimumu yani, en iyi konformasyonu bulmaya çalışır.  $s_1$  olarak atanan, tahmin edilen serbest bağlanma enerjisi Eşitlik (3.13)' de verildiği gibi en düşük puanlı konformasyonun moleküller arası kısmından hesaplanır.

$$s_1 = g(c_1 - c_{içi 1}) = g(c_{arası 1}) \quad (3.13)$$

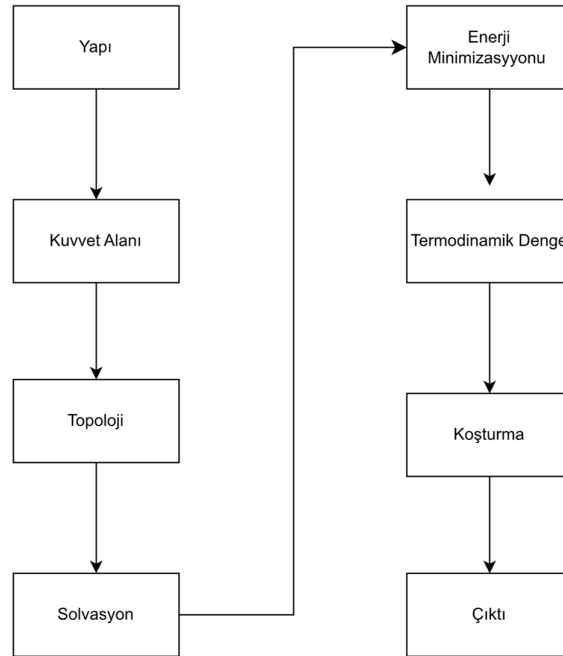
Burada,  $g$  fonksiyonu keyfi, kesinlikle düzgün artan ve muhtemelen doğrusal olmayan bir fonksiyon olabilir. Çıktıda, diğer düşük puanlı konformasyonlara  $s$  değerleri verilir, ancak sıralamayı korumak adına Eşitlik (3.14) ile en iyi bağlanma modu kullanılır.

$$s_i = g(c_i - c_{iç1}) \quad (3.14)$$

### 3.5. Moleküler Dinamik Simülasyonu

MD simülasyonları, birtakım algoritmalar ve yazılımlar aracılığı ile moleküler sistemlerin davranışlarının incelendiği sayısal bir yöntemdir. Esasında bu yöntem, moleküllerin hareketlerini taklit ve zaman içerisinde nasıl evrildiğini tahmin eden bir moleküler modelleme tekniğidir.

Tipik olarak MD simülasyonu Şekil 3.4’de gösterildiği gibi; başlangıçta sistemin başlangıç konumları ve hızları belirlenir. Sistemin içindeki her atom veya molekül, diğer atom veya molekülleri ile etkileşime girer ve bundan dolayı potansiyel enerjiye sahip olurlar. Sonraki adımda, Newton’un hareket yasalarına göre her bir atom veya molekülün konum ve momentumları hesaplanır. Bu momentum ve konumlar bir sonraki  $t_i$  zamanında atomların veya moleküllerin konum ve momentumlarını hesaplamakta kullanılır. Bu adımlar simülasyon için belirlenen zaman aralığı boyunca tekrarlanır ve sistemdeki parçacıkların yörüngeleri oluşturulur. Son olarak elde edilen verilerden sistemin istenilen analizleri yapılır.



Şekil 3.4 Tipik bir MD simülasyonu protokolü.

N atomlu bir sistemde  $i$ . atomun konumunu  $\vec{r}_i$  ve  $i$  ise kütleini,  $\vec{F}_i$   $i$ . atom üzerine  $t$  anında etkiyen kuvveti ve  $U_i$  ise  $i$ . atomun potansiyel enerjisini temsil eder. Çok parçacıklı bir sistem için  $i = 1, 2, 3, \dots, N$  olmak üzere analitik olarak yörünge hesabı:

$$\vec{F}_i(t) = \frac{d\vec{P}_i(t)}{dt} = m_i \frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} = -\vec{\nabla}U_i(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots, \vec{r}_N) \quad (3.15)$$

$$\frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{a}_i(t) = \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} = -\frac{1}{m_i} \vec{\nabla}U_i(\vec{r}_i) \quad (3.16)$$

$$\frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} = \vec{v}_i(t) = \vec{v}_0 + \vec{a}_i(t)t \quad (3.17)$$

$$\vec{r}_i(t) = \vec{r}_0 + \vec{v}_0t + \frac{1}{2}\vec{a}_i(t)t^2 \quad (3.18)$$

Eşitlik (3.15)'da verilen hareket denklemi ile yapılır. Eşitlik (3.15)'un düzenlenmesi ile Eşitlik (3.16) verilen  $t$  anında  $i$ . atomun  $\vec{a}_i(t)$  ivme vektörü elde edilir. Eşitlik (3.15)'un bağımsız değişken ( $t$ ) zamana göre integrali alındığında Eşitlik (3.17)'de verilen  $t$  anında  $i$ . atomun  $\vec{v}_i(t)$  hız ve Eşitlik (3.18)'de verilen  $i$ . atomun  $\vec{r}_i(t)$  konum vektörü elde edilir.

Bu denklemlere bakıldığında yörünge hesaplanabilmesi başlangıç konumuna, başlangıç hızına ve ivmeye veya başka bir deyişle potansiyele ihtiyaç olduğu görülür. Bu bilgiler kuvvet alanlarından ve istatiksels kümeler için kullanılan algoritmalarından elde edilir.

Moleküler dinamik simülasyonların ana amacı; belirli bir istatiksels küme altında, sistemin dinamik evrimini takip etmek ve ortalama termodinamik özelliklerini elde etmektir. Sistemin dinamik evrimi Eşitlik (3.15) ile verilen hareket denklemi tarafından kontrol edilir ve sistemi oluşturan  $i$ . atomun konumu bu eşitliğin integralinin alınmayla elde edilir.

### 3.5.1. Moleküler Dinamikte İstatiksel Kümeler

İstatistik mekanikte faz uzayı, konum ( $\vec{r}$ ) ve momentum ( $\vec{p}$ ) noktalar olarak ele alındığı çok boyutlu bir uzaydır. Faz uzayında sistemin durumu bir nokta ile tanımlanır. Sistemin termodinamik durumu ise, basınç (P), parçacık sayısı (N), sıcaklık (T) gibi parametreler ile belirlenir.

İstatistik mekanikte kümeler, faz uzayında belirli termodinamik durumların şartlarını sağlayan birbirinden bağımsız konum ve momentumlara sahip parçacıkların oluşturduğu topluluklar olarak tanımlanır. Sistemin bulunduğu koşullara göre bazı kümeler parçacık sayısı N, hacim V, sıcaklık T, basınç P ve kimyasal potansiyel  $\mu$  olmak üzere şu şekilde sınıflandırılır;

- Mikrokanonik (NVE) küme: Sistemin toplam enerjisi, hacmi ve sistemdeki parçacık sayısının her birinin sabit bir değerde olduğu adiyabatik süreçlere karşılık gelir.
- Kanonik (NVT) küme: Sistemin parçacık sayısı, hacim ve sıcaklığın sabit olduğu fakat, enerjinin dalgalandığı bir küme olarak değerlendirilir.
- İzobarik-izotermik (NPT) küme: Sistemin sabit sıcaklık ve basınçta olduğu istatiksel bir kümedir.

### 3.5.2. İntegrasyon Algoritmaları

Moleküler dinamik simülasyonlarında kullanılan kuvvet alanları, analitik çözümleri olmayan sürekli potansiyel fonksiyonları içerir. Dolayısıyla, hareket denklemleri analitik değil sayısal yöntemlerle çözülür. Eşitlik (3.15)'da ki gibi adi diferansiyel denklemlerin sayısal çözümleri sonlu farklar yaklaşımı ile yapılır.

Bu yöntem, tam integrasyonu bir molekülün kendi uzunluğunu kat etmesi için geçen tipik süreden çok daha küçük  $\delta t$  zaman aralıklarına bölerek her bir parçacığın toplam kuvvetini,  $t + \delta t$  zamanı boyunca diğer parçacıklarla olan etkileşimlerinin vektörel toplamını alarak hesaplar. Böylelikle  $t$  anında verilen atomların konum, hız ve diğer

dinamik bilgileri kullanarak, daha sonraki bir  $t + \delta t$  zamanında konum, hız ve ivme gibi sistemin dinamikleri hesaplanır[126].

Bu integrasyon yöntemi ile geliştirilen ve MD simülasyonlarında sıklıkla kullanılan Verlet[127], Hız (Velocity)-Verlet[128] ve Leap-frog[129] gibi birçok algoritma sistemin hız ( $v_i$ ), konum ( $r_i$ ) ve ivme ( $a_i$ ) gibi dinamik değişkenlerini Taylor Seri Açılımı yöntemini kullanarak tahmin ederler[130].

### 3.5.2.1. Verlet Algoritması

Moleküler dinamik simülasyonlarında Verlet algoritması, yaygın olarak kullanılan integrasyon algoritmalarından biridir. ( $t + \Delta t$ ) ile ( $t - \Delta t$ ) zaman aralığında  $r_i$  konuma sahip  $i$ . parçacığın konumu;

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \frac{1}{3!} \frac{d^3\vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + O(\Delta t^4) \quad (3.19)$$

$$\vec{r}_i(t - \Delta t) = \vec{r}_i(t) - \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 - \frac{1}{3!} \frac{d^3\vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + O(\Delta t^4) \quad (3.20)$$

Verlet algoritmasında konumdaki hata  $O(\Delta t^4)$  ile ifade edilir. Eşitlik (3.19) ile Eşitlik (3.20)'ü alt alta toplanır ve  $\frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{a}_i(t) = \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} = -\frac{1}{m_i} \vec{\nabla}_i V(\vec{r}_i(t))$  düzenlemesi yapılırsa;

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) + \vec{r}_i(t - \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) + \frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (3.21)$$

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) - \frac{1}{m_i} \vec{\nabla}_i V(\vec{r}_i(t)) \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (3.22)$$

Verlet algoritması olarak bilinen Eşitlik (3.22) elde edilir. Bu algoritma parçacıkların konumlarını hız bilgisi olmadan elde eder. Açık bir hız ifadesinin olmamasında dolayı sistemin kinetik enerji bilinemez ve sistemin toplam enerjisinin korunumu test edilemez, bu da algoritmanı önemli bir eksikliğidir.

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{r}_i(t + \Delta t) - \vec{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (3.23)$$

Eşitlik (3.23) kullanılarak hızlar hesaplanabilir fakat bir sonraki konumlar hesaplanana kadar o anki hızlar bilinemez dolayısıyla, Verlet algoritması bir sonraki t anında ki hızlar hakkında bilgi vermez. Dolayısıyla bu algoritma kendi kendini başlatamaz[131].

### 3.5.2.2. Leapfrog Algoritması

Verlet algoritmasının eksikliği olan bir sonraki konumlar hesaplanana kadar o andaki hızların hesaplanamaması sorununu çözmek adına Leapfrog algoritması geliştirilmiştir. Sorunu çözmek adına türev için bir yaklaşım kullanır,  $t$  ve  $\Delta t$  zamanın tam ortasındaki  $\vec{v}_i(t)$  hızı dikkate alınır.

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) - \frac{\Delta t}{m_i} \vec{\nabla}_i V(\vec{r}_i(t)) \quad (3.24)$$

Eşitlik (3.24) Leapfrog algoritması olarak bilinir. Bu algoritma orijinal Verlet algoritmasından; açık hız ifadesi ile hız yuvarlama hatasından kaynaklanan doğruluk kaybının giderilmesi gibi iki önemli avantaja sahiptir. Fakat, aynı şekilde bu algoritma da kendi kendini başlatamama sorununa sahiptir. [131].

### 3.5.2.3. Hız Verlet Algoritması

Hız Verlet algoritması, hız ve konumu aynı anda hesaplanması konusunda Leapfrog algoritmasına benzemektedir[131].



$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} \Delta t - \frac{1}{2!} \frac{1}{m_i} \vec{\nabla}_i V(\vec{r}_i(t)) \Delta t^2 \quad (3.25)$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) - \frac{1}{2!} \frac{1}{m_i} \vec{\nabla}_i V(\vec{r}_i(t)) \Delta t \quad (3.26)$$

Bu algoritma  $i$ . atomun konumunu  $\Delta t$  süre sonra  $\vec{r}_i$  konumunu ve  $\frac{\Delta t}{2}$  ile  $\Delta t$  süre sonraki  $\vec{v}_i$  konumunu; Eşitlik (3.25) ve Eşitlik (3.26) ile hesaplanır.

### 3.5.3. Enerji Minimizasyon Algoritması

Kararlı proteinler en düşük serbest enerjiye sahip oldukları konformasyonlarda bulunurlar. Bu nedenle moleküler dinamik simülasyonlarında enerji minimizasyonu adımı, minimum enerji konformasyonuna yakın bir başlangıç yapısını elde etmek için oldukça önemlidir. Genel olarak enerji minimizasyonun amacı, bir sistemin potansiyel enerjisini minimum yapacak atomik konumları bulmaktır. Bu amaca ulaşmak için, sistemin potansiyel enerjisi minimuma düşüne kadar sistemdeki atomların konumları yinelemeli olarak değiştirilir. Bu bağlamda sistemi minimum enerji haline getirmek amacıyla birçok algoritma geliştirilmiştir. Moleküler dinamik simülasyonlarında En Dik İniş (Steepest Descent) algoritması en yaygın kullanılan algoritmalardan biridir.

#### 3.5.3.1. En Dik İniş Algoritması

En Dik İniş (Steepest Descent) algoritması sistemin potansiyel enerji fonksiyonunun minimumunu bulmak için kullanılan bir algoritmadır. Bu algoritmanın amacı, atomların mevcut konumunu, potansiyel enerji fonksiyonunun negatif gradiyenti yani en dik iniş yönünde bir adım atarak minimum potansiyele ulaşana kadar yenilemesidir.

Algoritma bir minimum potansiyele yakınsadığında veya kullanıcı tarafından belirlenen adım sayısında veya kullanıcı tarafından durdurulana kadar çalışmaya devam iteratif bir algoritmadır.

Algoritmanın adımları şu şekildedir;

1. Başlangıç konumu  $\vec{r}_n$  belirlenir
2.  $\vec{r}_n$  konumunda  $\vec{F}_n$  kuvveti hesaplanır
3. Adım boyutu  $h_n$ , maksimum yer değiştirme seçilir
4. Negatif gradiyent yönünde bir adım atarak mevcut konum  $\vec{r}_{n+1} = \vec{r}_n + \frac{\vec{F}_n}{\max(|\vec{F}_n|)} h_n$  ile yenilenir.
5.  $\vec{r}_{n+1}$  yeni başlangıç konumu olarak seçilir ve 2-4 adımları belirlenen durma kriteri sağlana kadar tekrarlanır.

Herhangi bir atomun en büyük kuvvet  $|\vec{F}_n|$  ifadesiyle temsil edilir. Algoritmanın durma kriteri şu şekildedir;

- Eğer  $V_{n+1} < V_n$  ise, yeni konumlar kabul edilir ve algoritma çalışmaya devam eder.
- Eğer  $V_{n+1} \geq V_n$  ise, yeni konumlar reddedilir ve algoritma durur.

Moleküler sistemlerin en düşük enerjilerini hesaplamada kullanılan En Dik İniş algoritması uygulaması kolay ve güçlü bir algoritmadır[132].

### 3.5.4. Sıcaklık Çiftlenimi Algoritmaları

Proteinler gibi biyomoleküllerin yapıları, davranışları ve fonksiyonları sıcaklık değişimlerinden oldukça etkilenir. Bu nedenle, MD simülasyonlarında sistemlerin davranışı ve analizlerin doğru yorumlanabilmesi için sıcaklığın kontrol edilmesi oldukça kritiktir. Moleküler dinamik simülasyonları çoğu zaman sıcaklığın sabit olduğu kanonik (NVT) kümesi ile yapılır. Sıcaklık çiftlenimi algoritmaları, moleküler dinamik simülasyonlarında da olduğu gibi çok parçacıklı ve parçacıklar arasında farklı sıcaklıkların olduğu sistemlerde sıcaklığı dengelemek için kullanılır.

Sıcaklık çiftlenimi algoritmaları, sıcaklık dengesini sağlamak için sistemle etkileşerek, termostat olarak adlandırılan sistemin sıcaklığını belli değerde tutmaya çalışan özel parçacıklar kullanırlar. Bu parçacık topluğu esasen bir ısı tankı görevi görür. Bunu yapabilmek için sistemin sıcaklığını ölçer ve eğer istenilen sıcaklıktan farklı ise o değeri sağlayacak hareket denklemlerini kullanarak sistemdeki parçacıkların hareket etmesini sağlarlar.

Sıcaklık kontrolünü sağlamak adını pek çok sıcaklık çiftlenimi algoritması geliştirilmiş olup Brendensen[133] ve Hız Ölçeklendirme[134] sıcaklık çiftlenimi gibi algoritmalar moleküler dinamik simülasyonlarında yaygın olarak kullanılanlardan bazılarıdır.

### 3.5.4.1. Brendensen Sıcaklık Çiftlenimi

Brendensen termostadı olarak da bilinen Brendensen sıcaklık çiftlenimi,  $T_0$  sıcaklığında harici bir ısı tankıyla birinci dereceden kinetikler ile zayıf çiftlenimi taklit eder[135].

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (3.27)$$

Bu algoritmada,  $T_0$  sıcaklığındaki sistemin  $T_0$  'dan sapmasını Eşitlik (3.27)' e göre yavaşça düzeltilir. Sıcaklık sapması,  $\tau$  sıcaklık çiftlenimi zaman sabiti ile üstel olarak azalır. Bu çiftlenim algoritması, kullanıcı gereksinimlerine göre çiftlenim gücünün değiştirebilmesi ve uyarlanabilmesi avantajını sağlar. Kinetik enerjideki dalgalanmaları bastırdığından dolayı Brendensen sıcaklık çiftlenimi algoritması, kanonik küme oluşturmaz. Ancak, buradaki hata  $1/N$  ile ölçeklendiğinden dolayı, çok büyük sistemlerde kinetik enerjideki dalgalanmalar haricinde çoğu küme ortalamaları bundan etkilenmez fakat, ısı kapasitesi gibi dalgalanma özellikleri etkilenir.

$$\lambda = \left[ 1 + \frac{\eta_{TC}\Delta t}{\tau_T} \left( \frac{T_0}{T\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right)} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.28)$$

Sisteme giren ve çıkan ısı akışı, her adımda veya her  $\eta_{TC}$  adımında Eşitlik (3.28) ile verilen zamana bağlı  $\lambda$  faktör ile her bir parçacığın hızlarının ölçeklendirilmesinden etkilenir.

Burada  $\tau_T$  parametresi Eşitlik (3.27)'de verilen  $\tau$  zaman sabitine yakın bir değerdedir.  $C_V$  sistemin ısı kapasitesi,  $N_{df}$  toplam serbestlik derecesi sayısı ve  $k$  Boltzmann sabiti olmak üzere  $\tau$  ile  $\tau_T$  arasındaki ilişki Eşitlik (3.29)'deki gibidir.

Hız ölçeklendirilmesinden kaynaklanan kinetik enerjideki değişim, kinetik ve potansiyel enerji arasında yeniden dağıtılır. Sıcaktan kaynaklanan değişimden dolayı  $\tau$  ile  $\tau_T$  birbirlerine yakın değerleri alır.

$$\tau = \frac{2C_V\tau_T}{N_{df}k} \quad (3.29)$$

$$\Delta E_k = (\lambda - 1)^2 E_k \quad (3.30)$$

Kinetik enerji, Eşitlik (3.30) ile verilen ifade ile her ölçeklendirme adımında değiştirilir. Korunan enerji miktarını elde etmek adına, simülasyon boyunca yapılan bu değişikliğin toplanır ve toplam enerjiden çıkarılır[132].

### 3.5.4.2. Hız Yeniden Ölçeklendirme Sıcaklık Çiftlenimi

Doğru bir kinetik enerji dağılımı elde etmek adına, Brendensen sıcaklık çiftlenimine Eşitlik (3.31) ile verilen bir stokastik terimi eklenerek Hız yeniden ölçeklendirme termostatu geliştirilmiştir.

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_t} + 2 \sqrt{\frac{KK_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (3.31)$$

Burada  $K$  kinetik enerjiyi,  $N_f$  serbestlik derecesi sayını ve  $dW$  ise bir Wiener sürecini temsil eder.

Hız ölçeklendirme sıcaklık çiftlenimi, salınım olmaması ve sıcaklık sapmalarının birinci mertebeden azalması gibi avantajlarla birlikte aynı zamanda doğru bir kanonik küme de üretir[132].

### 3.5.5. Basınç Çiftlenimi Algoritmaları

Basınç çiftlenimi algoritmaları, parçacıkların farklı basınçlar altında hareket ettiği çok parçacıklı sistemlerde basıncı dengelemek için sistemin hacmi ile enerjisi arasında ilişkiyi bir basınç tankı olan barostatlar ile yaparlar. Barostatlar sistemin içindeki parçacıkların hacmini değiştirerek basıncı ayarlayan araçlardır. İzobarik (NPT) kümesini üretmek için MD simülasyonlarında Brendensen[133] ve Parrinello-Rahman[136] basınç çiftlenimleri yaygın olarak kullanılanlardan bazılarıdır.

#### 3.5.5.1. Brendensen Basınç Çiftlenimi

Brendensen basınç çiftlenimi algoritması, konumları ve kutu vektörlerini her adımda veya her  $\eta_{PC}$  adımında Eşitlik (3.32)'e göre belirli  $\mathbf{P}_0$  referans basıncına doğru birinci dereceden kinetik gevşeme etkisine sahip bir  $\boldsymbol{\mu}$  matrisi (Eşitlik(3.33)) ile yeniden ölçeklendirir.

$$\frac{d\mathbf{P}}{dt} = \frac{\mathbf{P}_0 - \mathbf{P}}{\tau_p} \quad (3.32)$$

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{\eta_{PC}\Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad (3.33)$$

$\beta$ , sistemin izotermal sıkıştırılabilirliğini ifade eder. Bu değer, ortalama basıncı etkilemeden yalnızca basınç gevşemesinin kritik olmayan zaman sabitini etkiler. Bu çiftlenim algoritmasında hız ölçeklendirilmez ve döndürülmez.

Hareket denklemleri basınç bağıntısıyla değişir bu da korunan enerji miktarının da değiştirilmesini gerektirir. Birinci dereceden basınç bağıntısı için, her adımda basınç çiftleniminin sisteme uyguladığı iş, korunan enerji miktarını elde etmek için toplam enerjiden çıkartılır:

$$-\sum_{i,j}(\mu_{ij} - \delta_{ij})P_{ij}V = \sum_{i,j} 2(\mu_{ij} - \delta_{ij})\Xi_{ij} \quad (3.34)$$

Burada  $\delta_{ij}$ , Kroncker deltadır ve  $\Xi$  viraldir. Brendensen basınç çiftlenimi algoritmasını doğru ortalama basınçla bir simülasyon vermesine rağmen, tam olarak NPT kümesini sağlamaz[132].

### 3.5.5.2. Parrinello-Rahman Basınç Çiftlenimi

Nosé-Hoover[137] sıcaklık çiftleniminin gerçek bir kanonik kümeyi üretmesi gibi Parrinello-Rahman basınç çiftlenimi de gerçek bir izobarik (NPT) kümesi üretir.

Bu algoritma, sistemin titreşim modlarını açıklayan bir matris denklemine dayanır. Eşitlik (3.35) ile gösterilen kutu vektörleri  $\mathbf{b}$  matrisi, matris hareket denklemine uyar.

$$\frac{d\mathbf{b}^2}{dt^2} = V\mathbf{W}^{-1}\mathbf{b}'^{-1}(\mathbf{P} - \mathbf{P}_{ref}) \quad (3.35)$$

Burada  $\mathbf{P}$  ve  $\mathbf{P}_{ref}$  matrisleri sırasıyla mevcut ve referans basınçları iken ' işaretli matrisin transpozisyonunu,  $V$  kutunun hacmi  $\mathbf{W}^{-1}$  ile verilen çiftlenim gücünü belirleyen bir matris parametresidir.

$$(W^{-1})_{ij} = \frac{4\pi^2\beta_{ij}}{3\tau_p^2L} \quad (3.36)$$

Eşitlik (3.36) ile verilen  $W^{-1}$  ters kütle parametre matrisi çiftlenimin gücünü ve kutunun nasıl deforme olacağını belirler. Yaklaşık izotermal sıkışabilirlik  $\beta$ , basınç zaman sabiti  $\tau_p$  ve en büyük kutu matris elementi  $L$  ile temsil edilmiştir [132].

### 3.5.6. Kısıtlama Algoritmaları

Moleküler dinamik simülasyonlarında, atomlar arası bağların gerilme hareketleri ile bağlar arasındaki açığı değiştiren bükülme hareketleri ve dihedral açıları değiştiren burulma hareketleri de hesaplanır. Ancak, simülasyon sırasında atom veya moleküllerin bağ uzunlukları veya bağ açıları bazı sınırları aşabilirler.

Bu durum sistemin geometrisini ve kararlılığını istikrarsız hale gelmesine neden olur. Bu nedenden dolayı moleküler dinamik simülasyonlarında sisteme bazı kısıtlamalar uygulanır. Bu algoritmalar atomlar ve moleküllerin pozisyonları veya hareketlerine kısıtlamalar getirerek sistemin kararlı olmasını sağlamaya çalışır. MD simülasyonlarında bağ uzunluğu ve bağ açısı kısıtlamaları; iç koordinatlar, açık kısıtlama kuvvetleri ve örtük kuvvet kısıtlama çözücülerini ile yapılır. Açık kısıtlama kuvvetleri zaman adımını çok kısalttığı için hesaplama açısından diğer kısıtlama türlerine göre daha az verimlidir bu sebeple, MD simülasyonlarında genellikle iç koordinatlar ve örtük kuvvet çözücülerini kullanılır.

#### 3.5.6.1. SHAKE Algoritması

SHAKE [138] algoritması, kovalent olarak bağlı atomların bağ uzunluklarını korumak için kullanılır. Bu algoritma atomların pozisyonlarını ayarlayarak bağ uzunluklarının kabul edilebilir sınırlar içinde olmasını sağlar. Referans  $r$  kümesi koordinatlarını kullanarak kısıtlanmamış  $r'$  koordinatları kümesini:

$$SHAKE(\vec{r}' \rightarrow \vec{r}''; \vec{r}) \quad (3.37)$$

Eşitlik (3.37)'de gösterildiği gibi mesafe kısıtlamalarını karşılayan bir  $\vec{r}''$  koordinatları kümesine dönüştürür. Bu kısıtlama hareket denklemlerine bir dizi Lagrange çarpanın eklenmesi ile gerçekleşir ve yenilenmiş denklemler çözülür. SHAKE göreceli bir toleransa sahiptir; bu tolerans dahilinde tüm kısıtlamalar gerçekleşene kadar algoritma çalışmaya devam eder. Eğer, sapma çok büyükse veya belirli bir yineleme sayısı aşılsa SHAKE koordinatları sıfırlayamaz ve hata verir. Hareket denklemleri Eşitlik (3.38)'deki gibi K holonomik kısıtlamasını karşıladığı kabul edilirse;

$$\sigma_k = (\vec{r}_1 \dots \vec{r}_N) = 0; \quad k = 1, \dots, K \quad (3.38)$$

$$-\frac{\partial}{\partial \vec{r}_i} \left( V + \sum_{k=1}^K \lambda_k \sigma_k \right) \quad (3.39)$$

$$\vec{G}_i = - \sum_{k=1}^K \lambda_k \frac{\partial \sigma_k}{\partial \vec{r}_i} \quad (3.40)$$

Kuvvetler Eşitlik (3.39) olarak tanımlanır ve  $\lambda_k$  kısıtlamayı getiren Lagrange çarpanına karşılık gelir (Eşitlik (3.39)). Eşitlik (3.40) ile verilen kısıtlama kuvvetidir. Bu eylem, kısıtlı hareket denklemlerinde bir dizi Lagrange çarpanının çözülmesiyle tutarlıdır[132].

### 3.5.6.2. LINCS Algoritması

LINCS[139] (Linear Constraint Solver), SHAKE'e benzer ancak kısıtlamaları çözmek için farklı bir matematiksel yaklaşım kullanır. Kovalent olarak bağlı atomların bağ uzunluklarını ve açılarını korumak için kullanılır.

LINCS, matrislere dayalı bir algoritma olup iki aşamalı bir algoritmadır dolayısıyla iteratif değildir. Kısıtlanmamış koordinatlar güncellendikten sonra bağları doğru



uzunluklarına getirir. Bu yöntem SHAKE'den daha hızlı ve kararlıdır ancak, yalnızca OH'daki proton açısı gibi izole edilmiş açı kısıtlamaları ile kullanılabilir[132].

### 3.5.7. GROMACS Yazılım Paketi

GROMACS, (Groningen Machine for Chemical Simulations)[25] (<https://www.gromacs.org/>) Hollanda'da Groningen Üniversitesi'nde geliştirilmiş ve 1991 yılında piyasaya sürülmüş bir açık kaynak kodlu ve GNU (GNU Unix değildir) Kısıtlı Genel Kamu Lisansı (LGPL) lisanslanmış bir yazılım paketidir. Günümüzde halen geliştirilmeye devam edilen GROMACS, hesaplamalı kimya uygulamalarında moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirmek amacıyla kullanır. Ücretsiz olması, çapraz platformlarda çalışabilmesiyle birlikte son yıllarda ve GPU destekli sürümlerinin kullanıma sunulmasıyla birlikte GROMACS yaygın olarak kullanılan moleküler dinamik simülasyon aracı olmuştur.

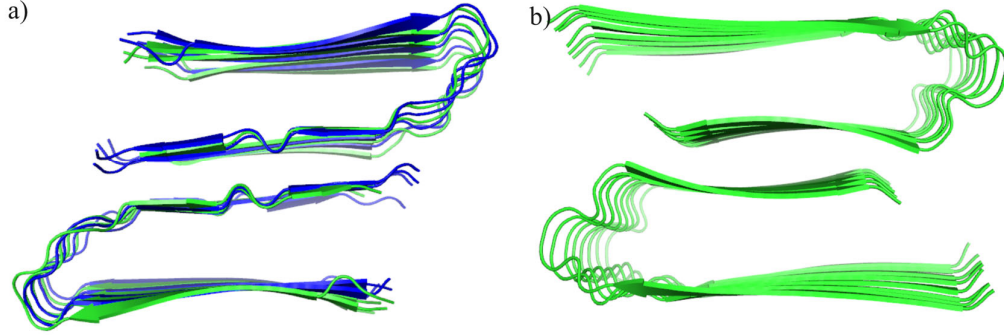


## 4. SİMÜLASYON ÇALIŞMASI

Tez çalışmasının bu bölümünde, moleküler dinamik (MD) simülasyonlarını gerçekleştirmek için gerekli olan bileşenler temin edilmesi, moleküler kenetleme (molecular docking) ve MD simülasyonlarında kullanılan parametreler hakkında bilgiler verilmiştir. Bölümün son alt başlığı, MD simülasyonlarının çıktılarının hangi yazılım ile nasıl analiz edildiği ve analizlerin değerlendirilmesi içerir.

### 4.1. Bileşenlerinin Temini

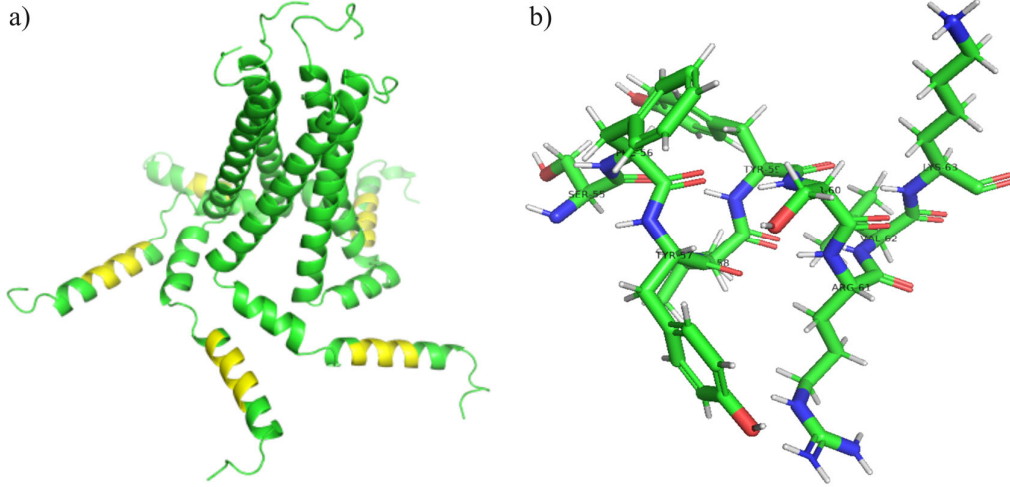
Sistemin başlangıç koordinatları, Şekil 4.1’de gösterilen PDB kimlik numarası: 6TI7[21] olan heterojen (A $\beta$ 40/A $\beta$ 42) ve PDB kimlik numarası: 6TI5[21] olan homojen (A $\beta$ 40) iki katlı sekiz katmanlı (2F8L) fibril modelleri, Protein Veri Bankası (PDB) tanımlayıcılarının NMR yapısından elde edilmiştir.



Şekil 4.1 NMR yapılarından elde edilen fibril modelleri: a) heterojen ve b) homojen fibril modeli. A $\beta$ 42 zincirleri mavi ve A $\beta$ 40 zincirleri yeşil renk ile gösterilmiştir.

Michigan Eyalet Üniversitesi, FEIG Hesaplamalı Biyofizik Laboratuvarı tarafından yapısı çözülen SARS-COV-2 virüsünün zarf proteini (E-protein/Envelope-protein) laboratuvarın <https://github.com/feiglab> sayfasından elde edilmiştir. Daha sonra zarf proteininden, amiloidojenik Ser<sup>55</sup>PheTyrValTyrSerArgValLys<sup>63</sup> (SK9) peptidi izole

edilmiştir. Şekil 4.2’de bahsi geçen zarf proteini ve amiloidojenik SK9 peptitinin bir görseli verilmiştir.



Şekil 4.2 a) SARS-COV-2 zarf proteini. Sarı renge boyanmış bölgeler SK9 peptitini temsil eder. (b) Çubuk gösterimiyle SK9 peptiti ve rezidüleri.

#### 4.2. Sistem Hazırlığı

MD simülasyonunda kullanılacak olan on altışar SK9 içeren heterojen fibril (6TI7-SK9) ve homojen fibril (6TI5-SK9) kompleks sistemlerinin, başlangıç konfigürasyonlarını oluşturmak adına AutoDock Vina[22,23] moleküler kenetleme yazılımının güncel sürümü olan AutoDock Vina v.1.2.3 The Scripps Araştırma Enstitüsü’ nün <https://github.com/ccsb-scripps> sayfasından temin edilmiştir. Bahsi geçen heterojen ve homojen fibril modelleri, AutoDock Vina[22,23] v.1.2.3 yazılımı kullanılarak SK9 peptiti ile 1:1 oranında kenetlenmiştir. Heterojen ve homojen fibril modelleri 2F8L sistemlerden oluştuğu için her iki sistem de toplam 16 adet monomerden oluşur. Bu nedenden dolayı, iki sistem için SK9 kenetleme işlemi 16 defa tekrarlanmıştır.

Heterojen ve homojen fibril modelleriyle SK9’un moleküler kenetleme simülasyonunda sistemlere uygulanan parametreler şu şekildedir: tüm sistemler için üç-boyutlu arama uzayı, kenar uzunluğu 200 Å olan bir küp olarak belirlenmiştir.

Arama uzayının çözünürlüğü 0.375 Å olarak belirlenmiştir. Kenetleme sürecinde arama uzayında global minimum bulmak için kenetleme tekrar sayısı 80 olarak belirlenmiş ve simülasyonlarda 80 CPU kullanılmıştır.

Heterojen fibril modelini içeren sistemin arama uzayının merkezi;  $x = 0.241$  Å,  $y = 0.006$  Å ve  $z = -0.031$  Å koordinatları olarak belirlenmiştir. Homojen fibril modelini içeren sistemin arama uzayının merkezi;  $x = -1.084$  Å,  $y = 6.029$  Å ve  $z = 1.589$  Å noktaları olarak seçilmiştir.

MD simülasyonların hazırlanması ve gerçekleştirilmesi, TIP3P[71] su modeli ile CHARMM36m[24] tüm atomlu kuvvet alanı kullanılarak GROMACS-2022.2[25] yazılım paketi ile yapılmıştır. Bu su modeli ve kuvvet alanı fibril sistemlerinin simülasyonlarında başarılı sonuçlar gösterdiği için tercih edilmiştir[140]. MD simülasyon hazırlığının ilk aşamasında protein ligand kompleks sistemleri için, proteinlerin biyolojik ortamdaki durumunu simüle etmek adına: heterojen ve homojen fibril modellerinin monomerlerinin amino ucu  $NH_3^+$  ve karboksil ucu  $COO^-$  grupları ile SK9 peptitlerinin ise amino ucu  $NH_3^+$  ve karboksil ucu ise  $-CONH_3$  grupları ile kapatılmıştır.

Her iki sistemde de TIP3P[71] su modeli ile kullanılmıştır. 6TI7-SK9 ve 6TI5-SK9 kompleks sistemlerinin her ikisi periyodik sınır koşulları altında, sistemlerdeki herhangi bir protein-ligand kompleksi atomu ile kutu kenarı arası arasında minimum 12 Å mesafe olacak şekilde bir kübik kutuya su molekülleriyle birlikte koyulmuştur. 6TI7-SK9 kompleks sisteminde kutunun hacmi  $1044.19$  nm<sup>3</sup> olarak hesaplanmış ve içine 31164 adet su molekülü eklenmiştir. 6TI5-SK9 kompleks sisteminde kutu hacmi  $1017.86$  nm<sup>3</sup> olarak hesaplanmış ve için 30308 adet su molekülü eklenmiştir. Her iki sistemin net yükleri +32 Coulomb olarak hesaplanmış ve elektrostatik dengeyi sağlamak adına sistemlere 32 adet  $CL^-$  iyonu eklenerek nötrale edilmiştir.

#### **4.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu Protokolü**

Tüm sistemlerde bağ açılarında, uzunluklarında olabilecek potansiyel moleküller arası ve molekül içi çakışıklığı ortadan kaldırmak ve sistemi 50000 adımda kararlı hale getirmek

adına enerji minimizasyonu En dik iniş algoritması kullanılarak yapılmıştır. Enerjinin istenilen ( $V < 1000.0$  kJ/mol) ulaşması 6TI7-SK9 kompleks sisteminde 683 adım ve 6TI5-SK9 kompleks sisteminin ise 697 adım sürmüştür. Enerji minimizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştikten sonra NVT kümesinde, zaman aralığı 2 fs olarak belirlenmiş ve sistemler 500 ps boyunca 310 K sıcaklığında; Hız Yeniden Ölçeklendirme sıcaklık çiftlenimi[134] ve LINCS[139] kısıtlama algoritması kullanılarak sistemlerin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Hemen ardından NPT kümesinde, zaman aralığı 2 fs olarak belirlenmiş ve 500 ps boyunca 310 K sıcaklığında 1 bar basınçta; Hız-Yeniden Ölçeklendirme sıcaklık çiftlenimi[134], Brendensen[133] basınç çiftlenimi ve LINCS[139] kısıtlama algoritmaları aracılığıyla sistemler dengeye getirilmiştir.

Hidrojen atomları içeren su olmayan bağlar LINCS[139] kullanarak denge uzaklıklarında tutulması sağlanmıştır. Periyodik sınır koşulları nedeniyle, uzun menzilli elektrostatik etkileşimler parçacık ağı Ewald (PME)[141] tekniğiyle; 12 Å' lük bir gerçek alan kesmesi ve 1.6 Å' lük bir Fourier ızgara aralığı kullanılarak hesaplanmıştır. Kısa menzilli van der Waals etkileşimleri 12 Å' de kesilmiş ve yumuşatma 10.5 Å' de başlatılmıştır.

Gerçekleştirilen MD simülasyonlarında 310 K ve 1 bar referans sıcaklık ve basınç olarak ayarlanmıştır. Sıcaklık, çiftlenimi zaman sabiti 0.1 ps seçilerek; Hız Yeniden Ölçeklendirme sıcaklık çiftlenimi[134] algoritması aracılığıyla sabit tutulmuştur. Basınç, çiftlenim zaman sabiti 2.0 ps seçilerek; Parrinello-Rahman basınç çiftlenimi[135] algoritmasıyla sabit tutulmuştur.

İki kompleks sistem için elde edilen sonuçların bağımsızlığını ve istatistiksel olarak anlamlılığını sağlamak adına, farklı başlangıç hız konfigürasyonlarında zaman aralığı 2 fs, simülasyon süresinin 300 ns ve verilerin kaydedilme zaman aralığı 10 ps olarak belirlendiği üç farklı MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### **4.4. Kullanılan Yazılımlar**

Simülasyon hazırlığı bölümünde, moleküler kenetleme aşaması için AutoDock Vina[22,23] ve MD simülasyon aşaması için GROMACS-2022.2[25,132] yazılım paketi

kullanılmıştır. Gerçekleştirilen analizler, GROMACS[25] ve VMD[142] yazılım paketleri aracılığıyla yapılmıştır. Görselleştirme işlemleri PyMOL[143] yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

#### 4.5. Sonuçlar ve Tartışma

Yaptığımız çalışmada, moleküler dinamik (MD) simülasyonu yöntemiyle SK9 varlığında heterojen (A $\beta$ 40/A $\beta$ 42) ve homojen (A $\beta$ 40) fibril modellerinin kararlılığını inceliyoruz. Bu amaç adına ilk olarak, MD simülasyonlarının başlangıç koordinatlarını elde edebilmek için AutoDock Vina[22,23] yazılımını kullanarak moleküler kenetleme (molecular docking) simülasyonları yapılmıştır.

Çizelge 4.1 Heterojen ve homojen fibril modellerinin SK9 ile bağlanma ilginlikleri.

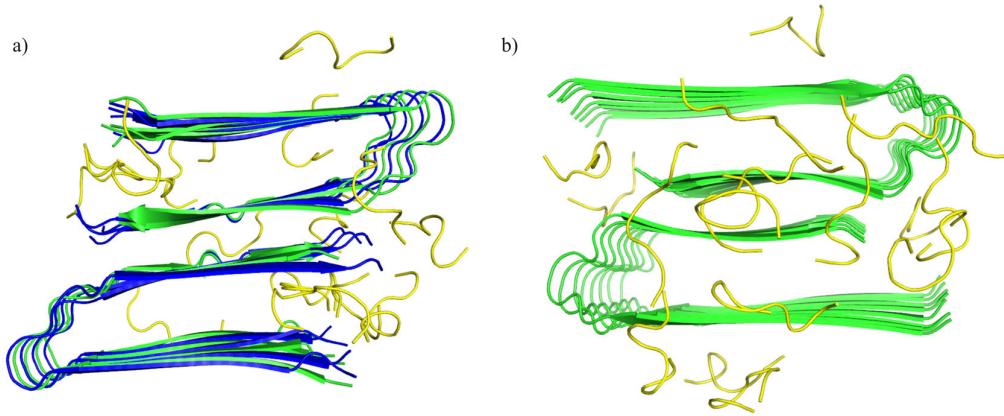
$\Delta G_{ilginlik}$			$\Delta G_{ilginlik}$		
Sıra	HETEROJEN	HOMOJEN	Sıra	HETEROJEN	HOMOJEN
1	-8.161	-5.791	9	-5.982	-5.852
2	-8.397	-5.585	10	-4.972	-4.886
3	-6.985	-5.927	11	-5.02	-4.874
4	-6.411	-6.026	12	-5.641	-5.469
5	-5.355	-5.594	13	-6.033	-5.378
6	-4.887	-5.413	14	-4.913	-4.443
7	-6.12	-4.329	15	-5.908	-5.18
8	-5.659	-5.574	16	-5.874	-4.924

Gerçekleştirilen SK9 peptiti ile heterojen ve homojen fibrillerinin moleküler kenetleme simülasyonu sonucunda elde edilen en düşük enerjili konformasyonların bağlanma ilginlikleri (afiniteleri), kcal/mol biriminde  $\Delta G_{ilginlik}$  olacak şekilde Çizelge 4.1'e verilmiştir.

Çizelge 4.1'de SK9 peptiti ile heterojen ve homojen fibril arasındaki bağlanma ilginliklerinde, anlamlı bir fark olmamasıyla birlikte heterojen fibrilde daha düşük değerler görülmüştür.

İki fibril modeli için de 16 tekrar şeklinde yaptığımız moleküler kenetleme simülasyonu sonucunda, SK9 peptitlerinin her iki fibril modelleri ile başarılı bir şekilde kenetlendiği görülmüştür. Bu durum neticesinde MD simülasyonları için gerekli olan başlangıç koordinatlarını elde edilmiştir. Elde edilen başlangıç koordinatları, 6TI7-SK9 (heterojen fibril modeli ile 16 adet SK9 peptiti ) ve 6TI5-SK9 (homojen fibril modeli ile 16 adet SK9 peptiti) kompleks sistemlerinin görseli Şekil 4.3’de verilmiştir.

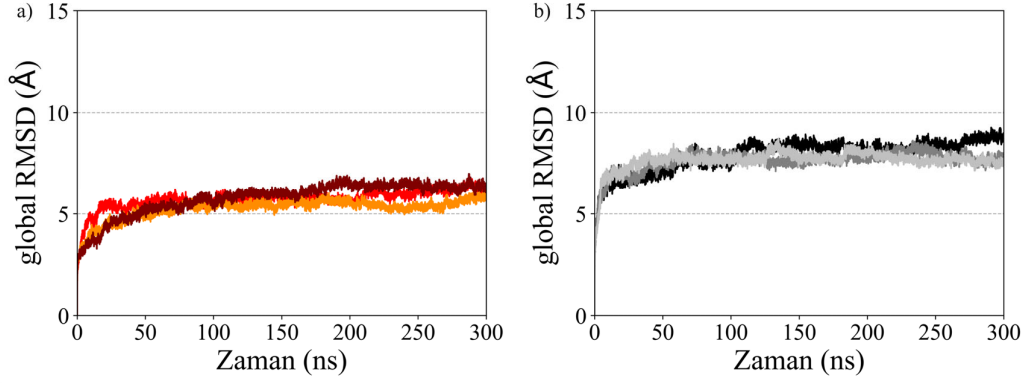
MD simülasyonlarının analizlerinin başlamadan önce, birbirinden uzak atomlar arasındaki oluşabilen yapay etkileşimleri geçersiz kılmak ve analizlerin doğruluğunu sağlamak için örneklerden periyodik sınır koşulları, dönme ve ötelenme hareketleri çıkartılmıştır.



Şekil 4.3 a) 6TI7-SK9 kompleks sistemi ve b) 6TI5-SK9 kompleks sistemi. Sarı SK9 peptitini, mavi Aβ42 zincirlerini ve yeşil Aβ40 zincirlerini temsil eder.

6TI7-SK9 ile 6TI5-SK9 protein ligand komplekslerinin, Aβ fibrillerinin tüm omurga atomları için simülasyon süresi boyunca kök ortalama kara sapması (RMSD) ve kök ortalama kare dalgalanması (RMSF) analizi sırasıyla GROMACS[25] analiz modüllerinden *gmx rms* ve *gmx rmsf* kullanılarak, heterojen ve homojen fibril modellerinin deneysel olarak çözünmüş NMR yapılarına göre en küçük kareler yöntemi (fitting) ile hesaplanmıştır.

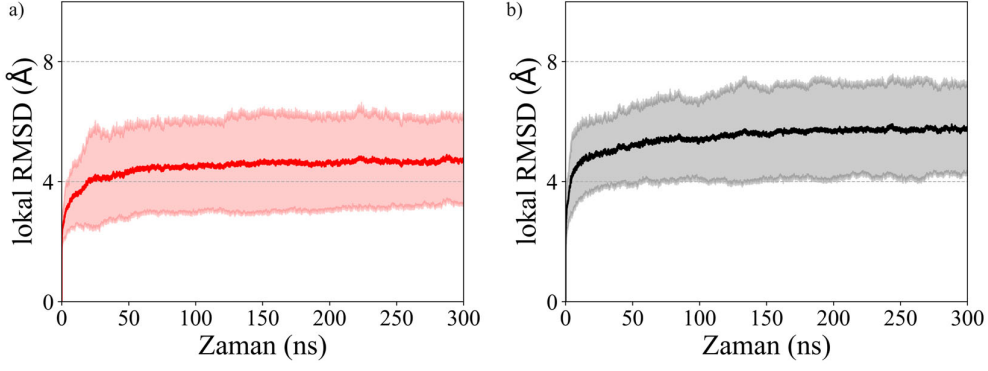




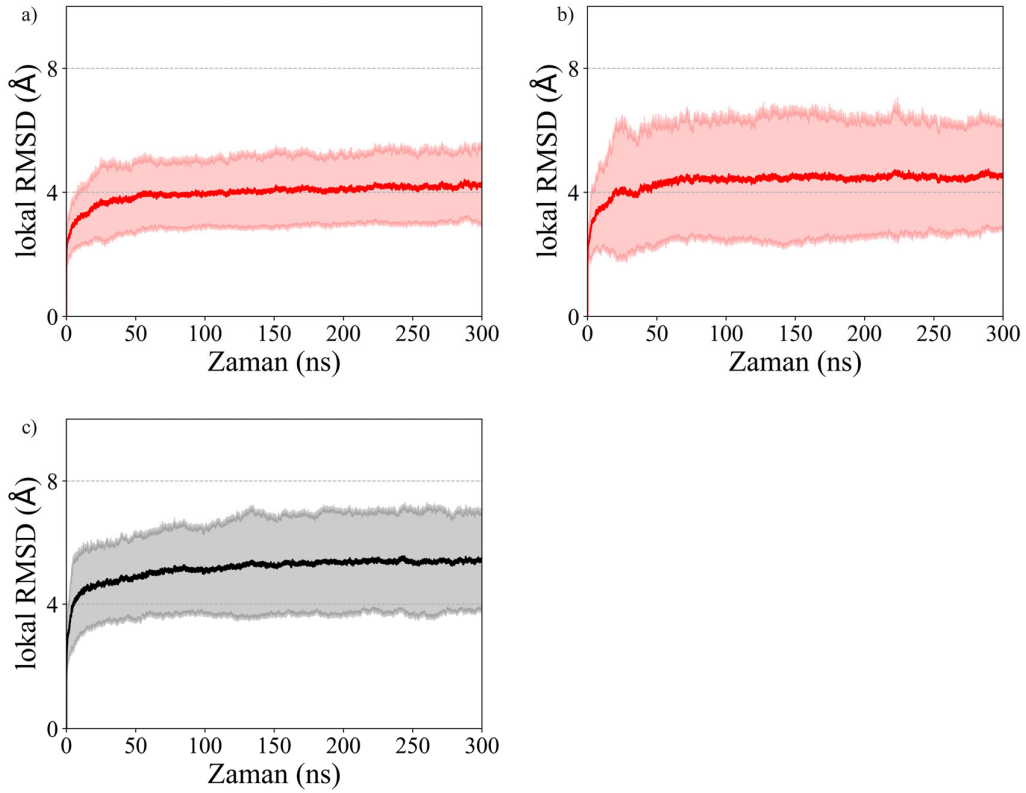
Şekil 4.4 Üç örnekli zamana göre global RMSD grafikleri: a) heterojen fibril modeli ve b) homojen fibril modeli. Heterojen fibril modeli için; kırmızı örnek 1'i, turuncu örnek 2'yi ve kahverengi örnek 3'ü temsil eder. Homojen fibril modeli için; siyah örnek 1'i, gri örnek 2'yi ve gümüş örnek 3'ü temsil eder.

MD simülasyonlarının çıktılarının değerlendirmeye ilk olarak, SK9 varlığında fibril modellerinin simülasyon boyunca yapısal kararlığı global kök ortalama kare sapması (global RMSD) analiziyle başlanmıştır. Global RMSD değerleri, fibril modellerinin tüm omurga atomları ile ilgili NMR yapılarının omurga atomlarına göre en küçük kareler yöntemiyle hesaplanmıştır. Şekil 4.4'e verildiği gibi tüm örneklerin global RMSD değerleri zamana göre çizilmiş heterojen ve homojen fibril modelleri olarak kıyaslanmıştır. Her iki sistemin farklı örnekleri, simülasyon başladıktan yaklaşık 50 ns sonra platoya ulaştığı görülmüştür. Simülasyonların son 100 ns' lik kısmında ortalama RMSD değerleri heterojen fibril modeli için yaklaşık 5.97 Å iken homojen fibril modelinin yaklaşık 8.01 Å olduğu hesaplanmıştır. Fibril modellerinin global RMSD grafiklerinde bakıldığında yapısal kararlılıklarında dikkate değer farklılıklar görülmemiştir.

Yerel ölçekte yapısal farklılığı değerlendirmek fibrillerin modellerinin her örneği için tüm omurga atomlarının ilgili deneysel NMR yapılarına göre hem yan yana istiflenen zincir çiftleri hem de tek başlarına zincirlerin yerel (lokal) RMSD değerleri en küçük kareler yöntemiyle ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.5 Zincir çiftlerinin zamana göre lokal RMSD grafikleri: a) heterojen fibril modeli ve b) homojen fibril modeli. Kırmızı ve gri renkle boyanmış alanlar standart sapmayı temsil eder.



Şekil 4.6 Bireysel zincirlerin zamana göre lokal RMSD grafikleri: a) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri, b) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 zincirleri ve c) homojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri. Kırmızı ve gri renkle boyanmış alanlar standart sapmayı temsil eder.

Elde edilen hesapların ortalamaları alınarak zamana göre lokal RMSD grafikleri çizilmiştir. Heterojen ve homojen fibril modellerinin zincir çiftlerinin kıyaslandığı, zamana göre lokal RMSD grafikleri standart sapmalarıyla birlikte Şekil 4.5' de verilmiştir.

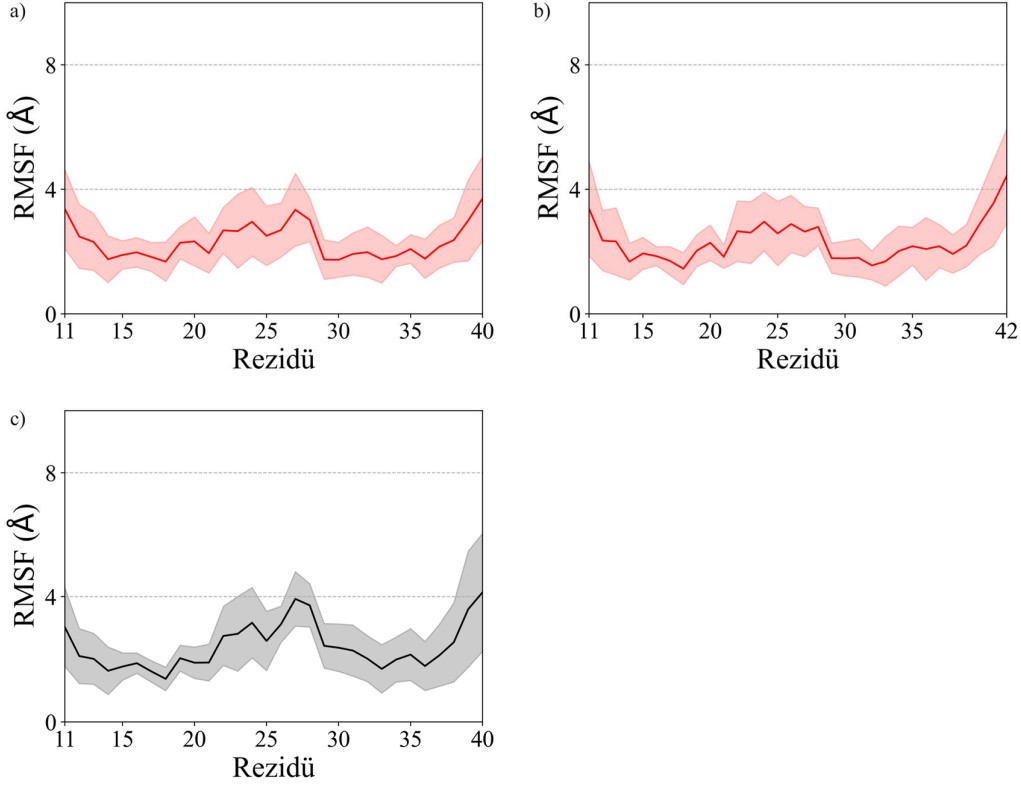
Yapısal kararlılık üzerinde daha ayrıntılı fikir edinmek için bireysel olarak zincirler, heterojen fibril model 11-40 rezidülü A $\beta$ 40 zincirleri, heterojen fibril model 11-42 rezidülü A $\beta$ 42 zincirleri ve homojen fibril model 11-40 A $\beta$ 40 rezidülü zincirlerinin zamana göre yerel RMSD grafikleri Şekil 4.6'da verildiği verilmiştir.

Benzer şekilde her iki fibril modeli global RMSD analizinde olduğu gibi yaklaşık 50 ns sonra platoya ulaştığı anlaşılmıştır. Şekil 4.6'da verilen üç durumda da lokal RMSD değerlerinde önemli sayılacak bir farklılık bulunmamıştır. Fibril modellerinin A $\beta$ 40 zincirlerinin davranışları birbirlerine oldukça benzediği gözlemlenmiştir. Heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 ve A $\beta$ 40 zincirlerinin yapısal gevşemesi birbirlerine önemli ölçüde benzediği dikkat çekmiştir.

Yapısal kararlılığı daha iyi anlamak adına rezidüye göre kök ortalama kare dalgalanması (RMSF) analizi gerçekleştirmiştir. Fibril modellerinin tüm omurga atomlarının ilgili NMR yapılarına göre rezidüye göre RMSF grafikleri Şekil 4.7' de verilmiştir.

Heterojen ve homojen fibril modellerinin A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 zincirlerinin hepsinde, zincirlerin amino ve karboksil ucu bölgesindeki RMSF değerleri iç bölgelerden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Heterojen ve homojen fibrilleri A $\beta$ 40 zincirli kıyaslandığına aralarında bariz bir fark olmadığı ve her iki fibrilin  $\beta$ -yaprakları arasında köprü olan 23-30 rezidüleri iç bölgelere göre daha fazla esneklik sergilediği görülmüştür. Heterojen fibrilin A $\beta$ 42 zincirleri, her iki modelin A $\beta$ 40 zincirlerine kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.7 Rezidüye göre RMSF grafikleri: a) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri b) heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 zincirleri , c) homojen fibril modelinin A $\beta$ 40 zincirleri. Kırmızı ve gri renkle boyanmış alanlar standart sapmayı temsil eder.

İncelememizi genişleterek amacıyla, SK9 varlığının fibril modellerinin kararlılığı üzerinde etkisini termodinamik olarak incelemek için bağlanma serbest enerjisi  $\Delta G_{\text{bağlanma}}$  (kcal/mol) analizi yapılmıştır. Bu analizi gerçekleştirmek için, [144] MMPB(GB)SA (moleküler mekanik/Poisson Boltzmann (genelleştirilmiş Born) yüzey alanı) *MMPBSA.py*[145] modülünü kullanan *gmx MMPBSA*[146] (GROMACS moleküler mekanik/Poisson Boltzmann (genelleştirilmiş Born) yüzey alanı) paketi ile CHARMM36m[24] tüm atomlu kuvvet alanı kullanılmıştır. Her iki sistemin bağımsız üç örneğinin son 100 ns' lik kısmı birleştirilerek elde edilen 300ns' lik kümülatif simülasyon yörüngelerinden, istiflenme (zincirler arası) ve paketlenme (zincir A,B,C,D,E,F,G,H ile zincir I,J,K,L,M,N,O,P arası) bağlanma serbest  $\Delta G_{\text{bağlanma}}$  (kcal/mol) tahmini yapılmıştır.

Çizelge 4.2 Heterojen ve homojen fibrillerinin istiflenme serbest enerjileri.  $\Delta G$  ve  $\Delta E$  enerjilerinin birimi kcal/mol.

		$\Delta E_{ele}$	$\Delta E_{vdw}$	$\Delta E_{GB}$	$\Delta E_{yüzey}$	$\Delta G_{gaz}$	$\Delta G_{çözme}$	$\Delta G_{bağlanma}$
<b>Heterojen</b>	Örnek 1	313.8	-1631.0	-27.5	-216.9	-1267.0	-271.1	-1538.7
		±88.1	±6.0	±35.5	±0.9	±42.2	±35.6	±26.5
	Örnek 2	-17.8	-1722.9	322.3	-258.9	-1740.8	63.4	-1677.2
		±83.1	±4.1	±28.6	±1.0	±36.7	±28.7	±25.4
	Örnek 3	180.0	-1639.3	145.2	-242.5	-1459.4	-97.3	-1556.7
		±70.0	±6.3	±37.1	±1.2	±50.1	±36.7	±26.3
	Ortalama	158.7	-1664.4	146.7	-239.4	-1489.1	-101.7	-1590.9
		±136.2	±41.5	±142.8	±17.3	±194.6	±136.6	±61.5
<b>Homojen</b>	Örnek 1	819.7	-1560.1	-534.6	-238.8	-740.3	-773.4	-1513.8
		±39.5	±6.5	±36.9	±0.9	±41.2	±36.5	±10.3
	Örnek 2	239.1	-1640.0	54.3	-247.2	-1401.1	-192.9	-1593.9
		±43.0	±4.6	±39.1	±0.7	±38.9	±38.8	±5.2
	Örnek 3	522.7	-1649.1	-217.7	-249.1	-1126.4	-466.7	-1593.1
		±51.7	±4.5	±41.9	±0.8	±42.5	±41.5	±6.5
	Ortalama	527.2	-1616.4	-232.7	-245.0	-1089.3	-477.7	-1566.9
		±237.0	±40.0	±240.7	±4.5	±271.0	±231.1	±37.6

Çizelge 4.2’de SARS-COV-2 virüsü zarf proteinin amiloidojenik SK9 peptiti varlığında fibril modellerinin hesaplanan istiflenme serbest enerjileri standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Heterojen fibril modelinin istiflenme ortalama bağlanma serbest enerjisi  $\Delta G_{bağlanma}$  değeri homojen fibril modeline göre -24 kcal/mol daha düşük olması, homojen fibril modeline göre simülasyon boyunca zincirlerinin proteininden daha ayrıştığı ön görülmüştür.

Her iki fibril modelinde de elektrostatik enerjiler pozitif, van der Waals enerjileri ise negatif değerli çıkmıştır. Pozitif elektrostatik enerji, itici etkileşimlere karşı gelmektedir ve kümeleşmeyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bununla birlikte, her iki fibril modelinin van der Waals enerjilerinin negatif değere sahip olmasının dolayı sistemlerin kararlı yapı oluşturduğu düşünülmüştür. Heterojen fibril modelinin  $\Delta E_{ele}$  elektrostatik enerjisi

homojen fibril modeline göre önemli ölçüde düşük olmasının dolayı heterojen fibril modelinin daha kararlı kümeleşme eğilimi göstereceği ön görülmüştür.

Çizelge 4.3 Heterojen ve homojen fibrillerinin paketlenme serbest enerjileri.  $\Delta G$  ve  $\Delta E$  enerjilerinin birimi kcal/mol.

		$\Delta E_{ele}$	$\Delta E_{vdw}$	$\Delta E_{GB}$	$\Delta E_{yüzey}$	$\Delta G_{gaz}$	$\Delta G_{çözme}$	$\Delta G_{bağlanma}$	
<b>Heterojen</b>	Örnek 1	49.5	-205.2	48.0	-28.2	-155.7	19.9	-135.9	
		$\pm 102.5$	$\pm 11.8$	$\pm 94.9$	$\pm 1.5$	$\pm 103.3$	$\pm 94.2$	$\pm 13.4$	
	Örnek 2	-147.7	-256.7	248.8	-33.8	-404.4	215.1	-189.4	
		$\pm 84.0$	$\pm 9.7$	$\pm 78.9$	$\pm 1.3$	$\pm 84.4$	$\pm 78.4$	$\pm 10.1$	
	Örnek 3	81.3	-230.1	29.7	-30.2	-148.8	-0.5	-149.2	
		$\pm 81.2$	$\pm 8.7$	$\pm 75.9$	$\pm 0.9$	$\pm 79.8$	$\pm 75.6$	$\pm 8.5$	
	Ortalama	-5.6	-230.1	108.8	-30.7	-236.3	78.2	-158.2	
		$\pm 58.5$	$\pm 12.1$	$\pm 57.3$	$\pm 1.3$	$\pm 68.6$	$\pm 56.1$	$\pm 13.13$	
	<b>Homojen</b>	Örnek 1	867.9	-175.7	-760.1	-21.1	692.2	-781.2	-89.0
			$\pm 30.6$	$\pm 7.5$	$\pm 28.9$	$\pm 0.9$	$\pm 29.8$	$\pm 29.0$	$\pm 5.8$
Örnek 2		594.1	-185.3	-496.1	-21.8	408.8	-517.9	-109.1	
		$\pm 43.5$	$\pm 12.4$	$\pm 45.0$	$\pm 1.3$	$\pm 49.3$	$\pm 44.4$	$\pm 9.8$	
Örnek 3		743.0	-207.4	-631.7	-24.3	535.6	-656.0	-120.4	
		$\pm 48.3$	$\pm 10.0$	$\pm 47.2$	$\pm 1.3$	$\pm 48.6$	$\pm 47.1$	$\pm 8.4$	
Ortalama		735.0	-189.5	-629.3	-22.4	545.5	-651.7	-106.2	
		$\pm 64.6$	$\pm 7.7$	$\pm 62.2$	$\pm 0.8$	$\pm 66.9$	$\pm 62.1$	$\pm 7.5$	

Çizelge 4.3'te SARS-COV-2 virüsü zarf proteinin amiloidojenik SK9 peptiti varlığında fibril modellerinin paketlenme serbest enerjileri standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Heterojen fibril modelinin paketlenme ortalama bağlanma serbest enerjisi  $\Delta G_{bağlanma}$  değeri homojen fibril modeline göre -52 kcal/mol daha düşük değerde olması, homojen fibril modeline göre daha kompakt yapı özelliği sergilediği tahmin edilmiştir.

Ayrıca, heterojen ve homojen fibril modellerini çekici van der Waals etkileşimleri göstermesinden dolayı sistemlerin kararlı yapı oluşturduğu düşünülmüştür.

Heterojen fibril modelinin çekici elektrostatik etkileşim gösterirken homojen fibril modelinin itici elektrostatik etkileşim sergilemesi ve aldıkları değerler arasında önemli

ölçüde fark olması aralarındaki kompaktlaşma farkının sebebinin bu olduğu ön görülmüştür.

Sistemlerin kararlılıklarını etkileyen faktörler hakkında ayrıntılı bilgiler elde etmek adına, VMD[142] yazılımı aracılığıyla, fibril modellerinin istiflenme (zincirler arası) ve paketlenme (zincir A,B,C,D,E,F,G,H ile zincir I,J,K,L,M,N,O,P arası) hidrojen bağı sayısı, hidrofobik (suyu sevmeyen), hidrofilik (suyu seven) ve toplam SASA (çözücüye erişebilir yüzey alanı) analizlerini yapılmıştır. Hidrojen bağları analizi için, alıcı ile verici atomlar arası kesme mesafesi 3.0 Å ve aralarındaki açı 20°'den küçük olacak biçimde parametreler belirlenmiştir. SASA analizlerinde su molekülünün boyutunu taklit etmek için prob yarıçapı 1.4 Å olarak seçilmiştir.

Bu analizler her iki sistemin için gerçekleştirilen bağımsız üçer adet simülasyonun son 100 ns' lik kısmı birleştirilmesiyle elde edilen 300 ns' lik kümülatif simülasyon yörüngeleri kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.4 SASA, hidrojen-bağı sayısı ve %  $\beta$ -yaprağı analizleri.

	SASA (Å <sup>2</sup> )			Hidrojen-Bağı		% $\beta$ -yaprağı		
	Hidrofobik	Hidrofilik	Toplam	İstiflenme	Paketlenme	Toplam	N-uç	C-uç
<b>Heterojen</b>	11420.9	13592.1	25013.1	122.2	1.7	47	28	18
	±503.1	±327.7	±763.8	±8.6	±1.2			
<b>Homojen</b>	10630.0	14227.7	24857.8	123.2	0.8	49	30	19
	±557.0	±523.9	±882.0	±8.8	±1.0			

Çizelge 4.4'te Sistemlerin kararlılıklarını etkileyen nicelikleri anlamak adına hesaplanan hidrojen bağı sayısı, SASA ile %  $\beta$ -yaprağı içeriği toplam, amino ucu (N-uç) ve karboksil ucu (C-uç) olacak biçimde ortalama değer ve standart sapma değerleri verilmiştir. SASA analizinde homojen fibril modeline kıyasla heterojen fibril modelinin hidrofobik yüzey alanı daha büyük iken hidrofilik yüzey alanı daha küçük ve çözücüye erişebilir toplam yüzey alanı daha büyük olduğu görülmüştür. Hidrofobik bölgeler etraflarındaki çözücü

suyu iterek hidrofobik bölgeler ile bir araya gelme eğiliminde olur iken hidrofilik bölgeler ise etraflarında çözücü suyu kendilerine çekme eğilimde olurlar.

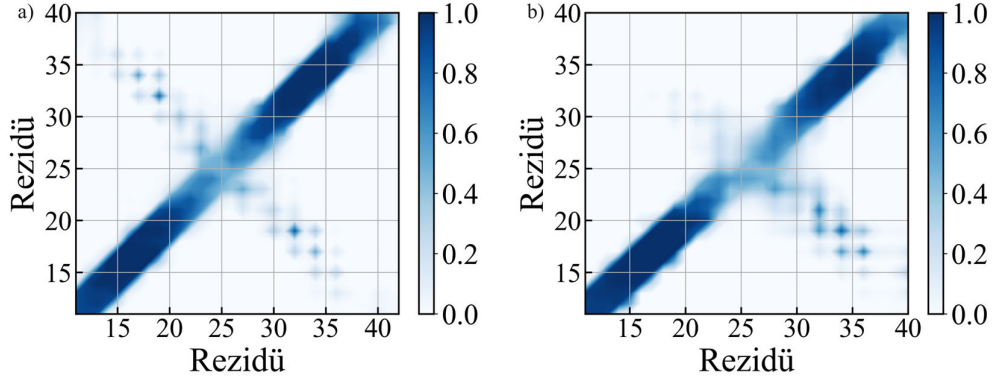
Bu sebeple amiloidlerin kararlılıkları ve kümeleşme eğilimleri birçok parametreye bağlı karmaşık davranış gösterse de yüksek hidrofobik ve düşük hidrofilik yüzey alanı bu konuda ön görü yapma imkanı sağlar. Homojen fibril modeline kıyasla büyük ölçüde fark olmamasıyla birlikte daha yüksek hidrofobik ve düşük hidrofilik yüzey alanına sahip olan heterojen fibril modeli kararlılığının ve kümeleşme eğiliminin daha fazla olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda, düşük net yük ve yüksek hidrofobiklik amiloidlerin kararlılığını ve kümeleşmesini pozitif yönde etkileyebilmektedir. Bu durumun istiflenme ve paketlenme serbest enerjisi analizinde heterojen fibril modelinin homojen fibril modeline daha düşük elektrostatik etkileşim gösterme ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

Hidrojen bağı sayısı analizinde, fibril modellenin istiflenme hidrojen bağ sayısı arasında anlam yaratacak bir fark görülmemiştir. Ancak homojen fibril modeline kıyasla heterojen fibril modelinin paketlenme hidrojen sayısı iki katından biraz fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre, homojen fibril modeline kıyasla heterojen fibril modelinin daha sıkı paketlenmiş olduğu düşünülmüştür. Bu durumun paketlenme serbest enerjisi analizinin sonucunu desteklediği görülmüştür.

Amiloid fibrillerin karakteristik yapısında bulunun ve kararlılığı üzerinde önemli ölçüde etkili olan  $\beta$ -yaprağı[147] içeriğinin yüzdelik tahmini, GROMACS yazılımının paketinin “do\_dssp” analiz modülü kullanılarak DSSP[148] (proteinlerde ikincil yapı sözlüğü) analiziyle hesaplanmıştır. İkincil yapı analizinde fibril modellerinin  $\beta$ -yaprağı içerikleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Kararlılığı etkileyen faktörleri daha detaylı anlamak için VMD[142] yazılımını kullanarak, zincirler arası (inter) ve zincir içi (intra) rezidü-rezidü temas olasılığı haritası (contact-map) analizleri yapılmıştır. Burada rezidü çiftlerindeki ağır atomlar arası temas mesafesi en fazla 7.0 Å olacak şekilde belirlenmiştir.





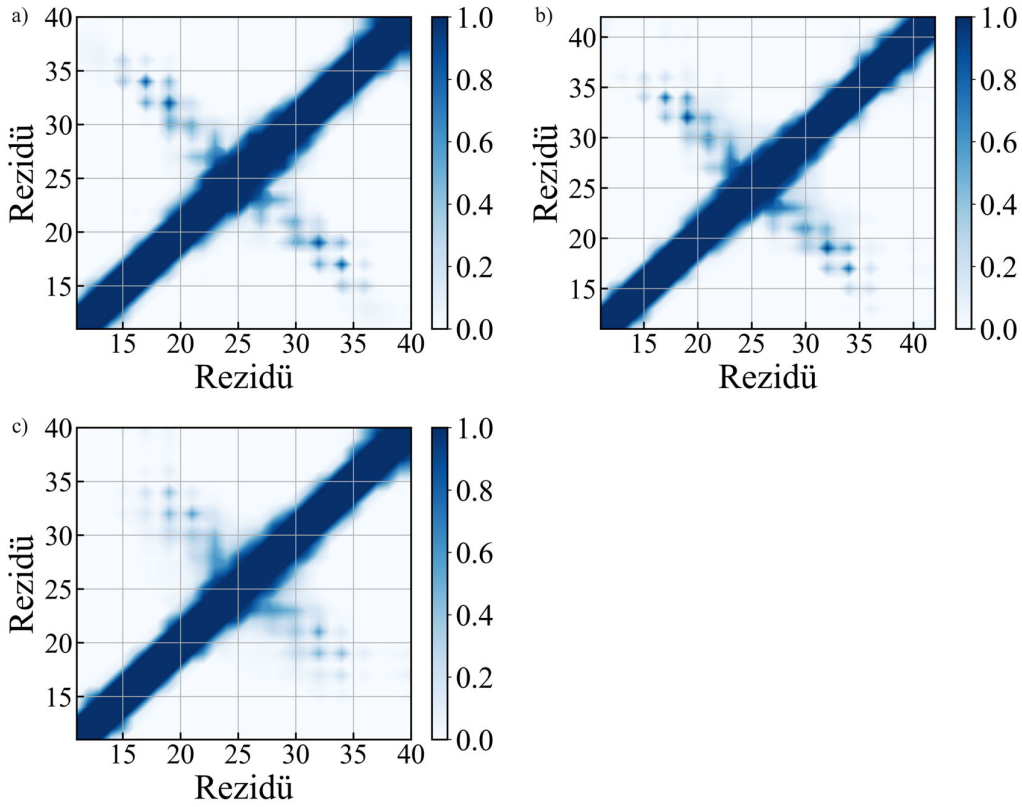
Şekil 4.8 Rezidüye göre zincirler arası (istiflenme) temas olasılığı haritası: a) heterojen fibril modeli ve b) homojen fibril modeli.

Şekil 4.8’de SK9 varlığında her iki fibril modelinin rezidü-rezidü istiflenme temas olasılığı haritası verilmiştir.

Fibril modellerinin zincirlerinin istiflenmesinde rol alan merkez hidrofobik Leu<sup>17</sup>,Val<sup>18</sup>,Phe<sup>19</sup>,Phe<sup>20</sup>,Ala<sup>21</sup> bölgesinde her iki fibril modelinde de rezidü temas olasılıkları %80 den fazla olduğu görülmüştür. Her fibril modelinde de hidrofobik karboksil ucu bölgelerinde çevrelerindeki komşu hidrofobik rezidülerle etkileşimde olduğu görülmüştür.

Bununla birlikte, heterojen fibril modelinde Aβ42 zincirlerini hidrofobik karboksil ucu bölgesindeki Ile<sup>41</sup> rezidüsünün komşu Aβ40 zincirinin hidrofobik karboksil ucu bölgesindeki hidrofobik Val<sup>40</sup> ve Val<sup>39</sup> rezidüleri ile temas oluşturdu görülmüştür. Bu durumun heterojen fibril modelinin karboksil ucu bölgesinde zincirlerin istiflenmesinde ve kararlılığı üzerine pozitif katkı sağladığı düşünülmüştür.

Ayrıca heterojen fibril modeli, homojen fibril modeline farklı olarak merkez hidrofobik bölgesindeki Leu<sup>17</sup> ile Phe<sup>19</sup> rezidüleri sırasıyla yan zincirlerdeki hidrofobik Leu<sup>34</sup> ve Ile<sup>32</sup> rezidüleri ile temas oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu temasların zincirlerin istiflenmesine katkı sağlayabileceği ve homojen fibril modeline göre kararlılığını artırabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.9 Rezidüye göre rezidü içi temas olasılığı haritası: a) heterojen fibril modeli A $\beta$ 40 zincirleri b) heterojen fibril modeli A $\beta$ 42 zincirleri ve c) homojen fibril modeli A $\beta$ 40 zincirleri .

Şekil 4.9’da SK9 varlığında her iki fibril modelinin rezidü-rezidü zincir içi temas olasılığı haritası verilmiştir. A $\beta$ 40 fibrillerinin karakteristik U-şeklini oluşturan hidrofobik Leu<sup>17</sup>-Leu<sup>34</sup>, Leu<sup>17</sup>-Val<sup>36</sup> ile Phe<sup>19</sup>-Gly<sup>33</sup>, Phe<sup>19</sup>-Leu<sup>34</sup> ve Ala<sup>21</sup>-Ile<sup>32</sup> temasları[21], heterojen fibril modelinde Leu<sup>17</sup>-Leu<sup>34</sup> rezidüleri arasında, homojen fibril modelinde ise Ala<sup>21</sup>-Ile<sup>32</sup> rezidüleri arasında görülmüştür. Bununla birlikte, heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 zincirlerinin merkezi hidrofobik bölgesinin Phe<sup>19</sup> ve Ala<sup>21</sup> rezidüleri sırasıyla zincir içindeki diğer hidrofobik Ile<sup>32</sup>/Leu<sup>34</sup> ve Ala<sup>30</sup> rezidüleri temasta bulunduğu gözlemlenmiştir. Heterojen fibrilin A $\beta$ 40 zincirlerinin merkezi hidrofobik bölgesindeki Leu<sup>17</sup> ve Phe<sup>19</sup> rezidüleri zincir içindeki hidrofobik Ile<sup>32</sup> rezidüsüyle temas yaptığı görülmüştür. Heterojen fibrilin homojen fibrile göre daha fazla sayıda zincir içi temasta olduğu gözlemlenmiştir.

## 5. YORUM

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan Alzheimer hastalığı A $\beta$  plakalarının kümeleşmesiyle, nöronların aşamalı kaybı fonksiyonel bozukluklarla ilişkili olan bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalık çağımızın vebasası olarak tanımlanmakta ve gelecek on yıllarda halk sağlığını önemli ölçüde tehdit edeceği ve devletler üzerinde ciddi sağlık maaliyeti oluşturacağı tahmin edilmektedir.

Alzheimer hastalığını karşı başarılı bir şekilde tedavi edecek ilaçların ve yöntemlerin geliştirilmesi açısından, yanlış katlanmış proteinlerden biri olan ve hastalığın patofizyolojik karakteristiğinde bulunan fibril benzeri yapıdaki A $\beta$  proteinlerinin yapısının ve davranışının anlaşılması oldukça önemlidir. Genelde beyinde A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 izoformları biçiminde bulunan A $\beta$ 'lar aynı zamanda bu iki izoformun çapraz tohumlanmasıyla A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 formunda da bulunabilir. Geçtiğimiz yıllarda Cerofolini vd.[21] PDB-ID: 6TI7 ile verilen A $\beta$ 42 ile A $\beta$ 40 1:1 oranında çapraz tohumlanması ile elde edilen heterojen A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 fibril modelinin kararlı üç-boyutlu yapısını deneysel olarak göstermişlerdir.

Yapılan son çalışmalarda SARS-COV-2 virüsünün Alzheimer ve diğer yanlış katlanmış protein hastalıklarının seyrini kötüleştirdiği ve ölüm oranlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir[149,150]. Son yıllarda SARS-COV-2 ile serum amiloid A,  $\alpha$ -sinüklein ve amilin gibi yanlış katlanmış proteinler arasında ilişkiyi moleküler düzeyde Hansmann vd. [151–154] irdeleyen etkili çalışmalar yapmışlardır. Bu bağlamda SARS-COV-2 ile Alzheimer hastalığı arasında patolojik karakteristiğinde bulunan A $\beta$  izoformları arasında moleküler etkileşimlerin daha iyi anlaşılması, hastalığa karşı yeni ve güçlü tedavi edici araçların ve yöntemlerin geliştirilmesinde etkili olacaktır.

Bu çalışmanın amacı Alzheimer hastalığını daha iyi anlamak adına A $\beta$  fibril modelleri ile SARS-COV-2 virüsü arasında moleküler etkileşimlere ışık tutmak olmuştur. Bu amaç uğruna açık su ortamında heterojen A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 fibril modeli (PDB-ID: 6TI7) ile homojen A $\beta$ 40 fibril modeli (PDB-ID: 6TI5) SARS-COV-2 virüsü amiloidojenik

S<sup>55</sup>FYVYSRVK<sup>63</sup> (SK9) moleküler olarak kenetlenerek, moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiş ve sonuçları heterojen fibril modeliyle homojen fibril modelinin kararlılıkları açısından kıyaslanmıştır. Yaptığımız RMSD ve RMSF ön analizlerinde heterojen ve homojen fibril modellerinin yapısal kararlılıkları arasında anlamlı sayılabilecek farklılıklar bulunmamıştır.

Kararlılığı termodinamik olarak incelediğimiz zaman her iki fibril modeli arasında büyük farklılıklar olamamakla birlikte homojen fibril modeline kıyasla heterojen fibril modelinin istiflenme ve paketlenme bağlanma enerjileri sayısal olarak daha düşük olduğu dikkat çekmiştir. Aralarındaki bu farklılığın sebebi olarak zincirlerin istiflenmesi açısından heterojen fibril modelinin elektrostatik etkileşim enerjisi her ne kadar itici bir etkileşime karşı gelse de homojen fibril modeline göre düşük olması ve zincirlerin paketlenmesinde çekici etkileşim göstermesi ve homojen fibril modeline göre oldukça düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu açıdan heterojen fibril modeli daha sıkı paketlenmiş bir yapı şeklinde davranış sergilediği ön görülmüştür.

SASA analizlerinde heterojen fibril modeli daha fazla hidrofobik yüzey alanına sahip olduğu görülmüştür. Ancak aralarında bu farkın kesin yorumlar yapacak kadar olmadığı görüşü şeklinde olmuştur. Hidrojen bağı sayısı analizlerinde zincirlerin istiflenmesinde etkili olan hidrojen bağları arasında iki model arasında dikkate değer bir fark göze çarpmamıştır. Zincirlerin paketlenmesinde oluşan hidrojen bağlarının sayısına bakıldığında heterojen fibril modelinin bağ sayısı sayısal olarak daha fazla görülmüştür. Bu sonuç paketlenme bağlanma enerjisi analizini destekler niteliktedir. Amiloidlerin yapılarında bulana ve kararlılığını etkileyen  $\beta$ -yaprağı içeriği analizinde iki fibril modeli arasında kararlılığı etkileyecek kadar bir farkın olmadığı görülmüştür.

Kararlılığı etkileyecek olan bir diğer faktör olan rezidüler arası etkileşimler, rezidü-rezidü zincirler arası ve zincir içi temas olasılığı haritası ile incelenmiştir. Zincirlerin istiflenme temas haritasında heterojen fibrilin A $\beta$ 42 zincirlerinin hidrofobik karboksil ucu bölgesindeki Ile<sup>41</sup> rezidüsünün komşu A $\beta$ 40 zincirinin hidrofobik karboksil ucu bölgesindeki hidrofobik Val<sup>40</sup> ve Val<sup>39</sup> rezidüleri ile yapmış olduğu temasla birlikte merkez hidrofobik bölgesindeki Leu<sup>17</sup> ile Phe<sup>19</sup> rezidüleri sırasıyla yan A $\beta$ 40 zincirlerdeki

hidrofobik Leu<sup>34</sup> ve Ile<sup>32</sup> rezidüleri ile de temas oluşturması, fibril modelinin karboksil ucu bölgesinde zincirlerin istiflenmesinde ve yan yana zincirlerin istiflenmesinde pozitif katkı sağladığı düşünülmüştür.

Ayrıca zincir içi temas olasılığı haritası analizinde, homojen fibril modelinin merkezi hidrofobik bölgesinin çevresindeki diğer hidrofobik rezidüler ile temas yapmadığı görülmüştür. Ancak, heterojen fibril modelinin A $\beta$ 42 zincirlerinin merkezi hidrofobik bölgesinin Phe<sup>19</sup> ve Ala<sup>21</sup> rezidüleri sırasıyla zincir içindeki diğer hidrofobik Ile<sup>32</sup>/Leu<sup>34</sup> ve Ala<sup>30</sup> rezidüleriyle birlikte A $\beta$ 40 zincirlerinin merkezi hidrofobik bölgesindeki Leu<sup>17</sup> ve Phe<sup>19</sup> rezidüleri zincir içindeki hidrofobik Ile<sup>32</sup> rezidüsüyle temas yaptığı görülmüştür. Heterojen fibril modelinin homojen fibril modeline göre hidrofobik bölgelerinin daha fazla etkileşim sergilediği ve bu durumun kararlılığını artırabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda SARS-COV-2 virüsünün amiloidojenik özellik gösteren peptitlerinden sadece biri kullanılmıştır. Son yapılan çalışmalar bu virüsün başka amiloidojenik bölgelerinin de olduğunu göstermiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalar COVID-19 ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkiyi derinlemesine irdelemek adına farklı SARS-COV-2 peptitleri ile A $\beta$  fibrillerinin etkileşimleri incelenmesi yönünde olabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] R.N.L. Lamptey, B. Chaulagain, R. Trivedi, A. Gothwal, B. Layek, J. Singh, A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics, *Int J Mol Sci.* 23 (2022) 1851.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23031851>.
- [2] C. Soto, S. Pritzkow, Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases, *Nat Neurosci.* 21 (2018) 1332–1340.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0235-9>.
- [3] Z. Jaunmuktane, S. Brandner, Invited Review: The role of prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases, *Neuropathol Appl Neurobiol.* 46 (2020) 522–545.  
<https://doi.org/10.1111/nan.12592>.
- [4] C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H.A. Kretzschmar, J. Herms, Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein., *J Neurosci.* 26 (2006) 7212–7221.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006>.
- [5] G.F. Chen, T.H. Xu, Y. Yan, Y.R. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher, H.E. Xu, Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development, *Acta Pharmacol Sin.* 38 (2017) 1205–1235.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
- [6] G. Bitan, M.D. Kirkitadze, A. Lomakin, S.S. Vollers, G.B. Benedek, D.B. Teplow, Amyloid-protein (A) assembly: A40 and A42 oligomerize through distinct pathways, 2003.  
[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.222681699](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.222681699).
- [7] A.A. Nizhnikov, K.S. Antonets, S.G. Inge-Vechtomov, Amyloids: From pathogenesis to function, *Biochemistry (Moscow).* 80 (2015) 1127–1144.

<https://doi.org/10.1134/S0006297915090047>.

- [8] R. Nelson, M.R. Sawaya, M. Balbirnie, A. Madsen, C. Riek, R. Grothe, D. Eisenberg, Structure of the cross- $\beta$  spine of amyloid-like fibrils, *Nature*. 435 (2005) 773–778.

<https://doi.org/10.1038/nature03680>.

- [9] S. Sambashivan, Y. Liu, M.R. Sawaya, M. Gingery, D. Eisenberg, Amyloid-like fibrils of ribonuclease a with three-dimensional domain-swapped and native-like structure, *Nature*. 437 (2005) 266–269.

<https://doi.org/10.1038/nature03916>.

- [10] W.M. Berhanu, F. Yaşar, U.H.E. Hansmann, In silico cross seeding of A $\beta$  and amylin fibril-like oligomers, *ACS Chem Neurosci*. 4 (2013) 1488–1500.

<https://doi.org/10.1021/cn400141x>.

- [11] N. Pathak, S. Kumar Vimal, I. Tandon, L. Agrawal, C. Hongyi, S. Bhattacharyya, *Neurodegenerative Disorders of Alzheimer, Parkinsonism, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Multiple Sclerosis: An Early Diagnostic Approach for Precision Treatment*, (n.d.).

<https://doi.org/10.1007/s11011-021-00800-w/Published>.

- [12] B.H. Toyama, J.S. Weissman, Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences, *Annu Rev Biochem*. 80 (2011) 557–585.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090908-120656>.

- [13] R. Nelson, D. Eisenberg, Recent atomic models of amyloid fibril structure, *Curr Opin Struct Biol*. 16 (2006) 260–265.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.007>.

- [14] S. Subedi, S. Sasidharan, N. Nag, P. Saudagar, T. Tripathi, Amyloid Cross-Seeding: Mechanism, Implication, and Inhibition, *Molecules*. 27 (2022).

<https://doi.org/10.3390/molecules27061776>.

- [15] J.A. Matias-Guiu, V. Pytel, J. Matias-Guiu, Death Rate Due to COVID-19 in Alzheimer’s Disease and Frontotemporal Dementia, *Journal of Alzheimer’s Disease*. 78 (2020) 537–541.



<https://doi.org/10.3233/JAD-200940>.

- [16] J.-M. Hwang, J.-H. Kim, J.-S. Park, M.C. Chang, D. Park, Neurological diseases as mortality predictive factors for patients with COVID-19: a retrospective cohort study, (n.d.).  
<https://doi.org/10.1007/s10072-020-04541-z/Published>.
- [17] M.J. Hashim, A.R. Alsuwaidi, G. Khan, Population risk factors for COVID-19 mortality in 93 countries, *J Epidemiol Glob Health*. 10 (2020) 204–208.  
<https://doi.org/10.2991/jegh.k.200721.001>.
- [18] P. Martín-Jiménez, M.I. Muñoz-García, D. Seoane, L. Roca-Rodríguez, A. García-Reyne, A. Lalueza, G. Maestro, D. Folgueira, V.A. Blanco-Palmero, A. Herrero-San Martín, S. Llamas-Velasco, D.A. Pérez-Martínez, M. González-Sánchez, A. Villarejo-Galende, C. Adelnour, Cognitive Impairment Is a Common Comorbidity in Deceased COVID-19 Patients: A Hospital-Based Retrospective Cohort Study, *Journal of Alzheimer's Disease*. 78 (2020) 1367–1372.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-200937>.
- [19] M. Ciaccio, B. Lo Sasso, C. Scazzone, C.M. Gambino, A.M. Ciaccio, G. Bivona, T. Piccoli, R.V. Giglio, L. Agnello, COVID-19 and Alzheimer's disease, *Brain Sci*. 11 (2021) 1–10.  
<https://doi.org/10.3390/brainsci11030305>.
- [20] S.J. Soscia, J.E. Kirby, K.J. Washicosky, S.M. Tucker, M. Ingelsson, B. Hyman, M.A. Burton, L.E. Goldstein, S. Duong, R.E. Tanzi, R.D. Moir, The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide, *PLoS One*. 5 (2010).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>.
- [21] L. Cerofolini, E. Ravera, S. Bologna, T. Wiglenda, A. Böddrich, B. Purfürst, I. Benilova, M. Korsak, G. Gallo, D. Rizzo, L. Gonnelli, M. Fragai, B. De Strooper, E.E. Wanker, C. Luchinat, Mixing  $A\beta(1-40)$  and  $A\beta(1-42)$  peptides generates unique amyloid fibrils, *Chemical Communications*. 56 (2020) 8830–8833.

<https://doi.org/10.1039/d0cc02463e>.

- [22] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A.F. Tillack, S. Forli, AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings, *J Chem Inf Model*. 61 (2021) 3891–3898.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.
- [23] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J Comput Chem*. (2009) NA-NA.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [24] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B.L. de Groot, H. Grubmüller, A.D. MacKerell, CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins, *Nat Methods*. 14 (2017) 71–73.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>.
- [25] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*. 1–2 (2015) 19–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- [26] T.P.J. Knowles, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, The amyloid state and its association with protein misfolding diseases, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15 (2014) 384–396.  
<https://doi.org/10.1038/nrm3810>.
- [27] N. Gregersen, P. Bross, S. Vang, J.H. Christensen, Protein Misfolding and Human Disease, *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 7 (2006) 103–124.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115737>.
- [28] P.H. Nguyen, A. Ramamoorthy, B.R. Sahoo, J. Zheng, P. Faller, J.E. Straub, L. Dominguez, J.E. Shea, N. V. Dokholyan, A. de Simone, B. Ma, R. Nussinov, S. Najafi, S.T. Ngo, A. Loquet, M. Chiricotto, P. Ganguly, J. McCarty, M.S. Li, C. Hall, Y. Wang, Y. Miller, S. Melchionna, B. Habenstein, S. Timr, J. Chen, B. Hnath, B. Strodel, R. Kayed, S. Lesné, G.

Wei, F. Sterpone, A.J. Doig, P. Derreumaux, Amyloid oligomers: A joint experimental/computational perspective on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, and amyotrophic lateral sclerosis, *Chem Rev.* 121 (2021) 2545–2647.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01122>.

- [29] A.K. Dunker, M.M. Babu, E. Barbar, M. Blackledge, S.E. Bondos, Z. Dosztányi, H.J. Dyson, J. Forman-Kay, M. Fuxreiter, J. Gsponer, K.-H. Han, D.T. Jones, S. Longhi, S.J. Metallo, K. Nishikawa, R. Nussinov, Z. Obradovic, R. V. Pappu, B. Rost, P. Selenko, V. Subramaniam, J.L. Sussman, P. Tompa, V.N. Uversky, What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered, *Intrinsically Disord Proteins.* 1 (2013) e24157.

<https://doi.org/10.4161/idp.24157>.

- [30] V.N. Uversky, A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics, *Protein Science.* 22 (2013) 693–724.

<https://doi.org/10.1002/pro.2261>.

- [31] J. Habchi, P. Tompa, S. Longhi, V.N. Uversky, Introducing protein intrinsic disorder, *Chem Rev.* 114 (2014) 6561–6588.

<https://doi.org/10.1021/cr400514h>.

- [32] L.M. Pietrek, L.S. Stelzl, G. Hummer, Hierarchical Ensembles of Intrinsically Disordered Proteins at Atomic Resolution in Molecular Dynamics Simulations, *J Chem Theory Comput.* 16 (2020) 725–737.

<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00809>.

- [33] U.R. Shrestha, P. Juneja, Q. Zhang, V. Gurumoorthy, J.M. Borreguero, V. Urban, X. Cheng, S.V. Pingali, J.C. Smith, H.M. O'Neill, L. Petridis, Generation of the configurational ensemble of an intrinsically disordered protein from unbiased molecular dynamics simulation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116 (2019) 20446–20452.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1907251116>.

- [34] M. Arai, K. Sugase, H.J. Dyson, P.E. Wright, Conformational propensities of intrinsically disordered proteins influence the mechanism of binding and folding, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112 (2015) 9614–9619.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1512799112>.
- [35] P.H. Nguyen, P. Derreumaux, Structures of the intrinsically disordered A $\beta$ , tau and  $\alpha$ -synuclein proteins in aqueous solution from computer simulations, *Biophys Chem*. 264 (2020).  
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106421>.
- [36] S. Mukhopadhyay, The dynamism of intrinsically disordered proteins: Binding-induced folding, amyloid formation, and phase separation, *Journal of Physical Chemistry B*. 124 (2020) 11541–11560.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07598>.
- [37] P. Sweeney, H. Park, M. Baumann, J. Dunlop, J. Frydman, R. Kopito, A. McCampbell, G. Leblanc, A. Venkateswaran, A. Nurmi, R. Hodgson, Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies, *Transl Neurodegener*. 6 (2017) 6.  
<https://doi.org/10.1186/s40035-017-0077-5>.
- [38] R.J. Andrew, K.A.B. Kellett, G. Thinakaran, N.M. Hooper, A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis, *Journal of Biological Chemistry*. 291 (2016) 19235–19244.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R116.746032>.
- [39] M. Maulik, D. Westaway, J.H. Jhamandas, S. Kar, Role of Cholesterol in APP Metabolism and Its Significance in Alzheimer's Disease Pathogenesis, *Mol Neurobiol*. 47 (2013) 37–63.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8337-y>.
- [40] B.V. Foroutanpay, J. Kumar, S.G. Kang, N. Danaei, D. Westaway, V.L. Sim, S. Kar, The Effects of N-terminal Mutations on  $\beta$ -amyloid Peptide Aggregation and Toxicity, *Neuroscience*. 379 (2018) 177–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.014>.

- [41] C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, S. Sisodia, Trafficking and Proteolytic Processing of APP, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 (2012) a006270–a006270.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- [42] S.L. Cole, R. Vassar, The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the  $\beta$ -secretase, in Alzheimer disease pathophysiology, *Journal of Biological Chemistry.* 283 (2008) 29621–29625.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R800015200>.
- [43] L. Stefanis,  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 (2012).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
- [44] T. Tripathi, A Master Regulator of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation, *ACS Chem Neurosci.* 11 (2020) 1376–1378.  
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00216>.
- [45] C.L. Sayas, E. Tortosa, F. Bollati, S. Ramírez-Ríos, I. Arnal, J. Avila, Tau regulates the localization and function of End-binding proteins 1 and 3 in developing neuronal cells, *J Neurochem.* 133 (2015) 653–667.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13091>.
- [46] P. Barbier, O. Zejneli, M. Martinho, A. Lasorsa, V. Belle, C. Smet-Nocca, P.O. Tsvetkov, F. Devred, I. Landrieu, Role of tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects, *Front Aging Neurosci.* 10 (2019).  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>.
- [47] J. Avila, J.S. Jiménez, C.L. Sayas, M. Bolós, J.C. Zabala, G. Rivas, F. Hernández, Tau Structures, *Front Aging Neurosci.* 8 (2016).  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00262>.
- [48] A. Aguzzi, A.M. Calella, Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, (2009).  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2009.-Transmissible>.

- [49] Z.L. Almeida, R.M.M. Brito, Structure and aggregation mechanisms in amyloids, *Molecules*. 25 (2020).  
<https://doi.org/10.3390/molecules25051195>.
- [50] W.T. Astbury, S. Dickinson, K. Bailey, The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins, *Biochemical Journal*. 29 (1935) 2351-2360.1.  
<https://doi.org/10.1042/bj0292351>.
- [51] M. Sunde, C. Blake, The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and x-ray diffraction, *Adv Protein Chem*. 50 (1997) 123–159.  
[https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60320-4](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60320-4).
- [52] K. Konstantoulea, N. Louros, F. Rousseau, J. Schymkowitz, Heterotypic interactions in amyloid function and disease, *FEBS J*. 289 (2022) 2025–2046.  
<https://doi.org/10.1111/febs.15719>.
- [53] M. Schleegeer, C.C. Vandenakker, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, K.P. Velikov, G. Koenderink, M. Bonn, Amyloids: From molecular structure to mechanical properties, *Polymer (Guildf)*. 54 (2013) 2473–2488.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.02.029>.
- [54] J.L. Jiménez, J.I. Guijarro, E. Orlova, J. Zurdo, C.M. Dobson, M. Sunde, H.R. Saibil, Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing, *EMBO J*. 18 (1999) 815–821.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.815>.
- [55] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade, *Annu Rev Biochem*. 86 (2017) 27–68.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>.
- [56] E. Chatani, N. Yamamoto, Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation, *Biophys Rev*. 10 (2018) 527–534.  
<https://doi.org/10.1007/s12551-017-0353-8>.

- [57] R. Morales, I. Moreno-Gonzalez, C. Soto, Cross-Seeding of Misfolded Proteins: Implications for Etiology and Pathogenesis of Protein Misfolding Diseases, *PLoS Pathog.* 9 (2013).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003537>.
- [58] K. Farmer, J.E. Gerson, R. Kaye, Oligomer Formation and Cross-Seeding: The New Frontier, *Isr J Chem.* 57 (2017) 665–673.  
<https://doi.org/10.1002/ijch.201600103>.
- [59] D.S. Eisenberg, M.R. Sawaya, Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level, (2017).  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>.
- [60] R.L. Andrew, *Molecular Modelling Principles and Application*, Second Edition, Prentice Hall, 2001.
- [61] W.D. Cornell, P. Cieplak, / Christopher, I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, *A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules*, 1995.  
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [62] A.D. Mackerell, D. Bashford, † M Bellott, † R L Dunbrack, J.D. Evanseck, M.J. Field, † S Fischer, † J Gao, † H Guo, † S Ha, † D Joseph-Mccarthy, ‡ † L Kuchnir, † K Kuczera, † F T K Lau, † C Mattos, S. Michnick, † T Ngo, † D T Nguyen, † B Prodhom, † W E Reiher, † B Roux, † M Schlenkrich, J.C. Smith, † R Stote, † J Straub, † M Watanabe, † J Wiórkiewicz-Kuczera, † D Yin, M. Karplus, *All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †*, 1998.  
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [63] C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. Van Gunsteren, A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6, *J Comput Chem.* 25 (2004) 1656–1676.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.20090>.

- [64] W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids, 1996.  
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [65] C.E.A. Chang, Y.M.M. Huang, L.J. Mueller, W. You, Investigation of structural dynamics of enzymes and protonation states of substrates using computational tools, *Catalysts*. 6 (2016).  
<https://doi.org/10.3390/catal6060082>.
- [66] S.P. Kadaoluwa Pathirannahalage, N. Meftahi, A. Elbourne, A.C.G. Weiss, C.F. McConville, A. Padua, D.A. Winkler, M. Costa Gomes, T.L. Greaves, T.C. Le, Q.A. Besford, A.J. Christofferson, Systematic Comparison of the Structural and Dynamic Properties of Commonly Used Water Models for Molecular Dynamics Simulations, *J Chem Inf Model*. 61 (2021) 4521–4536.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00794>.
- [67] P. Mark, L. Nilsson, Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K, *Journal of Physical Chemistry A*. 105 (2001) 9954–9960.  
<https://doi.org/10.1021/jp003020w>.
- [68] S. Izadi, R. Anandkrishnan, A. V. Onufriev, Building water models: A different approach, *Journal of Physical Chemistry Letters*. 5 (2014) 3863–3871.  
<https://doi.org/10.1021/jz501780a>.
- [69] Y. Xiong, S. Izadi, A. V Onufriev, A fast polarizable water model for atomistic simulations, n.d.
- [70] S. Izadi, A. V. Onufriev, Accuracy limit of rigid 3-point water models, *Journal of Chemical Physics*. 145 (2016).  
<https://doi.org/10.1063/1.4960175>.
- [71] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J Chem Phys*. 79 (1983) 926–935.



<https://doi.org/10.1063/1.445869>.

- [72] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, J. Hermans, Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration, in: 1981: pp. 331–342.

[https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1_21).

- [73] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potentials, *J Phys Chem.* 91 (1987) 6269–6271.

<https://doi.org/10.1021/j100308a038>.

- [74] A. Alkhwaji, S. Elbahloul, M.Z. Abdullah, K.F.B.A. Bakar, Selected water thermal properties from molecular dynamics for engineering purposes, *J Mol Liq.* 324 (2021).

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114703>.

- [75] S.F. Sousa, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, Protein-ligand docking: Current status and future challenges, *Proteins: Structure, Function and Genetics.* 65 (2006) 15–26.

<https://doi.org/10.1002/prot.21082>.

- [76] J. Fan, A. Fu, L. Zhang, Progress in molecular docking, *Quantitative Biology.* 7 (2019) 83–89.

<https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>.

- [77] A.M. Dar, S. Mir, Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges, *J Anal Bioanal Tech.* 08 (2017).

<https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000356>.

- [78] A.N. Jain, A. Nicholls, Recommendations for evaluation of computational methods, *J Comput Aided Mol Des.* 22 (2008) 133–139.

<https://doi.org/10.1007/s10822-008-9196-5>.

- [79] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular docking and structure-based drug design strategies, *Molecules.* 20 (2015) 13384–13421.

<https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.

- [80] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, n.d.
- [81] R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, *J Med Chem.* 47 (2004) 1739–1749.  
<https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- [82] I.A. Guedes, C.S. de Magalhães, L.E. Dardenne, Receptor-ligand molecular docking, *Biophys Rev.* 6 (2014) 75–87.  
<https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.
- [83] S.Y. Huang, X. Zou, Advances and challenges in Protein-ligand docking, *Int J Mol Sci.* 11 (2010) 3016–3034.  
<https://doi.org/10.3390/ijms11083016>.
- [84] U. Yadava, Search algorithms and scoring methods in protein-ligand docking, *Endocrinology&Metabolism International Journal.* 6 (2018).  
<https://doi.org/10.15406/emij.2018.06.00212>.
- [85] T.J.A. Ewing, I.D. Kuntz, Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening, *J Comput Chem.* 18 (1997) 1175–1189.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19970715\)18:9<1175::AID-JCC6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19970715)18:9<1175::AID-JCC6>3.0.CO;2-O).
- [86] H.-J. Böhm, The computer program LUDI: A new method for the de novo design of enzyme inhibitors, *J Comput Aided Mol Des.* 6 (1992) 61–78.  
<https://doi.org/10.1007/BF00124387>.
- [87] M.D. Miller, S.K. Kearsley, D.J. Underwood, R.P. Sheridan, FLOG: A system to select ?quasi-flexible? ligands complementary to a receptor of known three-dimensional structure, *J Comput Aided Mol Des.* 8 (1994) 153–174.  
<https://doi.org/10.1007/BF00119865>.

- [88] N. Sauton, D. Lagorce, B.O. Villoutreix, M.A. Miteva, MS-DOCK: Accurate multiple conformation generator and rigid docking protocol for multi-step virtual ligand screening, *BMC Bioinformatics*. 9 (2008) 184.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-184>.
- [89] N. Metropolis, A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, A.H. Teller, E. Teller, Equation of State Calculations by Fast Computing Machines, *J Chem Phys*. 21 (1953) 1087–1092.  
<https://doi.org/10.1063/1.1699114>.
- [90] T.N. Hart, R.J. Read, A multiple-start Monte Carlo docking method, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 13 (1992) 206–222.  
<https://doi.org/10.1002/prot.340130304>.
- [91] M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD., *Proteins*. 52 (2003) 609–23.  
<https://doi.org/10.1002/prot.10465>.
- [92] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J Comput Chem*. 30 (2009) 2785–2791.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [93] F. Glover, M. Laguna, Tabu Search-Modern Heuristic Techniques for Combinatorial Problems Telecommunications Network Design View project Cross-dock Door Assignment Problem View project, 2000.  
<http://www.upt.pt/tabusearch>.
- [94] D.R. Westhead, D.E. Clark, C.W. Murray, A comparison of heuristic search algorithms for molecular docking., *J Comput Aided Mol Des*. 11 (1997) 209–228.  
<https://doi.org/10.1023/A:1007934310264>.

- [95] R. Eberhart, J. Kennedy, A new optimizer using particle swarm theory, in: MHS'95. Proceedings of the Sixth International Symposium on Micro Machine and Human Science, IEEE, n.d.: pp. 39–43.  
<https://doi.org/10.1109/MHS.1995.494215>.
- [96] J. Kennedy, R. Eberhart, Particle swarm optimization, in: Proceedings of ICNN'95 - International Conference on Neural Networks, IEEE, n.d.: pp. 1942–1948.  
<https://doi.org/10.1109/ICNN.1995.488968>.
- [97] D. Wang, D. Tan, L. Liu, Particle swarm optimization algorithm: an overview, *Soft Comput.* 22 (2018) 387–408.  
<https://doi.org/10.1007/s00500-016-2474-6>.
- [98] S. Janson, D. Merkle, M. Middendorf, Molecular docking with multi-objective Particle Swarm Optimization, *Appl Soft Comput.* 8 (2008) 666–675.  
<https://doi.org/10.1016/j.asoc.2007.05.005>.
- [99] K. Chen, T. Li, T. Cao, Tribe-PSO: A novel global optimization algorithm and its application in molecular docking, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 82 (2006) 248–259.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.06.017>.
- [100] H.K. Tai, H. Lin, S.W.I. Siu, Improving the efficiency of PSOVina for protein-ligand docking by two-stage local search, in: 2016 IEEE Congress on Evolutionary Computation (CEC), IEEE, 2016: pp. 770–777.  
<https://doi.org/10.1109/CEC.2016.7743869>.
- [101] G. Wu, D.H. Robertson, C.L. Brooks, M. Vieth, Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER?A CHARMM-based MD docking algorithm, *J Comput Chem.* 24 (2003) 1549–1562.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.10306>.
- [102] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated

docking with selective receptor flexibility, *J Comput Chem.* 30 (2009) 2785–2791.

<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

- [103] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J Comput Chem.* 19 (1998) 1639–1662.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).

- [104] S.-Y. Huang, S.Z. Grinter, X. Zou, Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions, *Physical Chemistry Chemical Physics.* 12 (2010) 12899.

<https://doi.org/10.1039/c0cp00151a>.

- [105] P.K. Weiner, P.A. Kollman, AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions, *J Comput Chem.* 2 (1981) 287–303.

<https://doi.org/10.1002/jcc.540020311>.

- [106] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J Comput Chem.* 4 (1983) 187–217.

<https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>.

- [107] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule–ligand interactions., *J Mol Biol.* 161 (1982) 269–88.

[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90153-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90153-x).

- [108] D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications, *Nat Rev Drug Discov.* 3 (2004) 935–949.

<https://doi.org/10.1038/nrd1549>.

- [109] R. Wang, L. Liu, L. Lai, Y. Tang, SCORE: A New Empirical Method for Estimating the Binding Affinity of a Protein-Ligand Complex, *J Mol Model.* 4 (1998) 379–394.  
<https://doi.org/10.1007/s008940050096>.
- [110] M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G. V Paolini, R.P. Mee, Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes., *J Comput Aided Mol Des.* 11 (1997) 425–45.  
<https://doi.org/10.1023/a:1007996124545>.
- [111] R. Wang, L. Lai, S. Wang, Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction., *J Comput Aided Mol Des.* 16 (2002) 11–26.  
<https://doi.org/10.1023/a:1016357811882>.
- [112] F.D. Prieto-Martínez, M. Arciniega, J.L. Medina-Franco, Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos, *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas.* 21 (2018).  
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>.
- [113] J. Li, A. Fu, L. Zhang, An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking, *Interdiscip Sci.* 11 (2019) 320–328.  
<https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.
- [114] H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe, Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions., *J Mol Biol.* 295 (2000) 337–56.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3371>.
- [115] H.F.G. Velec, H. Gohlke, G. Klebe, DrugScore(CSD)-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction., *J Med Chem.* 48 (2005) 6296–303.  
<https://doi.org/10.1021/jm050436v>.

- [116] R.S. DeWitte, E.I. Shakhnovich, SMOG: de Novo Design Method Based on Simple, Fast, and Accurate Free Energy Estimates. 1. Methodology and Supporting Evidence, *J Am Chem Soc.* 118 (1996) 11733–11744.  
<https://doi.org/10.1021/ja960751u>.
- [117] M. Feher, Consensus scoring for protein-ligand interactions, *Drug Discov Today.* 11 (2006) 421–428.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.03.009>.
- [118] J.H. Holland, *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, The MIT Press, 1992.  
<https://doi.org/10.7551/mitpress/1090.001.0001>.
- [119] S. Kirkpatrick, C.D. Gelatt, M.P. Vecchi, Optimization by Simulated Annealing, *Science* (1979). 220 (1983) 671–680.  
<https://doi.org/10.1126/science.220.4598.671>.
- [120] M. Totrov, R. Abagyan, *Flexible Protein-Ligand Docking by Global Energy Optimization in Internal Coordinates*, n.d.
- [121] C. Blum, M.J.B. Aguilera, A. Roli, M. Sampels, eds., *Hybrid Metaheuristics*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-78295-7>.
- [122] J. Baxter, Local Optima Avoidance in Depot Location, *Journal of the Operational Research Society.* 32 (1981) 815–819.  
<https://doi.org/10.1057/jors.1981.159>.
- [123] J. Nocedal, S.J.W. Springer, *Numerical Optimization*, n.d.
- [124] R. Wang, X. Fang, Y. Lu, S. Wang, The PDBbind Database: Collection of Binding Affinities for Protein–Ligand Complexes with Known Three-Dimensional Structures, *J Med Chem.* 47 (2004) 2977–2980.  
<https://doi.org/10.1021/jm030580l>.
- [125] R. Wang, X. Fang, Y. Lu, C.-Y. Yang, S. Wang, The PDBbind Database: Methodologies and Updates, *J Med Chem.* 48 (2005) 4111–4119.

<https://doi.org/10.1021/jm048957q>.

- [126] M.P. Allen, D.J. Tildesley, COMPUTER SIMULATION OF LIQUIDS, Second Edition, Oxford University Press, 2017.
- [127] L. Verlet, “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules, 1967.
- [128] N.S. Martys, R.D. Mountain, Velocity Verlet algorithm for dissipative-particle-dynamics-based models of suspensions, *Phys Rev E*. 59 (1999) 3733–3736.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.59.3733>.
- [129] W.F. Van Gunsteren, H.J.C. Berendsen, A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics, *Mol Simul.* 1 (1988) 173–185.  
<https://doi.org/10.1080/08927028808080941>.
- [130] M.S. Badar, S. Shamsi, J. Ahmed, Md.A. Alam, Molecular Dynamics Simulations: Concept, Methods, and Applications, in: 2022: pp. 131–151.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-94651-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-94651-7_7).
- [131] S. Gupta, P. Kumar Varadwaj, A BRIEF OVERVIEW ON MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF BIOMOLECULAR SYSTEM: PROCEDURE, ALGORITHMS AND APPLICATIONS, *Int J Pharm Sci Res.* 9 (2018) 1333.  
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(4\).1333-50](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1333-50).
- [132] GROMACS Documentation Release 2022.2 GROMACS development team, 2022.
- [133] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. Van Gunsteren, A. Dinola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J Chem Phys.* 81 (1984) 3684–3690.  
<https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- [134] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J Chem Phys.* 126 (2007) 014101.  
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>.



- [135] H.J.C. Berendsen, Transport Properties Computed by Linear Response through Weak Coupling to a Bath, in: *Computer Simulation in Materials Science*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1991: pp. 139–155.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-011-3546-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3546-7_7).
- [136] M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *J Appl Phys.* 52 (1981) 7182–7190.  
<https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- [137] S. Nosé, A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble, *Mol Phys.* 52 (1984) 255–268.  
<https://doi.org/10.1080/00268978400101201>.
- [138] J.P. Ryckaert, G. Ciccotti, H.J.C. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *J Comput Phys.* 23 (1977) 327–341.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5).
- [139] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations, *J Comput Chem.* 18 (1997) 1463–1472.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H).
- [140] S. Samantray, F. Yin, B. Kav, B. Strodel, Different Force Fields Give Rise to Different Amyloid Aggregation Pathways in Molecular Dynamics Simulations, *J Chem Inf Model.* 60 (2020) 6462–6475.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01063>.
- [141] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J Chem Phys.* 103 (1995) 8577–8593.  
<https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [142] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J Mol Graph.* 14 (1996) 33–38.

[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

- [143] The PyMOL Molecular Graphics System, (n.d.).
- [144] D.A. and A. Case, H.M. and Belfon, K. and Ben-Shalom, I. and Brozell, S.R. and Cerutti, D.S. and Cheatham, T.E. and Cruzeiro, V.W.D. and Darden, T.A. and Duke, R.E. and others, Amber 2021, University of California, San Francisco, 2021.
- [145] B.R. Miller, T.D. McGee, J.M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, A.E. Roitberg, MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations, *J Chem Theory Comput.* 8 (2012) 3314–3321.  
<https://doi.org/10.1021/ct300418h>.
- [146] M.S. Valdés-Tresanco, M.E. Valdés-Tresanco, P.A. Valiente, E. Moreno, Gmx\_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS, *J Chem Theory Comput.* 17 (2021) 6281–6291.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>.
- [147] S.L. Shammass, T.P.J. Knowles, A.J. Baldwin, C.E. MacPhee, M.E. Welland, C.M. Dobson, G.L. Devlin, Perturbation of the stability of amyloid fibrils through alteration of electrostatic interactions, *Biophys J.* 100 (2011) 2783–2791.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.039>.
- [148] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers.* 22 (1983) 2577–2637.  
<https://doi.org/10.1002/bip.360221211>.
- [149] G.J. Nuovo, D. Suster, D. Sawant, A. Mishra, J.J. Michaille, E. Tili, The amplification of CNS damage in Alzheimer’s disease due to SARS-CoV2 infection, *Ann Diagn Pathol.* 61 (2022).  
<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152057>.
- [150] X. Xia, Y. Wang, J. Zheng, COVID-19 and Alzheimer’s disease: how one crisis worsens the other, *Transl Neurodegener.* 10 (2021).

<https://doi.org/10.1186/s40035-021-00237-2>.

- [151] A.D. Chesney, B. Maiti, U.H.E. Hansmann, Human Amylin in the Presence of SARS-COV-2 Protein Fragments, *ACS Omega*. 8 (2023) 12501–12511.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00621>.
- [152] A.K. Jana, A.B. Greenwood, U.H.E. Hansmann, Presence of a SARS-CoV-2 Protein Enhances Amyloid Formation of Serum Amyloid A, *Journal of Physical Chemistry B*. 125 (2021) 9155–9167.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c04871>.
- [153] A.K. Jana, C.W. Lander, A.D. Chesney, U.H.E. Hansmann, Effect of an Amyloidogenic SARS-COV-2 Protein Fragment on  $\alpha$ -Synuclein Monomers and Fibrils, *Journal of Physical Chemistry B*. 126 (2022) 3648–3658.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c01254>.
- [154] A.D. Chesney, B. Maiti, U.H.E. Hansmann, SARS-COV-2 Spike Protein Fragment eases Amyloidogenesis of  $\alpha$ -Synuclein, (n.d.).  
<https://doi.org/10.1101/2023.05.06.539715>.





