

**$\beta_2$  Adrenerjik Reseptöründe Aktif Ve İnaktif Hallere Geçişlerdeki Allosterik Mekanizmanın Araştırılması Ve İlaç Tasarım Çalışmalarında Uygulaması**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 213M544**

Proje Yürütücüsü:  
**Doç. Dr. E. Demet AKDOĞAN**

Araştırmacı:

Prof. Dr. Pemra DORUKER

Bursiyerler:

Canan ÖZGÜR

Gonca DİLCAN

Arzu UYAR

Müberra YILMAZ

Ebru ÇETİN

Başak AKDAŞ

ARALIK 2016  
İSTANBUL

## ÖNSÖZ

Bu projede çalışılan biyolojik sistem, bir hücre zarı reseptörü olan  $\beta_2$ -adrenerjik reseptördür. Moleküler düzeyde modelleme ve simülasyon yöntemleri yardımıyla proteindeki önemli alosterik bölgeler ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca, proteine ait daha önce tanımlanmamış yeni bir inaktif yapının son derece kararlı olan yapısı ilk defa gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, uygulanan doking hesapları sonucunda antagonist/ters agonist moleküllerin keşfedilmesinde kullanılacak reseptörün seçici konformasyonları ortaya çıkartılmıştır.

TÜBİTAK 1001 destekli 213M544 no'lu bu proje, Kadir Has Üniversite bünyesi altında, Boğaziçi Üniversitesi ile işbirliği çerçevesinde 1 Nisan 2014 - 1 Ekim 2016 tarihleri arasında yürütülmüştür.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	5
3.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları (Harmonik Kısıtlamalarla ve Kısıtlamasız)	5
3.2 Kümeleme Uygulaması	9
3.3 Doking Uygulamaları	9
3.4 Sanal Tarama ve Analiz	11
3.5 Allosterik Sinyal Aktarım Yollarının Belirlenmesi	11
4. BULGULAR	13
4.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları ve Analiz (İş Paketleri 1 ve 2)	13
4.1.1 Kısıtlamasız MD simülasyonları	13
4.1.2 Kısıtlamalı MD simülasyonları	17
4.2 Moleküler Dinamik Gidişlerinin Kümelenmesi ve Farklı Reseptör Konformasyonlarının Belirlenmesi	26
4.3 Doking Çalışmaları: Konformasyonların İlaç Molekülünün Etkisine Göre Sınıflandırılması	28
4.4 Sanal Tarama ve Analiz	33
4.5 Allosterik Sinyal Aktarım Yollarının Belirlenmesi	36
4.6 Yönlendirilmiş MD (steered MD) Yöntemiyle ICL3'ün Serbest Bağlanma Enerjisinin ( $\Delta G$ ) Hesaplanması	41
4.6.1 Ligant Bağlanma Bölgesini Daraltacak Şekilde Kısıtlamalı 24 Å Yönlendirilmiş MD Analizi	41
4.6.2 PMF Hesapları: 24 Å Yönlendirilmiş MD Analizi	42
5. TARTIŞMA/SONUÇ	44
6. REFERANSLAR	46

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kısıtlamalı ve kısıtlamasız MD simülasyonların tanımı ve başlangıç yapıları	7
Table 2. Kısıtlamalı MD simülasyonlarındaki bağ kısıtlamaları ve deneysel ölçümlerdeki uzaklık değerleri	8
Tablo 3. Bilinen 5 inaktif ve 6 aktif kristal yapılarıdaki ligant türleri, aktivite ve biyolojik etkileri	28
Tablo 4. Carazolol molekülünün kristal yapıları gerçekleştirildiği doking sonuçları.	29
Tablo 5. Kristal yapıları bilinen 8 ligant molekülü için doking sonuçlarının özeti	30
Tablo 6. Kristal yapısı bilinen 8 ligant ve bilinmeyen 6 ligant molekülün doking sonuçları	31
Tablo 7. Carazolol için 11 kristal yapı ve 13 MD konformasyonuna yapılan doking sonuçları	32
Tablo 8. Ligant moleküllerin doking sonuçlarında ilk 11'de yer alan ve en az üç doking programında çıkan MD konformasyonları	32

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Proteinin lipid tabaka içine gömülü başlangıç yapısı ( $t = 0$ ). +z eksenini, lipid tabaka boyunca ve hücre dışından hücre içine doğru uzanmaktadır. 6
- Şekil 2. Ligant bağlanma bölgesinin hücre dışından görüntüsü, (a) Kritik rezidüleri ve 7 adet kısıtlanan uzaklıklar, (b) kristal yapısı bilinen inaktif haldeki (PDB kodu: 2RH1) carazolol'un (a)'dakine benzer bir açıdan görüntüsü 8
- Şekil 3. Kristal ve MD konformasyonlara dok edilecek ligant molekülleri. 4 ters agonist (1) JSZ, (2) ICI 118,55, (3) timolol and (4) carazolol, 4 antagonist (5) alprenolol, (6) nebivolol, (7) butaxamine and (8) esmolol ve 5 agonist (9) formoterol, (10) salbutamol, (11) hydroxybenzylisoproterenol, (12) BI-167107 and (13) epinephrine 10
- Şekil 4. Kısa yol izi hesabı için kullanılan model ve özeti (grafik görüntüleme için Pymol programı ile kullanılmıştır, v 1.7.4 by Schrödinger, LLC) 12
- Şekil 5. ICL3 bölgesinin orijinal  $MD1_{\mu s}$  simülasyon sırasında farklı zamanlardaki görüntüsü 13
- Şekil 6. RMSD profilleri (a)  $MD1_{\mu s\_ctd1}$ , (b)  $MD1_{\mu s\_ctd2}$ , orijinal  $MD1_{\mu s}$  ile birlikte gösterilmiştir, (c) ICL3 kapanmasının simülasyon başında (kırmızı), ortasında (beyaz) ve sonunda (mavi) hücre içinden görüntüleri. 14
- Şekil 7. Hidrojen bağ profilleri. Her iki devam simülasyonları ( $MD1_{\mu s\_ctd1}$  ve  $MD1_{\mu s\_ctd2}$ ), sırasıyla [1000-1500] ve [1500-2000] zaman aralığında gösterilmiştir. Orijinal  $MD1_{\mu s}$  simülasyon ise [0-1000] aralığındadır. Hidrojen bağı oluşturan gruplar, alıcı ya da verici olarak, sırasıyla yeşil ve kırmızı noktalarla ayırt edilmiştir. 15
- Şekil 8. Reseptörün hücre içi ve dışına bakan bölgelerindeki eş zamanlı konformasyonel değişimler. a) ve b) TM6'nın alt kısmının RMSD değerine karşı S207O $\gamma$ -D113C $\gamma$  arası mesafenin değişimi. Orijinal simülasyon kırmızı noktalarla, devam simülasyonları yeşil noktalarla gösterilmiştir. c) Hücre dışından bağlanma bölgesinin görüntüsü, d) TM6'nın aktif (yeşil), simülasyonun başındaki (mavi) ve sonundaki görüntüleri (macenta) 17
- Şekil 9. 500 ns uzunluğundaki ilk kısıtlanmalı MD simülasyonu ( $rstr1$ ) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapısı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir. Eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (b) yan cepheden ve (c) hücre içinden. 18
- Şekil 10. 500 ns uzunluğundaki ikinci kısıtlanmalı MD simülasyonu ( $rstr2$ ) sonuçları.

(a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir. Eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (b) yan cepheden ve (c) hücre içinden	19
Şekil 11. 500 ns uzunluğundaki üçüncü kısıtlanmalı MD simülasyona ( <i>rstr3</i> ) ait başlangıç yapısının (macenta) ilk kısıtlanmalı ( <i>rstr1</i> ) simülasyona ait başlangıç yapısı ile karşılaştırılması (a) yandan ve (b) hücre içinden görüntüler (c) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi.	21
Şekil 12. Üçüncü kısıtlanmalı simülasyonda ( <i>rstr3</i> ), ilk ve son görüntülerin karşılaştırılması (a) hücre dışından (b) hücre içinden alınan görüntüler. TM5, TM6 ve ICL3 bölgelerine odaklanılmış.	22
Şekil 13. 500 ns uzunluğundaki dördüncü kısıtlanmalı MD simülasyonu ( <i>rstr4</i> ) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir. Eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (b) yan cepheden ve (c) hücre içinden.	23
Şekil 14. Kısıtlamaların kalktığı 500 ns'lık MD simülasyonunda ( <i>MD500ns</i> ) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir.	24
Şekil 15. 500 ns uzunluğundaki dördüncü kısıtlanmalı MD simülasyonu ( <i>rstr4</i> ) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir.	25
Şekil 16. Kümeleme sonucu oluşan 13 temsili yapıdan alınan ve kümele için kullanılan (a) 5 kritik rezidü (b) tüm reseptör konformasyonu (c) oluşan kümeler ve barındırdıkları konformasyonlar.	27
Şekil 17. Doking çalışmalarında uygulanan sınıflandırma protokolü	29
Şekil 18. Kristal yapılar ve MD konformasyonları için ROC eğrileri (a) normalize edilmemiş (b) $N^{0.5}$ ile normalize edilmiş skor değerleri için	34
Şekil 19. MD konformasyonları için ROC eğrileri. $N^{0.5}$ ile normalize edilmiş skor değerleri için. İnaktif kristal yapı ile beraber gösterilmiş.	35
Şekil 20. G Protein bağlanma bölgesi ve seçilen bitiş noktalarının görüntüsü	36
Şekil 21. En kısa 20 haberleşme yolunda bulunan rezidülerin ortalama görülme sıklıkları (a) GLN229, (b) LEU266, ve (c) Ser329	38
Şekil 22. En kısa 20 haberleşme yolu için hesaplanan skor değerlerinin dağılım	

grafiği (a) GLN229, (b) LEU266, ve (c) Ser329	40
Şekil 23. 10 Å/ns hızda gerçekleştirilen simülasyonda (a) kuvvet profilleri (b) iş gidişizleri	42
Şekil 24. (a) 2.4 Å/ns 24 Å çekiş uygulanmış ölçümlerin ham PMF verisi ile yapılandırılmış PMF karşılaştırması, ölçümler 10 simülasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir. (b) PMF1 iş gidişizi üzerinden hesaplanan ilk set PMF2 iş gidişizi üzerinden hesaplanan ikinci set PMFT: toplam gerçekleştirilen iş gidişizleri üzerinden hesaplanan set	43

## ÖZET

Önemli bir hücre zarı proteini olan  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörü (kısaca  $\beta_2$ -AR), G protein bağlantılı reseptör (GPCR) üstfamilyasından olup, farklı sinyal aktarım yollarında başlangıç konumundadır. Lipid hücre zarı içine gömülü yedi sarmal ve, hücre içi ve dışına bakan loop bölgelerden oluşan tersiyer yapısı, reseptörde sinyal başlatımı için gerekli konformasyonel esnekliği sağlamaktadır. İnsana ait  $\beta_2$ -AR'ın üç boyutlu yapısı 2007'den bu yana bir çok defa hem aktif, hem de inaktif hallerindeyken ortaya çıkartılmış olmasına rağmen, konformasyonel çeşitliliği gösteren ara yapılar ve allosterik mekanizma tam olarak çözülememiştir. Diğer tarafta, hücre içine bakan ve proteinin dinamik karakterini önemli ölçüde etkileyen 32 rezidülük bir loop bölgesi olan ICL3 hiç bir deneysel ve simülasyon çalışmasında dikkate alınmamıştır. Bu çalışmanın en temel hedefi, hücre içi ve hücre dışına bakan bölgeler arasındaki allosterik etkileşimi bu son derece önemli ICL3 bölgesiyle beraber ortaya çıkartmak ve aktif/inaktif geçişlerdeki ara halleri belirleyerek ilaç tarama çalışmalarında daha etkin olacak reseptör yapıları belirlemektir.

Bu projede toplam 4 mikrosaniyeyi bulan 9 farklı Moleküler Dinamik simülasyonu (NAMD) gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda, ICL3 bölgesinin reseptörün alt kısmında kapalı olduğu inaktif yapının son derece kararlı olduğu, bunun da ICL3 ile beşinci ve altıncı transmembran heliksler (TM5 ve TM6) arasındaki çok sayıda hidrojen bağı sayesinde gerçekleştiği ortaya çıkartılmıştır. Bunun yanı sıra, reseptörün hücre dışına yakın olan ligant bağlama bölgesinde yer alan çok sayıda kritik rezidüel arasına belirli derecelerde uzaklık kısıtlamaları getirilmiştir. Bu kısıtlamaların, reseptörün ICL3'ü de içine alan hücre içine bakan alt bölgesini ciddi biçimde etkilediği, bunun da allosterik etkileşimler sonucunda gerçekleştiği görülmüştür. 4 mikrosaniye gibi bir veri kaynağı kullanılarak, sadece ligant bağlama bölgesindeki rezidüle göre yapılan bir kümeleme yöntemiyle, reseptörün birbirinden çok farklı konformasyonları elde edilmiştir. Elde edilen her konformasyon, ligant bağlama bölgesi için değişik ara halleri temsil etmektedir. Küçük çapta bir veri bankası kullanılarak yapılan taramalar sonucunda, konformasyonlardan bazılarının bilinen kristal yapılardan çok daha seçici olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:**  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörü, GPCR, allosterik mekanizma, Moleküler Dinamik simülasyonu, ICL3 loop bölgesi, konformasyonel değişim



## ABSTRACT

As the member of G protein coupled receptor (GPCR) superfamily, human  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) plays an important role as the starting point of many distinct signaling pathways. Its tertiary structure composed of seven transmembrane helices and several intra- and extracellular loop regions allows the receptor the conformational flexibility necessary for initiation of the signaling. The crystal structure had been determined several times since 2007 in both active and inactive states, yet intermediate states representing the full conformational space of the receptor and the allosteric mechanism were not fully resolved. Moreover, the relatively long intracellular loop (ICL3) composed of 32 residues was missing in all crystallographic experiments and most of simulation studies reported so far. The project's main goal was to investigate the allosteric coupling that exists between intra- and extracellular parts of the receptor in the presence of ICL3 and furthermore, determine distinct conformations that would be used as effective targets in drug screening experiments.

In this project, we performed independent simulation runs adding up to 4  $\mu$ s using NAMD Molecular Dynamics simulation tool. Results indicated that the receptor's alternative inactive state where ICL3 was packed/closed, was preserved at all times due to strong hydrogen bonds connecting ICL3 to receptor's core region, suggesting an inhibition of the receptor's activity. Furthermore, specific bond restraints were imposed between key residues at the ligand-binding site. These restraints had some significant impact on the intracellular G protein binding site, due to strong allosteric coupling between intra- and extracellular parts of the receptor. Finally, distinct conformations were determined after clustering 4  $\mu$ s long trajectory based on RMSD value of some key residues at the ligand-binding site. Some of these conformations were shown to be more selective as target molecules in drug screening experiments than the known inactive crystal structures in detecting antagonists or inverse agonists.

**Keywords:**  $\beta_2$ -adrenergic receptor, GPCR, allosteric mechanism, Molecular Dynamics simulation, ICL3 loop region, conformational variation

## 1. GİRİŞ

İnsana ait  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörü ( $\beta_2$ -AR), G protein bağlantılı reseptör (GPCR) üstfamilyasından olup ökaryotik sinyal yollarında başlangıç noktasındadır. Adrenalin ve noradrenalin hormonları doğal sübstratları olup, akciğer ve kalp kaslarının gevşemesi gibi önemli birtakım fizyolojik etkilere sebep olan bir dizi hücreseel olayın tetikleyicisidir. GPCR ailesindeki diğer tüm reseptörler gibi 7TM olarak adlandırılan bir yapısal motife sahiptir. Bu yapısal motif, hücre zarı içine gömülü yedi alfa sarmaldan ve bu sarmalları birbirine bağlayan loop bölgelerinden oluşmaktadır. Loop bölgelerinden hücre içine bakan ve 32 rezidüden oluşan ICL3 loop bölgesinin reseptörün işlevinde oldukça önemli bir yeri olmasına rağmen hem kristalografik deneylerde hem de bir çok simülasyon çalışmasında göz ardı edilmiştir. Bu çalışmada ise ICL3 bölgesinin bir modeli oluşturularak reseptöre entegre edilmiş ve simülasyonlar bu yeni model ile gerçekleştirilmiştir.

Reseptöre ait her bir alfa sarmal, hücrenin içinden dışına doğru uzanan bir düzlemde diğer sarmallara yaklaşık paralel bir şekilde konumlanmıştır. Bu yedi sarmaldan oluşan buketimsi yapılanma ile beraber, reseptörün işlevi için kritik öneme sahip alosterik bir kenetlenme ortaya çıkmıştır. Bu kenetlenme, sarmalların konformasyonel esnekliği sayesinde, hücre dışından gelen ligant moleküllerin (hormonlar, ilaç molekülleri vs...) reseptöre bağlandığı kavite ile hücre içine doğru uzanan ve G protein ile etkileşim içine girdiği ICL3'ün de içinde bulunduğu bölge arasında gözlemlenmiştir. 2007'den bu yana birçok kere reseptörün kristalografik yapısı hem aktif hem de inaktif hallerde belirlenmiş olmasına rağmen, hiçbirinde aktif/inaktif geçişler sırasında meydana gelen konformasyonel değişimler ayrıntılı bir şekilde ortaya konamamıştır. Bu çalışma sayesinde ilk defa ICL3 ile birlikte reseptörün en gerçekçi dinamik hareketleri ve alosterik kenetlenmenin ayrıntıları incelenmiştir.

GPCR ailesine ait reseptörler, çok farklı sinyal yollarının başlangıç noktaları olmasından dolayı ilaç endüstrisinde üzerinde en fazla çalışılan sistemler olmuşlardır. Ancak, kristalografik görüntüler molekülün anlık görüntüleri olduklarından, alosterik kenetlenme ya da konformasyonel çeşitlilik gibi dinamik bilgilerden yoksundurlar. Dolayısıyla, moleküler dinamik simülasyonlarından elde edilen görüntüler bu açığı kapamada oldukça faydalı yöntemlerdir. Bu projede, sanal tarama yöntemlerinin en büyük eksiği olan farklı konformasyonların ortaya çıkartılması bu sayede mümkün olmuştur. Elde edilen farklı özellikteki görüntülerin, tarama yöntemlerinde çok daha etkin bir şekilde kullanımı gerçekleştirilmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Hormonlar tarafından aktive edilen ilk kristalografik GPCR yapısı  $\beta_2$ -adrenerjik reseptörüne ( $\beta_2$ -AR) aittir ve reseptörün inaktif yapısını temsil etmektedir (Rasmussen vd., 2007; Cherezov vd., 2007). Daha sonraki yıllarda, geliştirilen teknikler sayesinde reseptörün aktif haldeki kristalografik yapısı da ortaya çıkartılabilmektedir (Rasmussen vd., 2011a, 2011b). Ancak, bu sonuçlar reseptörün ara halleri hakkında detaylı bir bilgi vermemektedir. Klasik reseptör teorisine göre aktif konformasyon ( $R^*$ ) G protein ve  $\beta$  arrestin gibi proteinlerle etkileşime geçerek sinyal aktarım yolunu aktive etmektedir. Farklı etkilere sahip agonistler ve antagonistler aktif/inaktif ( $R/R^*$ ) konformasyonlar arasındaki dengeyi farklı şekillerde tutmaktadır (Samana vd., 1994). Son yapılan çalışmalar ligant aktivitesinin bu klasik iki modelli yaklaşımdan farklı olarak, reseptörün aktif ve inaktif halleri dışında çok sayıda farklı konformasyonlar üzerinde etkisini gösterdiği ve her bir ligantın birbirinden çok farklı sinyal yollarını tetiklediğini göstermiştir (Kenakin, 2007; Violin and Lefkowitz, 2007; Kahsai vd., 2011; West vd., 2011). Özellikle 2012'de single-molecule force mikroskopi (SMFS vd DFS) ile yapılan deneysel çalışmada Zocher ve arkadaşları (Zocher vd., 2012) beş farklı ligant molekülün (agonist, antagonist ve inverse agonist) reseptöre bağlanmasıyla, reseptörde karmaşık bir etkileşim ağı oluşturdukları ve bunun sonucunda her bir molekülün reseptörde farklı bölgelerin kinetik, enerjik ve mekanik özelliklerinin değişmesine sebep olduğunu gözlemlemiştir.

Kristalografik çalışmalar, ölçüm için elverişli kristaller elde edebilmek için protein yapısına bazı kısıtlamalar getirmektedir. Örneğin,  $\beta_2$ -AR'da bulunun ve işlevsel açıdan kritik bir bölge olan ICL3 loop bölgesinin kırılarak yerine T4 lizozimin getirilmesi  $\beta_2$ -AR'daki esnekliğin ciddi anlamda azalmasına yol açmıştır (Rasmussen vd., 2007, 2011a; Cherezov vd., 2007). Dolayısıyla, kristal yapılar, doğadaki esnek ve dinamik  $\beta_2$ -AR yapısındaki bilgilerden yoksundur ve bu durum çok farklı konformasyonel değişimlerin gözlemlenmesini imkansız kılmaktadır. Yaklaşık bir ay önce Ekim 2016'da yayımlanan deneysel bir çalışmada, T4L ile kristalize edilen  $\beta_2$ -AR ile doğadaki  $\beta_2$ -AR arasında işlevsel anlamda önemli birtakım lokal konformasyonel değişimler arasında ciddi farklar olduğu gösterilmiştir (Eddy vd., 2016).

ICL3 bölgesinin reseptörün dinamiği üzerindeki belirgin etkileri, Özcan ve arkadaşları tarafından yapılan Moleküler Dinamik simülasyon çalışmalarında da gösterilmiştir (Özcan vd., 2013). Bu çalışmada ICL3 bölgesi kırıldıktan sonra serbest kalan TM5 ve TM6 uçları birbirlerine kovalant bağla bağlanmıştır. ICL3 bölgesi kırılmadan önceki ve sonraki modellerle

yapılan simülasyon sonuçları karşılaştırılmış ve kırılmış modelin dinamiğinde belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir.

ICL3 bölgesinin ölçümlerde dikkate alındığı deneysel bir çalışma da, West ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri kütle spektroskopisi ile yapılan diferansiyel hidrojen/deuteryum dönüşüm (HDX) ölçümleridir [9]. Bu çalışmada,  $\beta_2$ -AR'daki ICL3 bölgesinin reseptörün antagonist ya da ters agonist bağlanmasıyla inaktif hale geçmesi sonucunda, lokal birtakım yapılanmalar sonucunda daha kararlı bir yapıya dönüştüğünü ve içe kapandığını gösterilmiştir. Bir agonist bağlandığında ise, ICL3'teki kararsızlık ve ortama daha açık olması, bilinen aktivasyon sırasındaki konformasyonel değişimle uyum göstermektedir, nitekim ICL3'ün iki uçtan bağlı olduğu beşinci ve altıncı sarmallar (TM5 ve TM6) yana doğru açılarak G protein bağlantı bölgesine geçit vermektedir. Bu deneysel sonuçlarda gözlemlenen ICL3'teki benzer konformasyonel değişimler, Özcan ve arkadaşları tarafından yapılan Moleküler Dinamik simülasyon çalışmalarında da gösterilmiştir (Özcan vd., 2013).

ICL3 bölgesi ile ilgili bir diğer deneysel çalışmada ise, amino asit dizisinde 259-273 rezidüleri arası bir bölgede bulunan ICL3'e karşılık gelecek şekilde sentezlenmiş bir peptit zincirinin G proteinlere bağlanarak onları aktif hale getirdiği, hormonlar olmadan da sinyal aktarımını başlatabildikleri gösterilmiştir (Okuda vd., 2002; Kim vd., 2013; Bhattacharya ve Vaidehi, 2014). Bir diğer peptit çalışmasında ise, benzer şekilde ICL3 bölgesine karşılık gelen peptit zincirlerinin kendi içlerinde sarmal yapılar oluşturabildikleri ve bu sayede sarmalın bir tarafında toplanan pozitif yüklü rezidüleri aracılığıyla,  $G\alpha_s$  alt birimindeki negatif yüklü rezidüleriyle etkileşime geçtikleri gösterilmiştir (Niesen vd., 2001; Liu vd., 2012). Bu türden bir yapılanma Özcan ve arkadaşlarına ait simülasyon çalışmasında da gözlemlenmiştir (Eddy vd., 2016).

$\beta_2$ -AR için gerçekleştirilen bilgisayar destekli ilaç tasarım çalışmaları 2007'de insana ait ilk kristalografik yapı ortaya çıkartıldıktan sonra büyük bir ivme kazandı (Topiol ve Sabio, 2008; Sabio vd., 2008; Katritch vd., 2009; Reynolds vd., 2009; Kolb vd., 2009; Weiss vd., 2013). Bu ilk kristal yapı inverse agonist carazolol'ün bağlı olduğu reseptörün inaktif halini temsil ediyordu. Deneysel yöntemlerle edinilen bilgiler ışığında oluşturulan reseptörün aktif modeli ise, 2010 yılında belirlenen aktif halin kristalografik yapısı ile doğrulandı (PDB id: 3SN6) (Rasmussen vd., 2011). Yeni agonist ve antagonist'lerin keşfi için çok sayıda aday molekül, reseptörün bilinen kristalografik yapılarına dock edilerek tarandı. En iyi bağlanma afinitesi gösteren ligantların aktiviteleri deneysel ölçümlerle doğrulandı. Ancak elde edilen kristalografik yapıların birbirlerine göre olan RMSD farklarının sadece 1-2 Å seviyelerinde

olduğu dikkate alınır, konformasyonel çeşitlilik açısından yetersiz bir veri kaynağı olduğu açıkça görölmektedir. Ayrıca elde edilen yapıların hiçbirinde, yukardaki bahsedilen kritik ICL3 bölgesi dikkate alınmamıştır. Bu projede ise, farklı olarak, reseptörün aktif ve inaktif hallerinin yanı sıra, bir önceki simülasyon çalışmamızda (Ozcan vd., 2013) ilk defa gözlemlenen inaktif konformasyon ilaç tasarım çalışmalarına dahil edilmiştir. Olası farklı konformasyonlar ortaya çıkartılmış ve en iyi bağlandıkları ligant molekülün etkisine göre sınıflandırılarak, önemli bağlantı noktaları belirlenmiştir.

Çok sayıda MD simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonlar, RMSD değerlerine göre kümeleme (clustering) algoritması kullanılarak sınıflandırılıp, her sınıftan temsili bir yapı seçilmiş ve doking uygulamalarında kullanılmıştır. Burada amaç, FDA onaylı etkisi bilinen ilaç moleküllerinin en iyi bağlanma afinitesi gösterdiği konformasyonları ortaya çıkartmaktır. Sonuçlardaki hassasiyeti arttırmak amacıyla, birden fazla doking algoritmaları ve scoring fonksiyonları kullanılmış ve güvenilir ortak bir sonuca varılmıştır. Etkisi bilinen ilaç molekülünün en iyi bağlandığı konformasyon ve ilaç-reseptör arasındaki kritik bağlantı noktaları, ilaç tasarım çalışmalarında aynı etkiye sahip ilaç moleküllerinin keşfinde kullanılabilecek önemli bilgi kaynakları olarak belirtilmiştir. Ayrıca, bu sayede farklı sinyal aktarım yollarının başlamasına sebep olan ilaç moleküllerinin bağlandıkları farklı rezidüle bakılarak, her sinyal aktarım yoluna özgü allosterik bölgeler ortaya çıkartılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Projede kullanılacak başlıca iki teknik Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları ve doking (yerleştirme/yanıştırma) hesaplarıdır. Moleküler Dinamik simülasyonları paralelize edilebilen NAMD (**N**anoscale **M**olecular **D**ynamics) paket programı ile gerçekleştirilmiştir (Phillips vd., 2005). NAMD büyük biyolojik sistemlerin yüksek başarılı simülasyonu için tasarlanmış bir programdır. Charm++ olarak bilinen bir paralel işleme aracını kullanarak, yüzlerce işlemcili yüksek performanslı süper bilgisayarlardan, Gigabit ethernet kullanan sıradan PC'lerden oluşan öbeklere kadar her türlü sisteme kolayca ve verimli bir şekilde ölçeklenebilmektedir.

Doking uygulamaları için AutoDock (Morris vd., 2009), GOLD (Jones vd., 1997) ve Glide (Friesner vd., 2004) yazılım programları ve bunun yanı sıra, DSX (Gohlke vd., 2000) skorum fonksiyonu kullanılmıştır. Moleküllerin görüntülenmesi ve simülasyonun analizi, VMD (Humphrey vd., 1996) ve Pymol (v1.5.0.4, Schrödinger, LLC) programları ile gerçekleştirilmiştir. Her bir teknik, ayrıntıları ve ön çalışmalarıyla aşağıdaki gibi sunulmuştur.

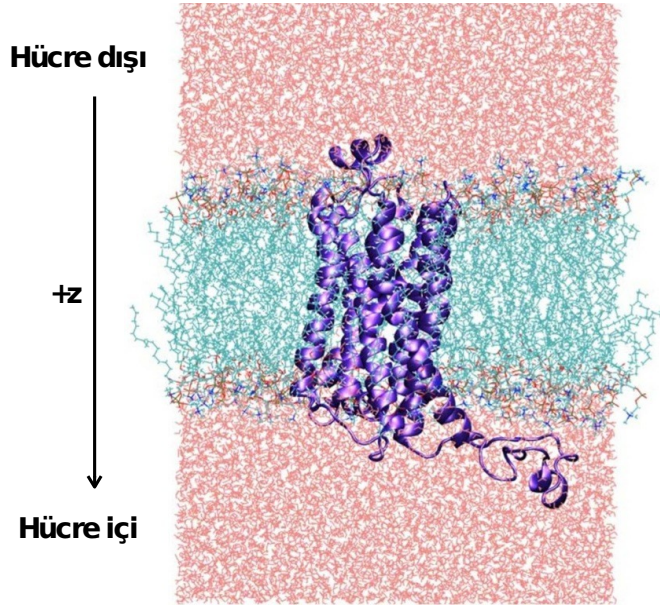
#### 3.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları (Harmonik Kısıtlamalarla ve Kısıtlamasız)

Bir hücre zarı protein olan  $\beta_2$ -AR, içinde bulunduğu fosfolipid hücre zarı (POPC) ve çevresindeki su molekülleri ve iyonlar ( $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$ ) ile birlikte hazırlanmıştır. Protein very bankasında 2RH1 kodu ile kayıtlı ve reseptörün inaktif halini temsil eden kristalografik yapı kullanılmıştır (Cherezov vd., 2007; Rasmussen vd., 2007). Bağlı olduğu yarı ters agonist carazolol çıkartılmış ve reseptörün apo hali, başlangıç yapısı olarak seçilmiştir. Bu sayede, aktif/inaktif arası oluşan bir dizi konformasyonel çeşitlilik bu serbest haldeki yapı sayesinde kolaylıkla gözlemlenebilecektir. Bunun yanı sıra, 2RH1 kodlu yapı,  $\beta_2$ -AR'a ait ilk kristalografik yapıdır. Daha sonraki yıllarda (Hanson vd., 2008; Wacker vd., 2010; Bokoch vd., 2010), reseptörün 5 farklı inaktif yapısı ortaya çıkartılmış, ancak konformasyonel RMSD'leri ilk yapıya göre hesaplandığında 2 Å altında kalmış, özellikle bağlanma bölgesinde bu farkın daha da azaldığı ortaya çıkmıştır. Simülasyonların başlangıç evresi olan dengeye ulaşma evresinde reseptörde meydana gelen daha büyük konformasyonel değişimler göz önünde bulundurulduğunda herhangi bir kristal yapının kullanılacak olması sonuçları etkilemeyecektir.

Kristal yapıda reseptörün bağlı olduğu T4 lizozim çıkartılmış, hücre içine bakan ICL3 loop bölgesi MODELLER programı (Narayanan vd., 2003) ile modellenerek reseptöre

bağlanmıştır. 32 amino asitten oluşan uzun bir loop bölgesi olarak ICL3, son derece hareketli bir yapıya sahip olduğundan kristalografik yöntemlerle kesin bir konformasyon tespiti şimdiye kadar mümkün olmamıştır. Dolayısıyla, bu bölgenin deneyden önce proteinden kesilerek çıkartılması standart bir uygulama haline gelmiştir. Ancak, reseptörün doğadaki yapısını en iyi şekilde temsil edebilmek için simülasyonlara dahil edilmesi önemlidir.

Hücre zarı bir palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) molekülüdür ve VMD'nin Membrane Plug-in Tool programı ile oluşturulmuştur. Su molekülleri hem hücre içinde hem de hücre dışında olacak şekilde VMD'nin Solvate modülü ile eklenmiştir. Son olarak  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonları sistemin toplam yükünü sıfırlamak için sisteme katılmıştır. Bu işlem, elektrostatik enerji hesaplarında kullanılacak Particle-Mesh Ewald yöntemi için gereklidir. Moleküler Dinamik simülasyonları 1 atm basınç ve 310 K sıcaklıkta (NPT) gerçekleştirilmiştir. 5,055 protein atomu, 20,770 lipid (hücre zarı) atomu, 42,135 su atomu, ve sistemin toplam yükünü sıfırlamak için 41 adet  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyon olmak üzere toplam 68.001 atom bulunmaktadır. Proteinin yaklaşık boyutu  $56 \text{ \AA} \times 57 \text{ \AA} \times 71 \text{ \AA}$ , reseptör-hücre zarı-su üçlü sistemi için oluşturulan periyodik kutu boyutu ise  $86 \text{ \AA} \times 86 \text{ \AA} \times 86 \text{ \AA}$ 'dır. Sistemin kurulumu, VMD grafik programının farklı modülleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (Humphrey vd., 1996).



Şekil 1. Proteinin lipid tabaka içine gömülü başlangıç yapısı ( $t = 0$ ). +z eksenini, lipid tabaka boyunca ve hücre dışından hücre içine doğru uzanmaktadır.

Sıcaklığın sabit tutulması için Langevin dinamiği, basıncı sabit tutmak içinse Nose-Hoover Langevin piston kullanılmıştır. Bir zaman adımı 2 fs olarak alınmış, ve veriler her 200 ps'de bir toplanmıştır. Kullanılacak kuvvet alanı proteinler için CHARMM22 (Mackerell vd., 1992

1998), lipidler içinse CHARMM27 (Foloppe ve Mackerell, 2000) olarak belirlenmiştir. Su molekülleri TIP3P ile modellenmiştir (Jorgensen vd., 1983).

Öncelikle, kısıtlamalar olmadan, bir önceki çalışmamızda gerçekleştirilen 1  $\mu$ s'lik simülasyon yukarıda bahsedilen koşullar altında 500 ns daha uzatılmıştır. Bu uygulama birbirinden bağımsız koşturulacak iki simülasyon ile gerçekleştirilmiştir. Simülasyonlardan çıkan gidişizleri analiz edilerek, RMSD, RMSF grafiklerinin yanı sıra, ICL3 ve transmembran heliks 6'daki konformasyonel değişimler elde edilmiştir. Bir önceki 1  $\mu$ s'lik simülasyon ilk 500 ns ve son 500 ns olarak ikiye bölünerek, ICL3 hareketiyle beraber reseptörün diğer bölgelerinde meydana gelen konformasyonel değişimler ile (hidrojen bağ sayısı, helikslerin birbirlerine göre hareketi gibi) karşılaştırılmıştır.

Toplam altı adet olan harmonik kısıtlamalı simülasyonların her biri 500 ns olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Tablo 1). Ligant bağlanma kavitesinde bulunan kritik rezidüler arasına harmonik uzaklık kısıtlamaları uygulanmıştır. Bu uzaklık değerleri deneysel yöntemlerle ölçülmüş reseptörün aktif haldeyken bilinen değerleridir (Elling vd., 1999; Liapakis vd., 2000; Gouldson vd., 1995; Wieland vd., 1996).

Tablo 1. Kısıtlamalı ve kısıtlamasız MD simülasyonların tanımı ve başlangıç yapıları.

\*

Koşu #	Run Name	Süre (ns)	Kısıtlama (Var/Yok)	Başlangıç Yapısı
1	MD1 $\mu$ s*	1000	Yok	inaktif kristal yapı, 2RH1
2	MD1 $\mu$ s_cont1	500	Yok	Koşu #1'in son görüntüsü
3	MD1 $\mu$ s_cont2	500	Yok	Koşu #1'in son görüntüsü
4	rstr1	500	Var	Koşu #1'in ilk görüntüsü
5	rstr2	500	Var	Koşu #1'in ilk görüntüsü
6	rstr3	500	Var	470'inci ns'deki görüntü (Koşu #1)
7	rstr4	500	Var	470'inci ns'deki görüntü (Koşu #1)
8	MD500ns	500	Yok	Koşu #7'nin son görüntüsü
9	rstr5	500	Var	Koşu #1'in son görüntüsü

Bu simülasyon Özcan ve arkadaşları (Özcan vd., 2013) tarafından gerçekleştirilmiştir. 2-9 arası simülasyonlar birincideki sistem kullanılarak yapılmıştır.

Yedi farklı rezidü çifti arasında seçilen uzaklıklar reseptörün simülasyondaki başlangıç haline uygulanacaktır (Tablo 2, Şekil 2). Kısıtlamalar için uygulanacak kuvvet sabitleri, 50, 60 ve 65 gibi farklı değerler için denenecek, dereceli olarak arttırılacak ve sistemin bu sabitler altında nasıl davranacağı gözlemlenecektir.

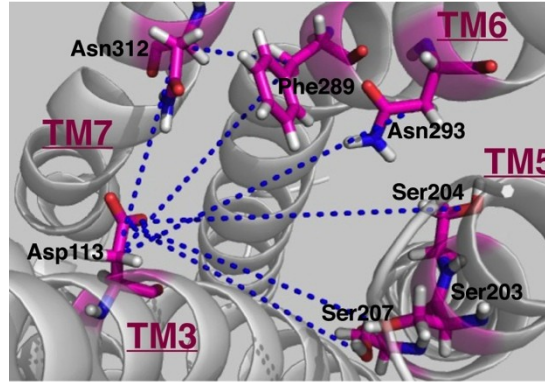
Table 2. Kısıtlamalı MD simülasyonlarındaki bağ kısıtlamaları ve deneysel ölçümlerdeki uzaklık değerleri



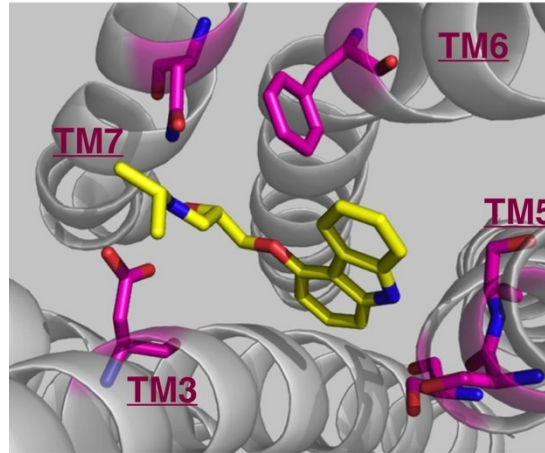
Residue çifti	Deney. <sup>2</sup> (Å)	Kristal yapılarıdaki uzaklıklar (Å)		Bağ Kısıtlamaları (Å)				
		İnaktif (PDB id: 2RH1)	Aktif (PDB id: 3SN6)	<i>rstr1</i>	<i>rstr2</i>	<i>rstr3</i>	<i>rstr4</i>	<i>rstr5</i>
Ser203O <sup>γ1</sup> -Asp113C <sup>γ1</sup>	8.0-10.0	11.2	10.3	17	8	17	17	8
Ser204O <sup>γ</sup> -Asp113C <sup>γ</sup>	8.0-10.0	14.2	12.4	14	10	14	14	10
Ser207O <sup>γ</sup> -Asp113C <sup>γ</sup>	8.0-10.0	11.5	10.4	11.7	8	11.7	11.7	8
Ser207C <sup>α</sup> -Asp113C <sup>α</sup>	N/A	12.2	12.0	-	-	-	17	-
Asn293C <sup>β1</sup> -Asp113C <sup>β</sup>	8.0-10.0	13.6	14.0	14	15	14	14	8
Phe289C <sup>β</sup> -Asp113C <sup>β</sup>	8.0-8.4	11.7	12.3	13	12	13	13	8
Asn312 C <sup>β</sup> -Asp113C <sup>β</sup>	8.0-8.4	9.1	8.6	10	9	10	10	8
Phe289C <sup>β</sup> -Asn312C <sup>β</sup>	8.0-8.4	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	8

<sup>1</sup> Yan zincirlerdeki  $\gamma$  Oxygen,  $\beta$  ve  $\gamma$  Carbon atomları

<sup>2</sup> Daha önceki deneysel çalışmalarda ölçülmüş uzaklık değerleri.



a



b

Şekil 2. Ligant bağlanma bölgesinin hücre dışından görüntüsü, (a) Kritik rezidüer ve 7 adet kısıtlanan uzaklıklar, (b) kristal yapısı bilinen inaktif haldeki (PDB kodu: 2RH1) carazolol'un (a)'dakine benzer bir açıdan görüntüsü

### 3.2 Kümeleme Uygulaması

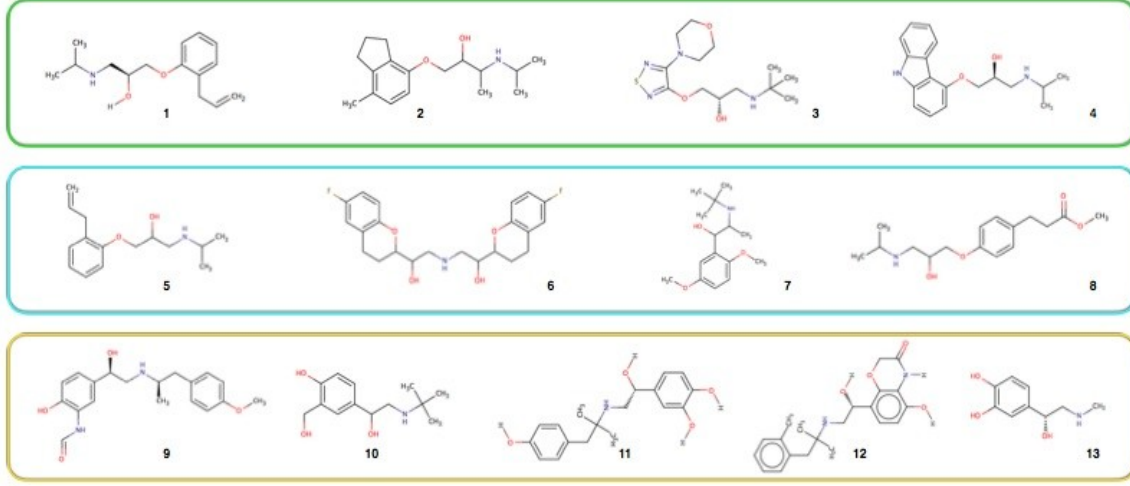
Moleküler Dinamik (MD) simülasyon çalışmalarının sonucunda elde edilen konformasyonlar, doking uygulaması öncesi, ligant bağlanma bölgesindeki yapısal farklılıklara göre gruplandırılmış ve her gruptan seçilen temsili yapılar doking uygulaması için hazırlanmıştır. Kümeleme yöntemi *k-means* clustering (Feig vd., 2004) olarak belirlenmiştir ve reseptörün ligant bağlanma bölgesini oluşturan rezidülerin atomistik koordinatlarının toplam Root Mean Square Deviation (RMSD) değerine göre yapılmıştır. *k-means* kümeleme, veri madenciliğinde kullanılan popüler bir küme analiz yöntemidir. Bu işlemde,  $n$  adet konformasyon, çok daha az sayıda olan  $k$  adet kümeye paylaştırılmaktadır. İteratif bir yöntemdir ve her adımda o kümeye ait yeni bir ortalama (mean) değer hesabı yapılmaktadır. Bu doğrultuda birtakım uzaklık ölçümlerinden faydalanılır. Bu çalışmada, kümeleri birbirinden ayırt edici özellik (uzaklık) bağlanma bölgesindeki rezidülerin RMSD değeri olarak belirlenmiştir. RMSD değeri, seçilecek bir eşik değerinin altında olan MD konformasyonları aynı kümede toplanmıştır. Ardından, her kümenin ortalama bir yapısı (centroid) hesaplanmış ve her konformasyon, kendine en yakın olan centroid'in kümesine yerleştirilmiştir. Centroid hesaplama/yeniden yerleştirme döngüsü sonuçlar değişmeyene kadar devam etmiştir. Bunun sonucunda, her küme içinde centroid'e en yakın olan konformasyon (RMSD değeri en düşük olan) seçilerek doking uygulamalarında kullanılmıştır. Eşik RMSD değeri 1.5 Å değerinde tutularak toplam 13 adet farklı konformasyon belirlenmiştir.

### 3.3 Doking Uygulamaları

Doking hesapları için AutoDock (Morris vd., 2009), GOLD (Jones vd., 1997) ve Glide (Friesner vd., 2004) yazılım programlarından ve AutoDock pozlarını yeniden değerlendirmek üzere DSX (Gohlke vd., 2000) skoring fonksiyonundan faydalanılmıştır. Moleküler Dinamik simülasyonlarından elde edilen konformasyon topluluğu 4 ters agonist, 5 antagonist ve 5 agonist moleküle dok edilmiştir (Şekil 1).

AutoDock yazılım programı, konformasyonel tarama için bilgisayar ve yapay zeka alanlarında oldukça yaygın olarak kullanılan genetik bir algoritma kullanmaktadır (Lamarckian genetik algoritması). Bu algoritma doğal evrim sürecini taklit ederek düşük enerjili konformasyonlara ulaşmaya çalışır. Başlangıçta liganttaki döndürülebilir bağlar için rastgele seçilen torsiyon (dönme) açıları ile yine rastgele seçilen ligantın konumu sonucunda, 200 değişik ligant konformasyonundan oluşan bir popülasyon oluşturulmuştur. İstatistiksel açıdan güvenilir sonuçlar elde edebilmek için, her bir doking deneyinde birbirinden bağımsız 100 doking oluşturulmuştur. Skoring işlemi AutoDock programında AMBER kuvvet alanını (Cornell vd., 1995) temel alan yarı empirik bir fonksiyon ile yapılmaktadır. Sonuçların güvenilirliğini arttırmak amacıyla, AutoDock'tan çıkan 100 farklı

pozun her biri DSX skoring fonksiyonu kullanılarak tekrar değerlendirilmiştir. Yeniden skoring (rescoring), son derece yaygın bir ölçüm yöntemi olarak kullanılmaktadır.



Şekil 3. Kristal ve MD konformasyonlara dok edilecek ligant moleküller. 4 ters agonist (1) JSZ, (2) ICI 118,55, (3) timolol and (4) carazolol, 4 antagonist (5) alprenolol, (6) nebivolol, (7) butaxamine and (8) esmolol ve 5 agonist (9) formoterol, (10) salbutamol, (11) hydroxybenzylisoproterenol, (12) BI-167107 and (13) epinephrine.

GOLD doking programı konformasyonel tarama için AutoDock gibi stokastik genetik bir algoritma kullanmaktadır. Ayrıca ChemPLP, ChemScore, GoldScore ve ASP olmak üzere dört farklı skoring fonksiyonu seçenekleri sunmaktadır. Diğer taraftan, Glide doking programı sistematik bir tarama algoritması kullanmaktadır ve en iyi sonuca ulaşırken farklı türde kriterleri hiyerarşik adımlarla birbiri arkasına uygulamaktadır. Kullandığı skorumlama fonksiyonu, ChemScore temel alınarak geliştirilmiş olup, sterik ve elektrostatik uyumsuzlukları da dikkate alacak şekilde tasarlanmış GlideScore isminde özel bir fonksiyondur.

Tüm doking sonuçlarının en fazla kesiştiği ortak bir sonuca varılarak her bir ligant molekülün en iyi bağlandığı reseptör konformasyonu belirlenerek, ligant-reseptör arası etkileşimler ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

### 3.4 Sanal Tarama ve Analiz

Docking uygulamalarının sonucunda seçiciliği en yüksek olarak belirlenen konformasyonlar, GLIDA (Okuno vd., 2008) ve ChEMBL veritabanından seçilen ve yapısal olarak birbirlerinden oldukça farklı 50 agonist/parsiyel agonist ve 50 ters agonist/antagonistten oluşacak bir veritabanının taratılması için kullanılmıştır. Seçilecek moleküllerin kimyasal yapılarında olabildiğince farklılıkların olması göz önünde bulundurulması gereken bir konudur. Bunun için yapısal yönden gruplandırıldığında gruplar arası benzerliğin %30'un altında kalacak şekilde olması ve aynı gruptan iki molekülün kullanılacak veri tabanında olmaması büyük önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, kristal yapısı bilinen aktif (PDB id: 3SN6) ve inaktif haldeki (PDB id: 2RH1) reseptör yapıları da tarama çalışmalarına dahil edilerek bir karşılaştırma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, agonist molekülleri, antagonist'lerden en iyi şekilde ayırt edebilen konformasyonlar ROC eğrileri aracılığıyla ortaya çıkartılmıştır.

### 3.5 Allosterik Sinyal Aktarım Yollarının Belirlenmesi

İTÜ'den Yard. Doç. Özge Kürkçüoğlu Levitas'ın araştırma grubunda geliştirilmiş olan C# dilindeki kullanıcı arayüzüne sahip yazılım kullanılarak en kısa yol izleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar, Şekil 14'te gösterildiği gibi üç adımda gerçekleştirilmektedir:

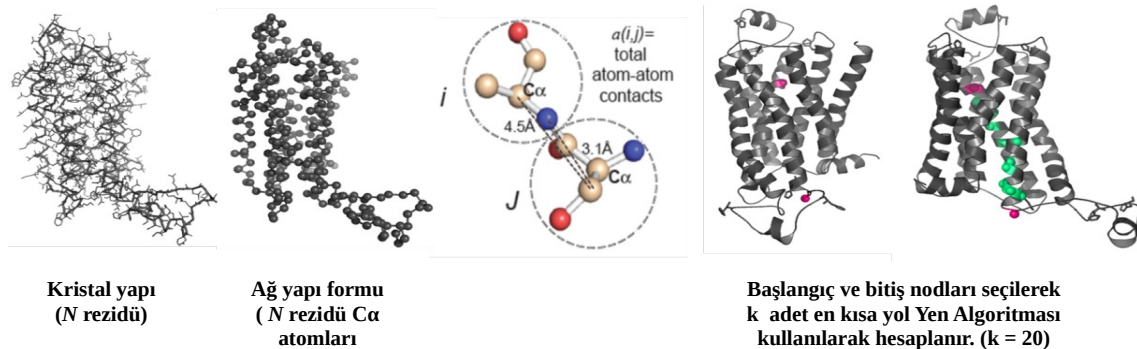
1. Modelleme: Kaba-ölçekli modelde amino asit rezidüleri alfa-karbon atomları ile temsil edilmektedir ve oluşacak ağ yapının nod'larıdır (Kurkcuoglu vd., 2009). Ağ yapıda birbiri ile komşu olan rezidü çiftleri belirlenirken, rezidü atomlarının arasındaki mesafeye bakılır. Eğer bu mesafe 4.5 Å'dan daha yakın ise, rezidülerin birbirine komşu olduğu kabul edilir. 4.5 Å değeri atomlar arası etkileşim kuvvetlerinin etkisinin belirgin oranda azaldığı sınır değere göre belirlenmiştir (Chennubhotla vd., 2007; Heringa ve Argos, 1991) Bu şekilde protein yapısı için birbiriyle farklı derecelerde temas eden düğümlerden oluşan bir ağ yapısı oluşturulur.

Atomları birbiriyle etkileşen iki rezidü  $i$  ve  $j$  olmak üzere,  $i$ 'nin toplam atom sayısı  $N_i$  ve  $j$ 'nin toplam atom sayısı  $N_j$  ile gösterilir. Bu iki rezidünün atomları arasındaki etkileşen atom çiftlerinin toplam sayısı,  $N_{ij}$  olarak ifade edilir. Daha fazla sayıda atomu etkileşen rezidü çiftlerinin sinyali iletmede beraber çalışma olasılığı daha fazla olacağından,  $i$  ve  $j$  rezidülerinin temas derecesi  $a(i,j)$  ile temsil edilerek düğümler arası mesafe hesabı için kullanılır. Rezidü çiftlerinin (ağ yapıdaki düğümler) arasındaki uzaklık veya skor, temas derecesi  $a(i,j)$  ile ters orantılı olarak aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır:

$$\text{Skor} = \frac{1}{a_{i,j}} = \frac{\sqrt{N_i N_j}}{N_{i,j}} \quad (1)$$

Düğümler arası uzaklık bu formülle hesaplanarak uzaklıklar matrisi oluşturulduktan sonra belirlenen başlangıç ve bitiş noktaları arasındaki yolizlerinin toplam uzunluğu, yolizinin geçtiği tüm düğümlerin arasındaki uzaklık (skor) toplanarak hesaplanır. Bu durumda her yol izi için hesaplanacak toplam skorlar içindeki en düşük skor, en kısa yola, dolayısıyla en olası yola işaret etmektedir.

2. En kısa yolizinin hesaplanması: Dijkstra algoritması ile (Dijkstra, 1959) birbirinden uzak olan iki konum/rezidü arasındaki en kısa yol (shortest path) hesaplanır. Bu yöntem,  $n$  tane düğümü (rezidü) ve  $m$  tane değişik uzunlukta (skor) kenarı olan bir grafik ağ yapı için, tek bir kaynaktan tek bir hedefe giden yollar arasından en kısa yolu hesaplar. Bu yaklaşım proteinlerde alosterik yolizlerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.
3. Alternatif yolizlerinin hesaplanması: Sonraki aşamada ise  $k$  kısa yol algoritması (Yen, 1971) ile istenilen sayıda alternatif kısa yollar hesaplanır. Bu yöntem bir ağ yapı üzerindeki iki belirli düğüm arasında  $k$  adet en kısa yolu hesaplamak için  $O(n)$  defa Dijkstra algoritmasını uygular. Bu teknik çok yakın bir çalışmada gen ağ yapılarına uygulanmış ve hücre içi en kısa haberleşme yolları hakkında önemli bulgular elde edilmiştir (Shih et al., 2012). Bu algoritma protein yapısı içindeki alternatif kısa haberleşme yollarını öngörmek açısından uygun görülmektedir.
4. Aminoasitlerin frekanslarının hesaplanması: Elde edilen alternatif yolizlerinde yer alan her rezidünün kaç adet yolizinde yer aldığı belirlenerek, en çok görülen rezidüler belirlenmektedir. Ardından literatürdeki diğer deneysel veya hesaplamalı çalışmalarda sözü geçen fonksiyonel rezidüler ile karşılaştırılması yapılmaktadır. Aminoasitlerin frekanslarına göre renklendirilmesi ile olası ana sinyalleşme yolları ve alternatif yolların görselleştirilmesi sağlanmaktadır.



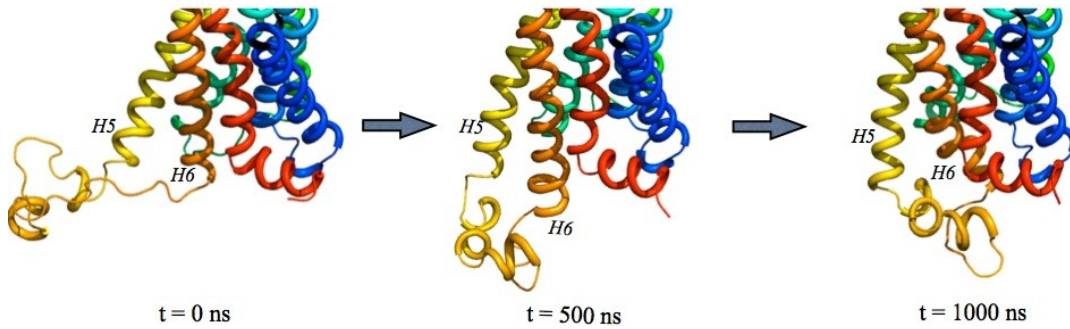
Şekil 4. Kısa yol izi hesabı için kullanılan model ve özeti (grafik görüntüleme için Pymol programı ile kullanılmıştır, v 1.7.4 by Schrödinger, LLC)

## 4. BULGULAR

### 4.1 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları ve Analiz (İş Paketleri 1 ve 2)

#### 4.1.1 Kısıtlanmasız MD Simülasyonları

Bu projeye zemin hazırlayan Tablo 1'de  $MD1\mu s$  olarak gösterilen bir önceki 1  $\mu s$ 'lik Moleküler Dinamik simülasyon çalışmasında (Ozcan vd., 2013), son 500 ns'de gözlemlenen ICL3 bölgesinin reseptörün merkezine doğru yaklaşarak kendi içine kapanması yeni bir inaktif halin ilk defa gözlemlenmesine yol açmıştır [Şekil 2]. ICL3 bölgesinde bu konformasyonel değişimin gerçekleştiği anlarda, reseptörün ligant bağlanma bölgesinde ciddi bir genişleme görülmüştür. Bu genişleme bağlanma kavitesindeki kritik rezidüler Ser207-Asp113 arasındaki uzaklığın profilinden de anlaşılmaktadır. Bilinen inaktif kristal yapılarda bu değer 11-12 Å civarında değişirken, genişlemeden sonra 17-18 Å'a kadar çıkmıştır.

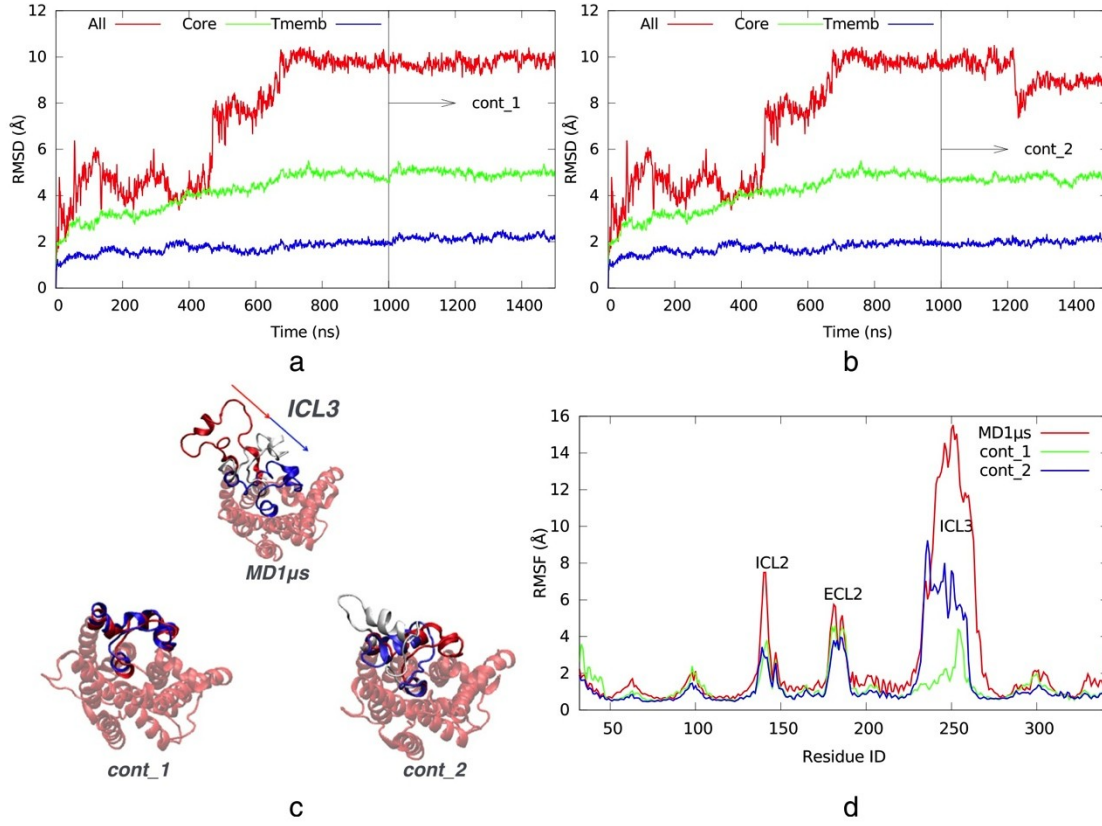


Şekil 5. ICL3 bölgesinin orijinal  $MD1\mu s$  simülasyon sırasında farklı zamanlardaki görüntüsü

Projede yapılan ilk çalışmalardan biri, bu yeni inaktif hali ve ligant bağlanma bölgesi ile ICL3'ü de içine alan G protein bağlanma bölgesi arasındaki alosterik etkileşimi biraz daha yakından incelemek amacıyla, iki bağımsız 500 ns'lik simülasyonlar olmuştur. Bir önceki 1  $\mu s$ 'lik simülasyonun ( $MD1\mu s$ ) son anındaki konum ve hızlar, ilkinde başlangıç konum ve hızlar olarak alınmış, diğer bir deyişle,  $MD1\mu s$ 'de kaldığı yerden 500 ns daha devam ettirilmiştir. İkinci simülasyonda ise, birinciye benzer şekilde başlangıç konumu,  $MD1\mu s$ 'de son andaki konumdur, fakat farklı başlangıç hızları verilmiştir. Bu sayede, ikinci simülasyonda daha farklı konformasyonların ortaya çıkartılması mümkün olabilecektir.

İlk devam simülasyonunda ( $MD1\mu s\_ctd1$ , Tablo 1), ICL3 son kaldığı kapalı konumunu korumuş ve oldukça hareketsiz bir halde 500 ns boyunca kalmıştır (Şekil 5a). G proteinin

bölgesinin ICL3 tarafından 500 ns boyunca kesintisiz bir şekilde bloke edilmiş olması, reseptörün aktivitesinin tam olarak engellediğini göstermektedir.



Şekil 6. RMSD profilleri (a) *MD1μS\_ctd1*, (b) *MD1μS\_ctd2*, orijinal *MD1μS* ile birlikte gösterilmiştir, (c) ICL3 kapanmasının simülasyon başında (kırmızı), ortasında (beyaz) ve sonunda (mavi) hücre içinden görüntüleri.

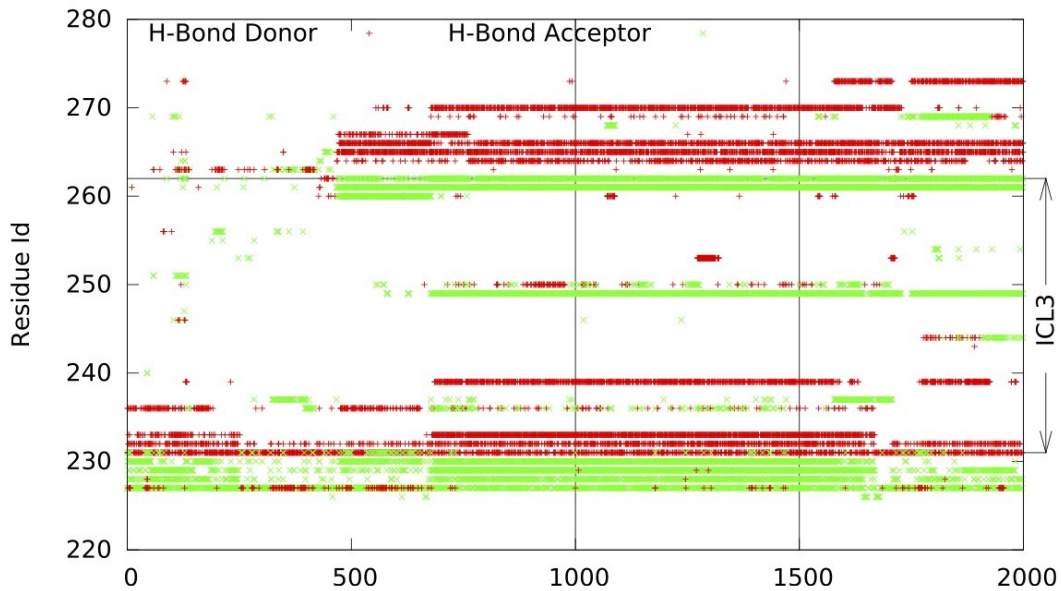
Tüm RMSD hesapları, her bir MD görüntüsünün t=0 anındaki ilk görüntüye en az hareketli olan transmembran bölgesine göre hizalandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. *All*, *Core* ve *Tmemb* şeklinde işaretlenmiş RMSD profilleri, sırasıyla, tüm reseptörü, ICL3 dışında kalan bölgeyi ve tüm loop bölgeleri dışarda kalacak şekilde 7 sarmaldan oluşan transmembran bölgesini temsil etmektedir.

İkinci devam simülasyonunda (*MD1μS\_ctd2*) ise, 200'üncü ns civarında, RMSD profilinde yaklaşık 5 Å gibi bir değişim yaşanmıştır. Bu değişim Şekil 5c'de görüldüğü gib ICL3'teki hafif bir açılma olarak kendini göstermektedir. Ancak bu açılma çok kısa sürmüştür (~20 ns) ve ICL3 hızlı bir şekilde başlangıç konumuna yakın ama alternatif bir bölgeye doğru kapanmış ve simülasyonun sonuna kadar da burada kalmıştır. Bu değişiklik, farklı bir başlangıç hızının kullanılmasının bir sonucu olarak düşünülebilir. Ancak, her iki simülasyon da ICL3'ün son derece kararlı ve az dalgalanmalarla konumunu koruduğu görülmüştür. Tüm

bunlar olurken, reseptörün ligant bağlanma bölgesindeki genişleme de benzer şekilde korunmuştur.

Bir diğer önemli bulgu da, her iki devam simülasyonunda da ICL3'teki hareketliliğin orijinal simülasyona göre çok daha düşük olduğudur. Bununla beraber, reseptördeki önemli diğer iki loop bölgesindeki (hücre dışına bakan ECL2 ve hücre içine bakan ICL2) hareketlilikte de benzer düşüşler olmuştur. Reseptörün transmembran bölgeleri bile az daha olsa bu durumdan etkilenmiş ve hareketliliklerinde bir azalma meydana gelmiştir.

ICL3'teki bu kararlılığın sebepleri biraz daha yakından incelenmek üzere, detaylı bir hidrojen bağ analizi yapılmıştır. Şekil 6'da gösterildiği gibi simülasyon boyunca reseptörde hidrojen bağı yapan tüm rezidüler tespit edilmiştir. En ciddi konformasyonel değişim ICL3 üzerinde gerçekleştiği için, 220-280 rezidü aralığına bakılmıştır. ICL3 bu aralıkta 230-262 rezidü aralığında yer almaktadır. ICL3'ün orijinal MD simülasyonda kapanmaya başladığı 600-700 ns aralığında, 8 adet yeni hidrojen bağı ICL3 ve reseptörün TM5 ve TM6 alfa sarmallarına denk gelen bölgeleri arasında oluşmuştur. İlk devam simülasyonunda (*MD1 $\mu$ s\_ctd1*), bu hidrojen bağlarının tamamı korunmuştur. İkincisinde ise (*MD1 $\mu$ s\_ctd2*), bağların hemen hemen yarısı kaybolmuş, zira bu tam da ICL3'ün hafif bir açılma gösterdiği ana denk gelmektedir. ICL3 yeni bir alternatif pozisyona geçtiğinde ise, hidrojen bağlarının çoğu yeniden kurulmuştur.



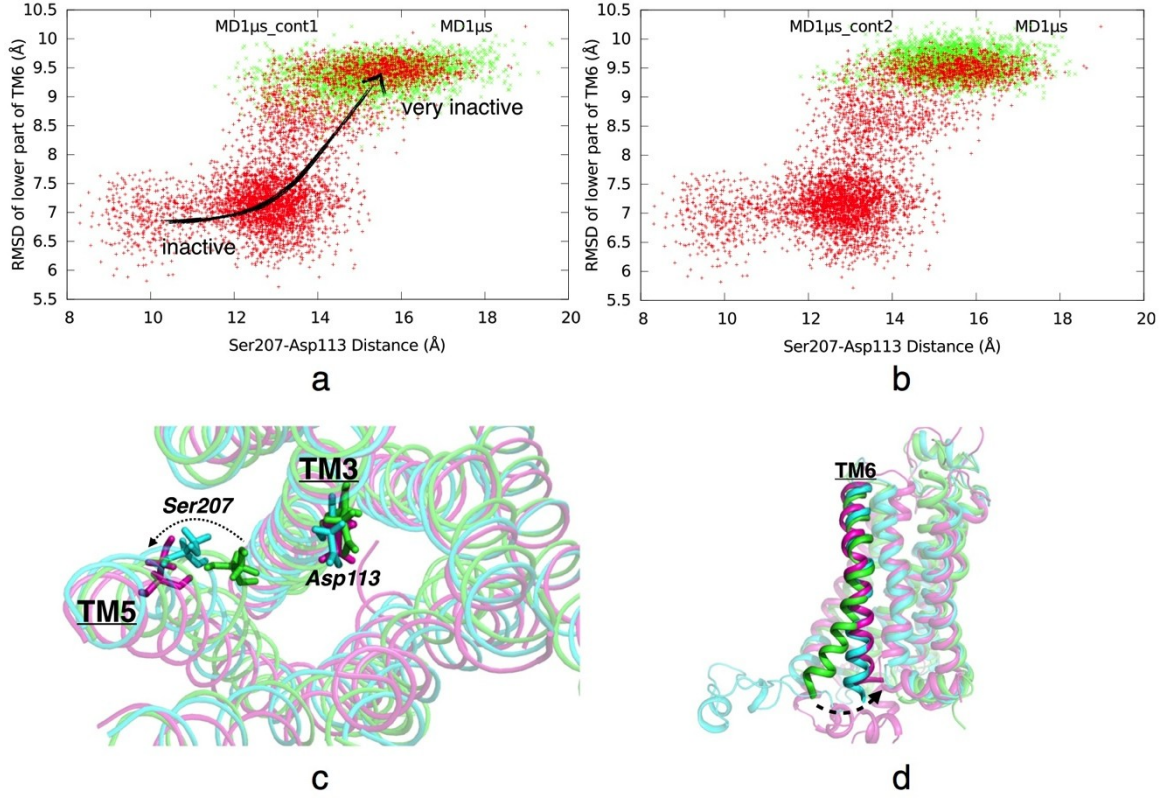
Şekil 7. Hidrojen bağ profilleri. Her iki devam simülasyonları (*MD1 $\mu$ s\_ctd1* ve *MD1 $\mu$ s\_ctd2*), sırasıyla [1000-1500] ve [1500-2000] zaman aralığında gösterilmiştir. Orijinal *MD1 $\mu$ s* simülasyon ise [0-1000] aralığındadır. Hidrojen bağı oluşturan gruplar, alıcı ya da verici olarak, sırasıyla yeşil ve kırmızı noktalarla ayrt edilmiştir.



Simülasyon çalışmalarımızda gözlemlenen en dikkat çekici bulgu, ICL3'ün hareketiyle altıncı sarmal TM6'nın hücre içine bakan parçasının hareketi arasında ciddi bir eşleşme olduğudur. ICL3 kapandığı anlarda, TM6'nın bu parçası reseptörün merkezine doğru bir hat boyunca yaklaşık 7.5 Å hareket etmiştir. Bu kımıldanma, TM6'nın deneysel ölçümlerle (Glu268'in alfa karbon atomu üzerinden [1]) aktivasyon sırasında gözlemlenen lipid tabakaya doğru olan 14 Å'luk hareketin tam tersi yöndedir. TM6, her iki devam simülasyonunda da, kazandığı bu yeni konumu korumuştur. Diğer taraftan, ICL3'ün kapanmasıyla meydana gelen diğer bir durum, TM5'in ligant bağlanma bölgesine denk düşen ve hücre dışına bakan kısmında lipid tabakaya doğru oluşan bir bükülme olmuştur. Bu değişim bağlanma kavitesinin genişlemesine yol açmış ve bu konformasyon her iki devam simülasyonunda korunarak kalmıştır. Ancak, TM6'nın aksine, TM5'in hücre içine bakan kısmında çok ciddi bir değişim meydana gelmemiştir.

Ligant bağlanma bölgesindeki kritik rezidülerden ikisi TM3 üzerindeki Asp113 ve TM5 üzerindeki Ser207'dir (Şekil 2a) ve hem agonist, hem de antagonist moleküller ile hidrojen bağı kurmakta ya da yakın mesafeli etkileşimler içine girmektedirler. Bağlanma kavitesinin her iki ucunda yer alan bu rezidüden Ser207 bağlanan bir ligant molekülün aromatik grubuna yakın durmakta, Asp113 ise aynı ligant molekülün polar ucuyla birden fazla hidrojen bağı yapmaktadır (Şekil 2b). Dolayısıyla bu iki rezidü arasındaki mesafe ligant molekülün bağlanma kapasitesini belirlemektedir. Deneysel ölçümler, Ser207'e ait yan zincir atomu O<sub>γ</sub> ile Asp113'e ait C<sub>γ</sub> atomu arasındaki mesafenin aktif halde [8 Å - 10 Å] arası, inaktif hale geçildiğinde ise 11 Å – 12 Å civarına yükseldiğini göstermiştir [24, 25]. Bu da, mesafenin her iki devam simülasyonu boyunca izlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Orijinal MD1<sub>μs</sub> simülasyonunda, bu mesafe değeri ile TM6'nın hücre içine bakan alt kısmı arasında yakın bir örtüşme olduğu gösterilmiştir (Şekil 7a); ICL3 kapanmaya doğru hareketine başladığı anlarda TM6'nın alt kısmı reseptörün merkezine doğru uzanmış, Ser207-O<sub>γ</sub> ve Asp113-C<sub>γ</sub> arasındaki mesafe ise, daha çok TM5'in lipid tabakaya doğru eğilmesinin bir sonucu olarak 17-18 Å seviyelerine yükselmiştir (Şekil 7c). Her iki devam simülasyonunda bu mesafe 14-18 Å aralığında değişim göstermiş, inaktif kristal yapıda görülen 11-12 Å değerlerinin çok üstünde kalmış, TM6 ise kapalı konumunu korumuştur.



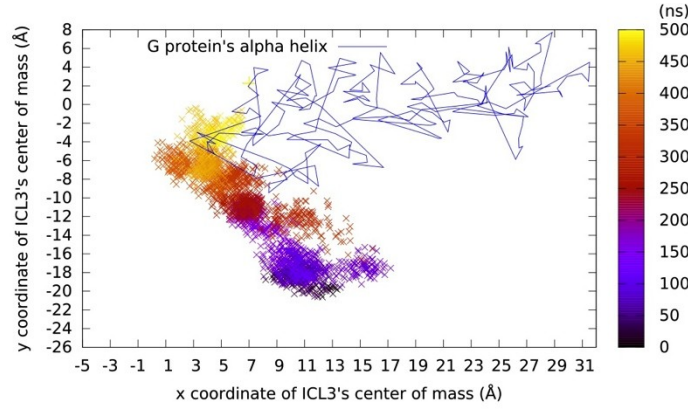
Şekil 8. Reseptörün hücre içi ve dışına bakan bölgelerindeki eş zamanlı konformasyonel değişimler. a) ve b) TM6'nın alt kısmının RMSD değerine karşı S207O $\gamma$ -D113C $\gamma$  arası mesafenin değişimi. Orijinal simülasyon kırmızı noktalarla, devam simülasyonları yeşil noktalarla gösterilmiştir. c) Hücre dışından bağlanma bölgesinin görüntüsü, d) TM6'nın aktif (yeşil), simülasyonun başındaki (mavi) ve sonundaki görüntüleri (macenta)

#### 4.1.2 Kısıtlı MD Simülasyonları

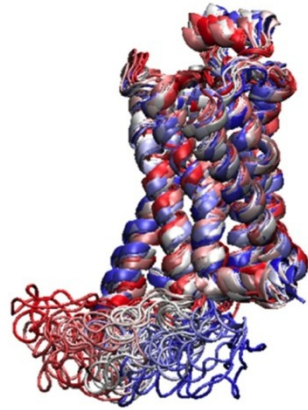
Reseptörün hücre içi ve dışına bakan bölgeleri arasındaki alosterik etkileşmenin daha iyi anlaşılması için, Tablo 2 ve Şekil 2'de de gösterildiği gibi ligant bağlanma bölgesinde bulunan 7 kritik rezidüye mesafe kısıtlaması getirilmiştir. Bu kısıtlamalar, seçilen iki rezidü için belirlenen mesafenin simülasyon boyunca korunması için kuvvet uygulanmasıyla gerçekleşmektedir. Bu kuvvet bir harmonik fonksiyonla belirtilmiştir ve mesafenin istenilen değer etrafında küçük dalgalanmalar yapmasına izin vermektedir.

İlk kısıtlı simülasyonda (*rstr1*, Tablo 1), S203-O $\gamma$  ve D113-C $\gamma$  arasındaki uzaklık aşamalı olarak 16 Å'dan (ilk 200 ns) 17 Å'a (son 300 ns) çıkartılmıştır. Diğer mesafeler bilinen inaktif kristal yapıdakiyle aynı tutulmuştur. Mesafenin 17 Å gibi bir değerde tutulmasının sebebi, daha önce gözlemlenen TM6 ve ICL3 üzerindeki alosterik etkiyi ortaya

çıkartabilmektir. Beklenildiği gibi, ICL3 200 ns gibi çok kısa bir sürede reseptörün merkezine doğru hareket ederek G protein bağlanma bölgesinin üzerine kapanmıştır. Bu değişim orijinal simülasyonda gözlemlenen değişimden 400 ns daha erken meydana gelmiştir. ICL3'teki kapanmayı daha iyi görselleştirebilmek amacıyla, ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y koordinatları simülasyon boyunca kaydedilmiştir (ICL3'ün hücre yüzeyine dik -z koordinatı boyunca ciddi bir hareketi yoktur). Şekil 8a'da gösterildiği gibi, farklı renkteki noktalar farklı zaman aralıklarına denk gelmektedir. Ayrıca, G proteinin reseptör ile etkileşime giren alfa sarmal kısmının görüntüsü de sadece -x ve -y koordinatları alınarak çizgi şeklinde şekle eklenerek, ICL3'ün G protein bağlanma bölgesine göre nerede konumlandığı hakkında daha iyi fikir vermesi sağlanmıştır. Şekil 8b ve 8c'de ise simülasyon boyunca eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (her bir görüntü arası 25 ns) yandan ve hücre dışından olacak şekilde verilmiştir. Kırmızıdan beyaza ve daha sonra maviye dönüşen görüntüler ICL3'teki kapanmayı açıkça göstermektedir.

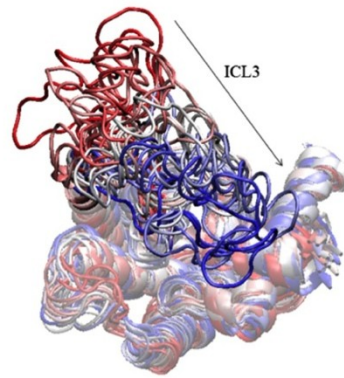


a



ICL3

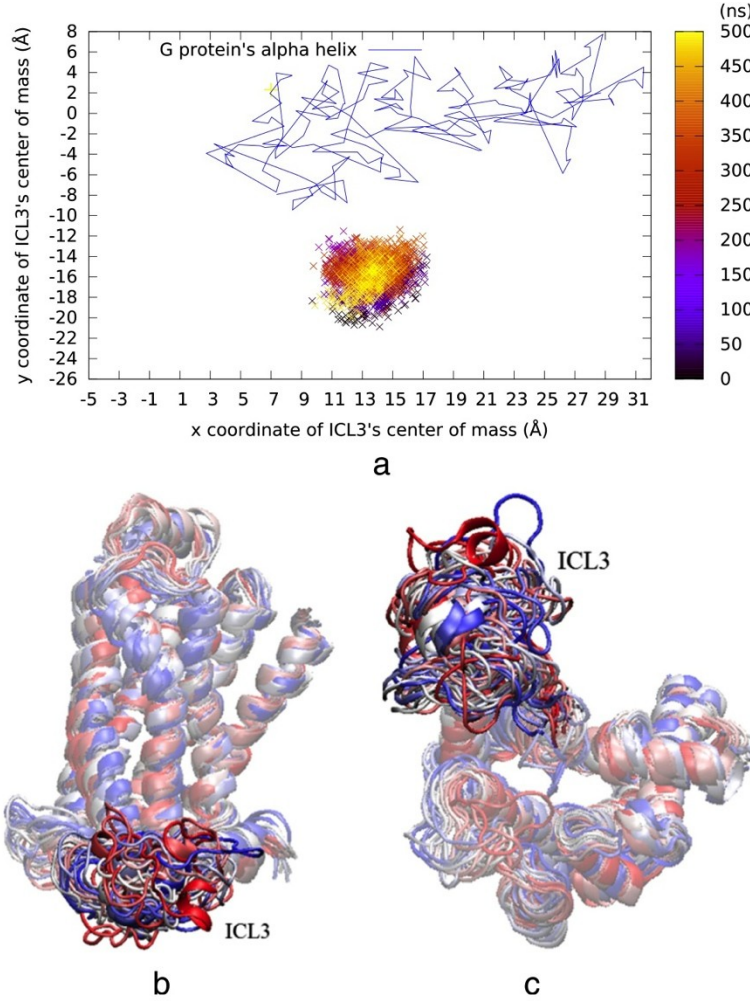
b



c

Şekil 9. 500 ns uzunluğundaki ilk kısıtlamalı MD simülasyonu (*rstr1*) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir. Eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (b) yan cepheden ve (c) hücre içinden.

İkinci kısıtlanmalı MD simülasyonunda (*rstr2*), ilkinde kullanılan başlangıç yapısı kullanılmıştır. Bu sefer, ligant bağlanma bölgesini daraltacak yönde bir uzaklık kısıtlaması getirilmiştir. Bu değerler, Asp113-C $\gamma$  ile TM5 üzerindeki üç ayrı kritik rezidü (S203-O $\gamma$ , S204-O $\gamma$ , S207-O $\gamma$ ) arasında sırasıyla 8 Å, 10 Å ve 8 Å şeklinde tutulmuştur. 500 ns koşturulan bu ikinci kısıtlanmalı simülasyon için de Şekil 8'dekine benzer bir şekilde ICL3'ün ağırlık merkezinin konumu kaydedilmiştir (Şekil 9). ICL3 yine beklenildiği gibi bir kapanma göstermemiş ve ilk anlardaki açık konumunu korumuştur.



Şekil 10. 500 ns uzunluğundaki ikinci kısıtlanmalı MD simülasyonu (*rstr2*) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir. Eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (b) yan cepheden ve (c) hücre içinden

Burada, alosterik etkileşim modeline göre beklediğimiz bir diğer durum, ICL3'ün aktif haldeki gibi ilk konumundan daha da açık bir konuma geçmesi, yani reseptörün merkezinden uzaklaşmasıydı. Ancak, bu türden bir değişimin kendiliğinden olmayacağı, yapılan birçok deneysel ve simülasyon çalışmalarıyla desteklenerek ortaya konulmuştur (Dror vd., 2011;

DeVree vd., 2016; Bhattacharya vd., 2016). Agonist molekülün bağılyken tek başına reseptörün alt kısmında bir açılmaya sebep olamadığı, şayet reseptör bir G protein ile etkileşim içindeyse, ancak o zaman agonist molekülün bağıly bulunmasının reseptörün aktif halini daha kararlı yaptığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, ICL3'ün olduğu yerde kalması, tek beklenen sonuç olmalıdır ve reseptörün üst ve alt kısımları arasında az da olsa bir alosterik etkileşimin varlığına işaret etmektedir.

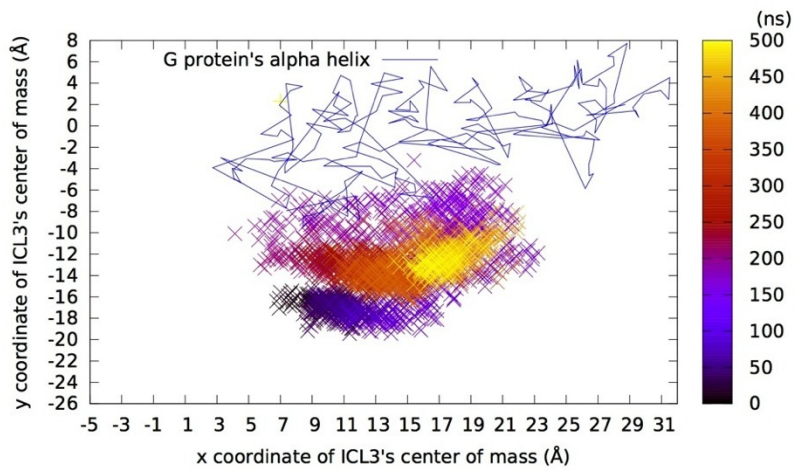
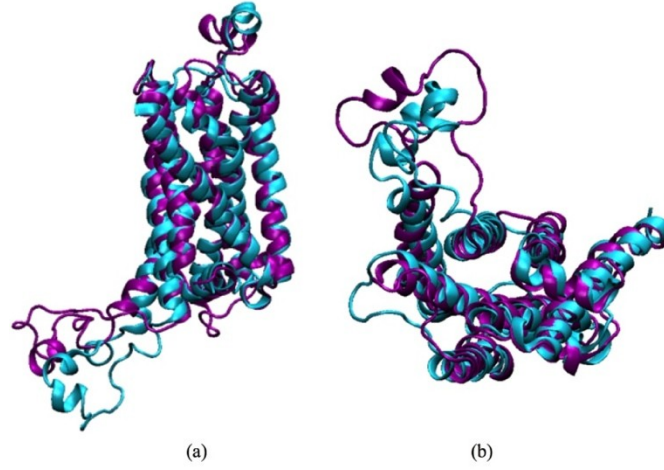
Reseptördeki bu önemli alosterik etkileşimin yapılan birçok simülasyon ve deneysel çalışmalarda, inaktiften aktife doğru geçiş sırasında azaldığı yönünde olmuştur (Bhattacharya ve Vaidehi, 2014; Bhattacharya vd., 2016). Bu azalmanın varlığı, yaptığımız iki simülasyonla daha çarpıcı bir biçimde ortaya konmuştur, zira ilk kısıtlamalı simülasyonda, reseptörün en yüksek derecede inaktif olduğunu düşündüğümüz bir yapıda, ligant bağlanma bölgesine uygulanan bir kısıtlamanın etkisi çok kısa bir sürede ICL3 üzerinde kendisini göstermiştir. Oysa, aktif hali temsil eden bir kısıtlama, ICL3'ün daha da açılması için yeterli etkiyi gösterememiş, ancak yine de alosterik modelin tersi yönünde bir durum oluşturmayacak kadar da etkisiz kalmamıştır.

Reseptörün ICL3 bölgesine bağıly TM5 ve TM6 uçları, reseptör serbest haldeyken (ligant ya da G protein bağıly değilken) inaktif kristal yapısında görülen konumun etrafında küçük salınımlar gösterdiği, aktif haldeki kadar bir açılmanın kendiliğinden olmadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmaların hiç birinde ICL3 dikkate alınmadığı için ICL3'ün durumu hakkında bir bilgi verilmemiştir. Ancak TM5 ve TM6'nın konumundan ICL3'ün bizim modelimizdeki serbest haline yakın bir konumda olduğu tahmin edilebilir. Aktif hale geçiş, hücre içinden reseptörün alt kısmına yaklaşan bir G proteini sayesinde meydana gelmektedir. G protein, TM6'nın hareketiyle açılıp kapanan bağlanma bölgesine yaklaştıkça, o bölgenin açılmasını tetikleyici bir takım konformasyonel değişimlere yol açmaktadır, diğer bir deyişle, reseptörde açık hale doğru bir konformasyon kaymasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda G protein reseptöre bağlanmak için gereken eşik enerjiyi kazanarak, bağlanma tepkimesini gerçekleştirebilmektedir.

ICL3 kapanmasıyla birlikte gözlemlediğimiz bir diğer değişim de TM5'in ligant bağlanma bölgesine denk gelen üst yarısının lipid tabakaya doğru uzanmasıyla oluşan bükülmedir. Bu bükülme sonucunda, TM5 üzerindeki üç kritik serin rezidüsü ile TM3 üzerindeki Asp113 birbirlerinden uzaklaşmış, bu da bağlanma kavitesinin genişlemesine yol açmıştır. TM5'in üst yarısında meydana gelen dışa bükülme alt yarısında da içe doğru bükülmeye yol açmıştır. Bu tıpkı bir buket yapısına benzetilebilir; üst bölüm sıkılınca alt kısım genişliyor, ya da tam

tersi. TM5'in alt yarısının içe dönüşüyle beraber TM6'nın alt yarısı da içe doğru yaklaşmıştır. TM6'daki bu içe doğru olan bükülme, ligant bağlanma bölgesinden itibaren zincirleme bir konformasyonel değişimin bir sonucu olarak görülmelidir ve TM6'nın yanı sıra TM5'i de içine almaktadır. Tüm bu değişimlerin bir sonucu olarak görülen her iki sarmalın alt yarısında görülen içe doğru hareket, ICL3'ün merkeze yönelmesini tetikleyici bir rol oynamaktadır.

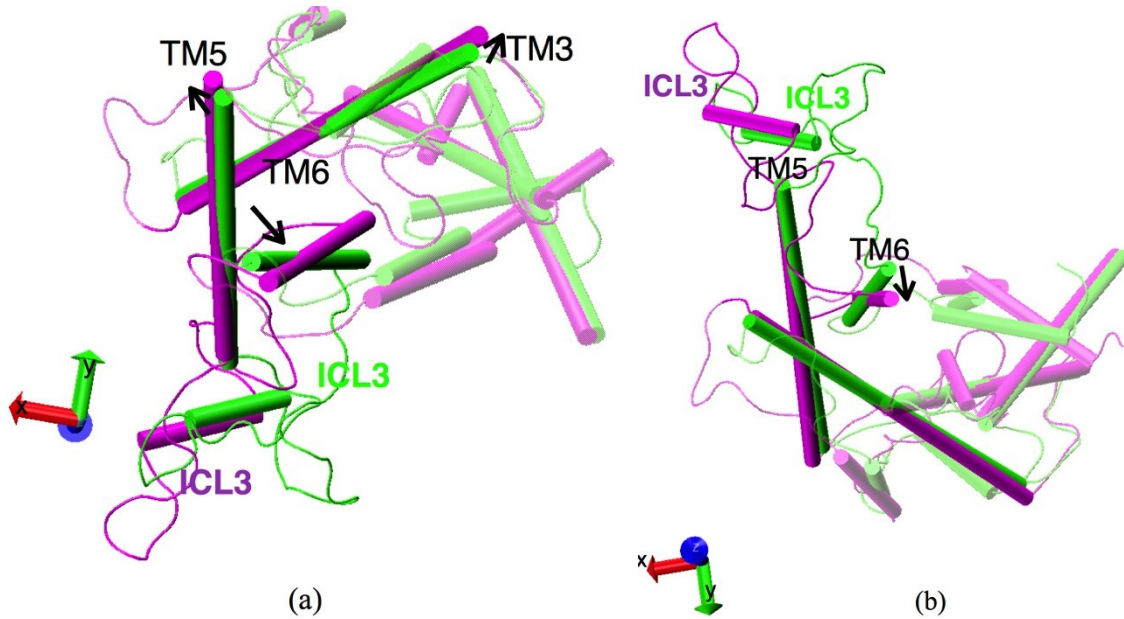
Üçüncü bir kısıtlamalı simülasyonda (*rstr3*), *rstr1* ile aynı kısıtlamalara sahip olmakla beraber farklı bir başlangıç yapısına sahiptir. Bu yapıda ICL3 reseptörün merkezine daha yakın durmaktadır (Şekil 10a,b). Ancak ICL3'teki beklenen kapanma bu simülasyonda gerçekleşmemiştir. Şekil 10c'de gösterildiği gibi, ICL3 çok farklı konformasyonları taradıktan sonra 500 ns sonunda ilk konumuna yakın bir yerde kalmıştır.



(c)

Şekil 11. 500 ns uzunluğundaki üçüncü kısıtlanmalı MD simülasyona (*rstr3*) ait başlangıç yapısının (macenta) ilk kısıtlanmalı (*rstr1*) simülasyona ait başlangıç yapısı ile karşılaştırılması (a) yandan ve (b) hücre içinden görüntüler (c) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi.

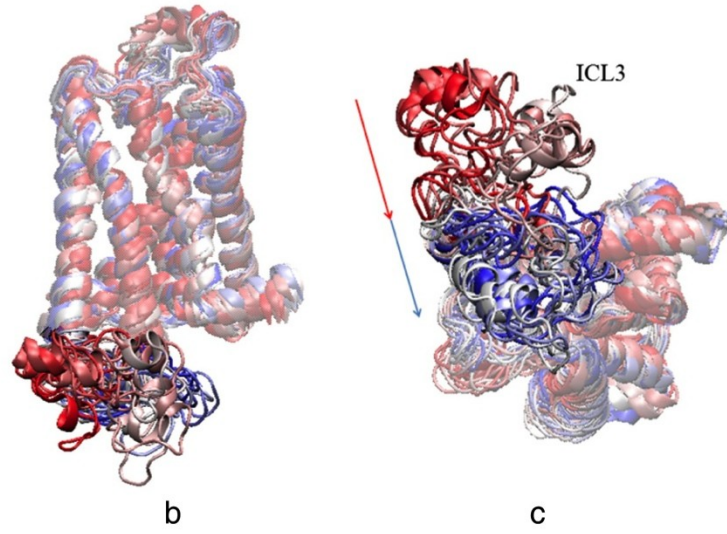
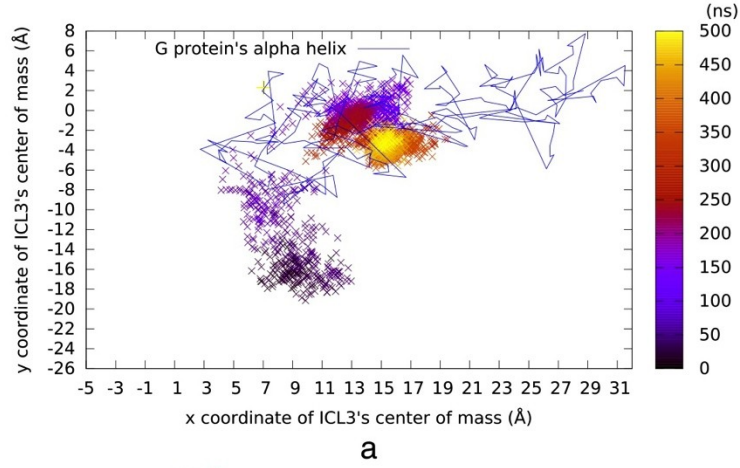
Bunun sebeplerini daha iyi anlayabilmek için, simülasyonun ilk ve son görüntüleri üst üste getirilerek hem hücre içinden (Şekil 11a) hem de hücre dışından bakılmıştır (Şekil 11b). Hücre dışından bakılınca TM5'teki lipid tabakaya doğru açılımın yetersiz olduğu görülmektedir, zira bu uzaklık kısıtlaması sadece TM5'in değil TM3'ün de hareketini mümkün kılmaktadır. Dolayısıyla, TM5'le birlikte TM3'te de lipid tabakaya doğru bir yönelme görülmüştür. Bunun sonucunda, TM5'teki yeteriz konformasyonel değişim alt yarısına yayılacak kadar kuvvetli olamamıştır. Şekil 11b'de görüldüğü gibi TM5'in alt kısmının ilk ve son görüntüleri arasında neredeyse hiç fark olmamıştır. TM6'nın içe doğru yönelmesi ise ICL3'teki kapanmayı tetiklemek için tek başına yetersiz kalmıştır. Dolayısıyla, ICL3'ün kapanması TM5 ve TM6'nın içinde bulunduğu bir bölgede meydana gelen zincirleme konformasyonel değişimlerin bir sonucu olarak görülmektedir.



Şekil 12. Üçüncü kısıtlanmalı simülasyonda (*rstr3*), ilk ve son görüntülerin karşılaştırılması (a) hücre dışından (b) hücre içinden alınan görüntüler. TM5, TM6 ve ICL3 bölgelerine odaklanılmış.

Bir sonraki denememiz, beklenen bükülmenin gerçekleşmediği üçüncü simülasyon kısıtlamalarına ilave bir kısıtlama daha getirmek olmuştur. Tablo 2'de görüldüğü gibi bu yeni

uzaklık kısıtlaması, Ser207 ve Asp113 rezidülerine ait alfa karbonlar (C $\alpha$ ) arasına getirilmiştir. Şimdiye kadarki kısıtlamalar her seferinde yan zincir atomları arasına konulmuştu. Ancak TM5'teki istenilen bükülmenin gerçekleşmesi için daha sabit olan ana zincir üzerindeki atomlar tercih edilmiştir. Gerçekten de istenilen bükülme elde edilmiş, ve bunu takiben TM5 ve TM6'nın alt bölgelerindeki içe yönelme sonucunda ICL3'teki kapanma 100 ns gibi kısa bir sürede gerçekleşmiştir (Şekil 12).

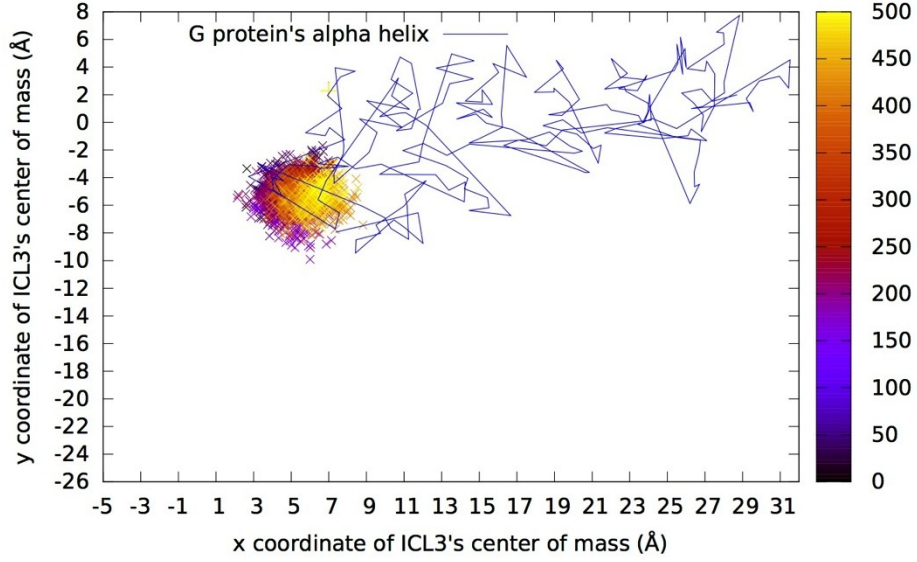


Şekil 13. 500 ns uzunluğundaki dördüncü kısıtlamalı MD simülasyonu (*rstr4*) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir. Eşit aralıklarla alınan toplam 20 görüntü (b) yan cepheden ve (c) hücre içinden.

Bu simülasyondaki bir diğer önemli bulgu da, ICL3 bölgesinin G protein bağlanma bölgesinin tam ortasına denk gelecek şekilde kapanmış olmasıdır. Bu alternatif bağlanma şeklindeki ICL3'ün ne kadar kararlı bir yapıya sahip olduğunu test etmek amacıyla, simülasyonun son konformasyonu tüm kısıtlamalar kaldırılarak 500 ns boyunca koşturulmuştur (Tablo 2'de run

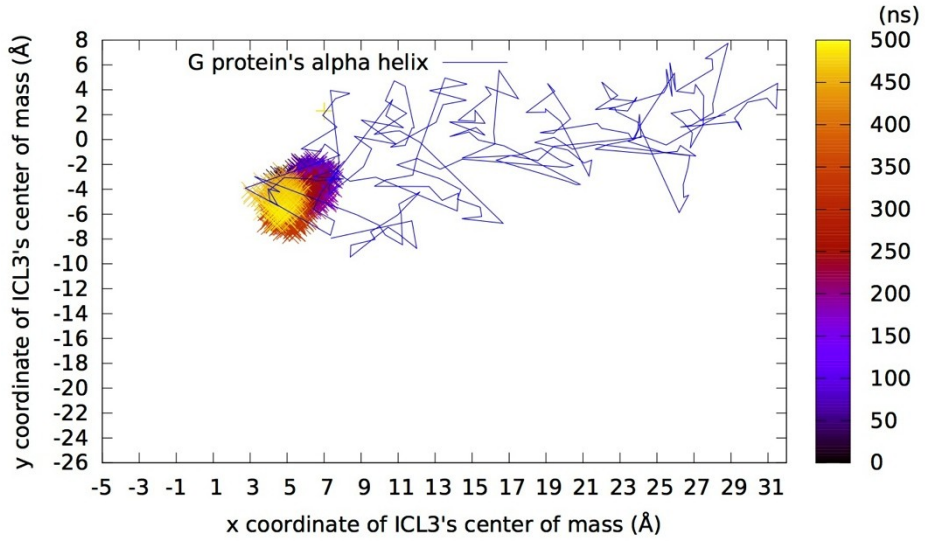


#8). Beklenildiği gibi ICL3 konumunu çok iyi bir biçimde 500 ns boyunca korumuştur (Şekil 13).



Şekil 14. Kısıtlamaların kalktığı 500 ns'lık MD simülasyonunda (*MD500ns*) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir.

Son kısıtlanmalı simülasyonumuzda (*rstr5*), ligant bağlanma bölgesini daraltacak yönde 8 Å civarı kısıtlamalar kullanılarak, kapalı konumdaki ICL3 bölgesini bulunduğu yerden kurtararak serbest hale getirmektir. Bunun için başlangıç yapısı olarak, orijinal *MD1 $\mu$ s* simülasyonun son konformasyonu kullanılmıştır. Ancak hiç bir deneme ICL3'ü açmada başarılı olamamıştır. Şekil 14'te de gösterildiği gibi ICL3 başlangıçta bulunduğu konumda 500 ns boyunca kalmıştır. Açıkça görülüyor ki, ICL3 çok kararlı bir konumda birden fazla hidrojen bağı kurarak reseptörün hücre içine bakan taban bölgesiyle güçlü bir etkileşim içine girmektedir. ICL3'ün bu kuvvetler topluluğundan kendini kurtarması için bir alosterik etkileşimden çok daha büyük bir dış kuvvete gereksinimi vardır. Bunun yanı sıra, reseptöre bir agonist bağlanmış olmasının reseptörün aktif hale geçmesini tetikleyecek kadar güçlü bir alosterik etkileşim olmadığı da birçok simülasyon ve deneysel çalışmalarında gösterilmiştir (Dror vd., 2011; DeVree vd., 2016; Bhattacharya vd., 2016).



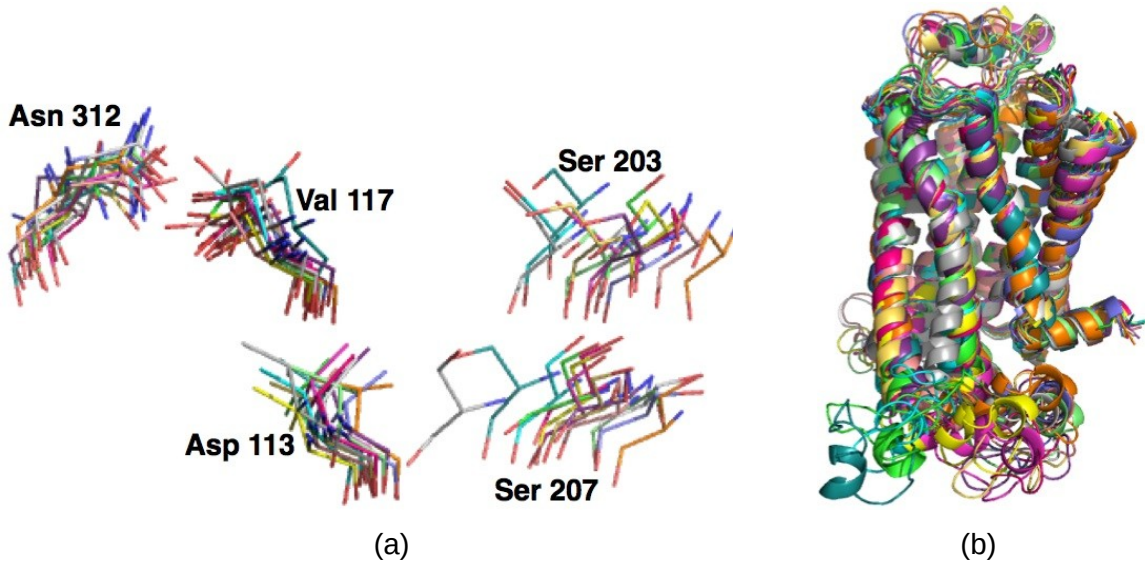
Şekil 15. 500 ns uzunluğundaki dördüncü kısıtlanmalı MD simülasyonu (*rstr4*) sonuçları. (a) ICL3'ün ağırlık merkezinin -x ve -y bileşenlerinin zamana göre değişimi. G protein'e ait alfa sarmal yapı (aktif kristaldeki 3SN6 PDB kodlu yapıdan) düz çizgilerle gösterilmiştir.

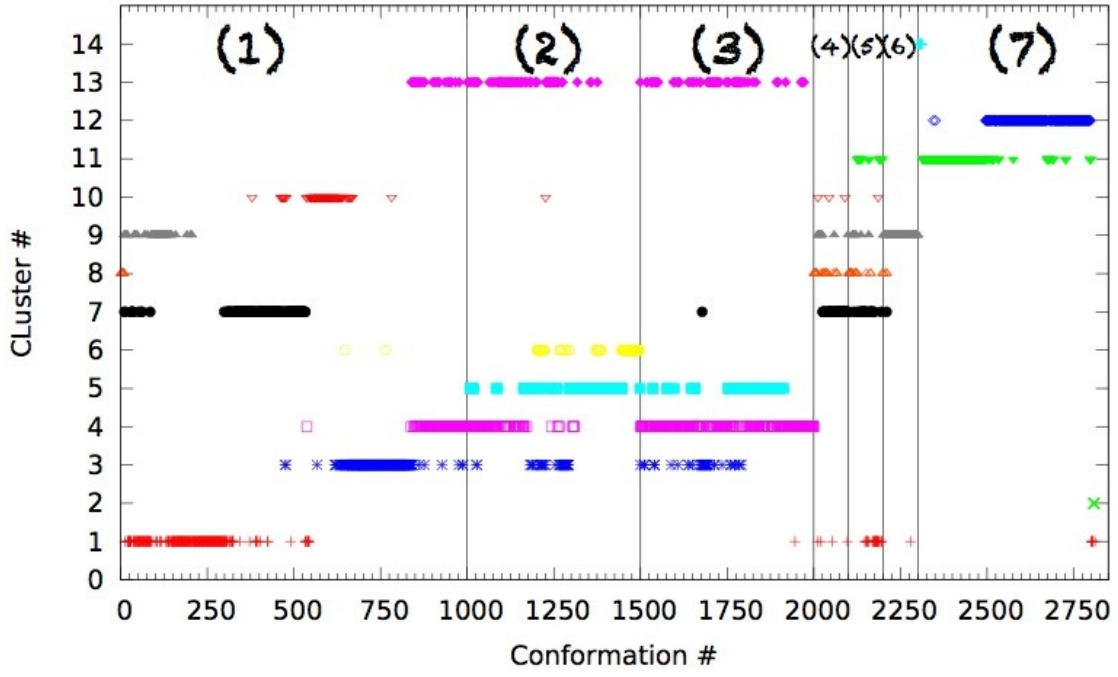
## 4.2 Moleküler Dinamik Gidişlerinin Kümelenmesi ve Farklı Reseptör Konformasyonlarının Belirlenmesi

Farklı reseptör konformasyonlarının belirlenmesi için şimdiye kadar yapılan tüm kısıtlamasız Moleküler Dinamik simülasyonları bir araya getirilmiştir. Bu simülasyonlara bir önceki orijinal *MD1 $\mu$ s* simülasyonu (Ozcan vd., 2013) da dahildir. Reseptörün serbest haldeyken taradığı özgün dinamiği temsil etmesi açısından kısıtlamaların olmadığı simülasyonlar kullanılmıştır. Buna göre 7 farklı simülasyon gidişizi kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla;

- 1) Orijinal *MD1 $\mu$ s*
- 2) İlk devam simülasyonu (*MD1 $\mu$ s\_ctd1*, 500 ns)
- 3) İkinci devam simülasyonu (*MD1 $\mu$ s\_ctd2*, 500 ns)
- 4)-6) 3'er adet 100 ns'lık kısa MD simülasyonlar
- 7) kısıtlamaların kaldırıldığı simülasyon (*MD500ns*, Tablo 2'de run#8)

Tüm konformasyonlar, 1ns aralıklarla okunmuştur. Toplamda 2800 ns'lık bir zaman dilimi için 2800 adet MD konformasyonu bir araya getirilerek *k*-clust algoritması ile gruplara ayrılmıştır. Bunun için ligant bağlanma bölgesindeki 5 kritik rezidünün (Asp113, Val117, Ser203, Ser207, Asn312) RMSD değeri kullanılmıştır (Şekil 15a). RMSD kritik değeri 1.5 Å olarak alınmıştır. Kontrol amaçlı, 5 inaktif (PDB kod: 2RH1, 3D4S, 3NY8, 3NY9, 3NYA) ve 7 aktif (3P0G, 3SN6, 3PDS, 4LDE, 4LDL, 4LDO, 4QKX) kristal yapı da 2800'lük gruba dahil edilmiştir. Bunun sonucunda toplam 14 küme oluşmuştur (Şekil 15b). Bu kümelerden birinde (cluster #2, Şekil 15c) sadece 6 aktif yapı bulunmaktadır. Her kümeden o kümenin ortalama yapısına (centroid) en yakın olan konformasyon doking çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.





(c)

Şekil 16. Kümeleme sonucu oluşan 13 temsili yapıdan alınan ve kümele için kullanılan (a) 5 kritik rezidü (b) tüm reseptör konformasyonu (c) oluşan kümeler ve barındırdıkları konformasyonlar.

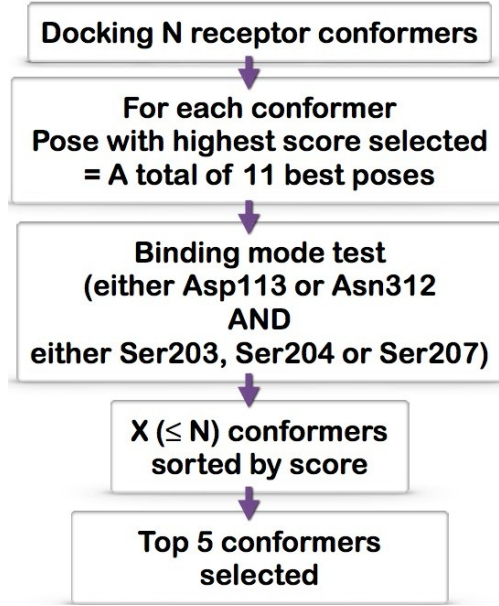
### 4.3 Doking Çalışmaları: Konformasyonların İlaç Molekülünün Etkisine Göre Sınıflandırılması

Doking/skoring uygulamalarına başlamadan önce bu programların tahmin gücünü ve seçiciliklerini test etmek amacıyla, kristal yapıları bilinen reseptörlere ait ligant molekülleri hem kendi reseptörlerine hem de diğer reseptörlere dok edilmiştir. Bu moleküller, Tablo 3'te gösterildiği gibi 2 yarı ters agonist, 2 ters agonist, 1 antagonist ve 4 farklı agonisten oluşmaktadır.

Tablo 3. Bilinen 5 inaktif ve 6 aktif kristal yapılarıdaki ligant türleri, aktivite ve biyolojik etkileri

PDB Kodu	Ligant İsmi	Ligant Türü	Aktivite	Biyolojik etki
2RH1	Carazolol	yarı ters agonist	İnaktif	azalan bazal aktivite
3NY8	ICI 118,551	ters agonist	İnaktif	azalan bazal aktivite
3NY9	JSZ	ters agonist	İnaktif	azalan bazal aktivite
3NYA	Alprenolol	antagonist	Nötr	değişmeyen bazal aktivite
3D4S	Timolol	yarı ters agonist	İnaktif	azalan bazal aktivite
3P0G	BI16707	yüksek afiniteli agonist	Aktif	artan bazal aktivite
3SN6	BI16707	yüksek afiniteli agonist	Aktif	artan bazal aktivite
4LDE	BI16707	yüksek afiniteli agonist	Aktif	artan bazal aktivite
4LDL	isoproterenol	yüksek afiniteli agonist	Aktif	artan bazal aktivite
4LDO	L-epinephrine	düşük afiniteli agonist	Aktif	artan bazal aktivite
4QKX	35V	kovalant agonist	Aktif	artan bazal aktivite

Her doking sonucunda en yüksek puanlı ligant poz ya da konformasyonun reseptörde kritik olduğu bilinen rezidülerle (ör. Ser 207 ya da Asp 113) etkileşim içinde bulunup bulunmadığına bakılmış, bulunmayanlar ilk adımda elenmiştir. Geriye kalan konformasyonlar, skor değerlerine göre sıralanmış ve skor değeri en yüksek 5 kristal yapının (top 5) aktivitesine bakılmış. Şayet dok edilen bir agonist molekül ise, aktif kristallerin inaktiflere göre daha fazla olması uygulanan doking programının seçici olduğuna işaret etmektedir. Aynı şekilde dok edilen bir ters agonist ya da antagonist ise ilk 5'tekilerin çoğunluğunun inaktif kristal yapılar olması beklenmektedir. Bu sınıflandırma protokolü Şekil 16'daki gibi özetlenmiştir.



Şekil 17. Doking çalışmalarında uygulanan sınıflandırma protokolü

Bu protokolün ilk uygulandığı molekül bir yarı ters agonist olan carazolol'dur. Tablo 4'te 7 farklı doking sonucu verilmiştir. Tabloda eksik olan bazı konformasyonlar bağlanma testini geçememiş olanlardır. Buna göre sıralamada en yüksek skor değerine sahip ve bağlanma testini geçmiş ilk 5 konformasyona bakıldığında tüm doking programlarının beklenildiği üzere yüzde yüz inaktif yapıları seçmiş olduğu görülmektedir. Bu tahmin başarısı iki sebepten kaynaklanabilir. Birincisi carazolol'un inaktif yapıları aktif yapılara tercih etmesi, diğer bir deyişle daha fazla sayıda bağ kurarak sıkı bir etkileşimde olması, ikincisi ise kullanılan programın ya da fonksiyonun bu farklılığı ortaya çıkartacak tahmin gücüne sahip olmasıdır. Her ikisi de aynı anda olunca, Tablo 4'teki gibi bir görüntü ortaya çıkmaktadır.

Tablo 4. Carazolol molekülünün kristal yapılara gerçekleştirildiği doking sonuçları.

Sıra	AutoDock	ChemPLP	GoldScore	ChemScore	DSX/CSD	DSX/PDB	Glide
1	3D4S	2RH1	3D4S	3NYA	2RH1	3D4S	2RH1
2	2RH1	3D4S	2RH1	2RH1	3D4S	2RH1	3D4S
3	3NY9	3NY9	3NYA	3NY9	3NYA	3NY9	3NYA
4	3NYA	3NYA	3NY8	3D4S	3NY9	3NYA	3NY9
5	3NY8	3NY8	3NY9	3NY8	3NY8	3NY8	3NY8
6	3SN6	4LDL	3SN6	3P0G	3SN6	3SN6	
7	3P0G	3SN6	4LDE	4LDE	4LDE	4LDE	
8	4LDO	4LDE		3SN6	4LDL	4LDL	
9	4LDE				4QKX	4QKX	
10					3P0G	3P0G	
11					4LDO	4LDO	

Buna benzer tablolar diğer moleküller için de çıkartılmış ve tüm sonuçlar Tablo 5'teki gibi bir araya getirilmiştir. Buna göre, örneğin ICI 118,551 isimli ters agonist için AutoDock ilk beşte 4 inaktif yapı bulmuş, buna karşılık Gold programına ait GoldScore fonksiyonu ilk beşte hiç inaktif yapı çıkartamamıştır. ICI 118,551 için olan sonuçlar genelde tüm doking programlarında benzer ölçüde başarısız olmuştur. Bu durum programın tahmin gücünün yetersizliğinden çok, ligant molekülün seçiciliğinin az olduğuna işaret etmektedir. Buna benzer bir durum, antagonist molekül alprenolol için de görülmüştür

Tablo 5. Kristal yapıları bilinen 8 ligant molekülü için doking sonuçlarının özeti

Ligand	AutoDock	ChemPLP	GoldScore	ChemScore	DSX/ CSD	DSX/ PDB	Glide
CAU	5	5	5	5	5	5	5
ICI	4	3	0	2	1	3	3
JSZ	5	5	5	5	5	5	4
Alprenolol	4	5	1	3	3	4	2
TIM	4	5	4	3	5	5	4
P0G	5	4	5	3	3	3	5
XQC	5	5	4	5	5	5	5
ALE	5	5	5	5	5	5	5
Total	37	37	29	31	32	35	33

Bir sonraki aşamada, Şekil 3'de de gösterildiği gibi 4 antagonist (butaxamine, esmolol, nebivolol, carvedilol) ve 2 agonist (formoterol, salbutamol) molekülün daha bilinen kristal yapılara dok edilmiştir. Burada da amaç, ligant moleküllerin seçiciliklerini test etmektir. Ama bundan önce, Tablo 5'te gösterilen sonuçlara bakarak, sıralamada ilk 5'te en düşük tahminleri yapan üç program elenmiştir. Bunlar GoldScore, ChemScore ve DSX/CSD olmuştur. Geriye kalan programlar AutoDock, ChemPLP, DSX/PDB ve Glide ile doking hesaplarına devam edilmiştir. Tablo 6'dan görüldüğü gibi, ters agonist ICI ve antagonist butaxamine seçiciliği en az ligant moleküllerdir. Biyolojik etkilerine göre üç gruba ayırarak bakıldığında ise seçiciliği en az olan grubun antagonistler olduğu görülmektedir.

Tablo 6. Kristal yapısı bilinen 8 ligant ve bilinmeyen 6 ligant molekülün doking sonuçları.

Biological Effect	Ligand Name	AutoDock	ChemPLP	DSX/PDB	Glide	Total
Inverse Agonist	CAU	5	5	5	5	20
	TIM	4	5	5	4	18
	ICI	4	3	3	3	13
	JSZ	5	5	5	4	19
Antagonist	Alprenolol	4	5	4	2	15
	Nebivolol	3	4	4	4	15
	Butoxamine	0	3	1	4	8
	Esmolol	4	0	5	5	14
	Carvedilol	5	3	3	4	15
Agonist	Formoterol	5	5	5	3	18
	Salbutamol	5	5	5	4	19
	XQC	5	5	5	5	20
	POG	5	4	3	5	17
	ALE	5	5	5	5	20
TOTAL		59	57	58	57	

Bölüm 4.2'de belirlenen 13 temsili MD konformasyonu ICI ve butaxamine dışında kalan moleküllerin her birine seçilen 4 ayrı program ile dok edilmiştir. Bağlanma testini geçenler daha sonra, kristal yapılarla birlikte skor değerlerine göre sıralanmıştır. Carazolol için yapılan hesaplar sonucunda belirlenen sıralama Tablo 7'deki gibi gösterilmiştir. 11 kristal yapıyla birlikte toplam 24 farklı reseptör konformasyonu bulunmaktadır. Buna göre listede en yüksek skorlu ilk 11 konformasyonu dikkate aldığımızda, carazolol için bağlanmaya elverişli 4 adet MD konformasyonu ortaya çıkmaktadır. Bunlar sırasıyla, 9'uncu (fr9), 715'inci (fr715), 1365'inci (fr1365) ve 1648'inci (fr1648) konformasyonlardır. Benzer şekilde bir analizi diğer ligant moleküllerine yaptıktan sonra, her ligant molekül için en az 3 doking programından ilk 11'de çıkan MD konformasyonları belirlenmiş ve Tablo 8'deki gibi biraya getirilmiştir (Tablo 8).

Doking çalışmalarında göze çarpan önemli bir bulgu da kristal yapıların skor değerlerinin MD konformasyonlara göre daha yüksek çıkmış olmasıdır. Bunun sebebi, kristal yapıların ligant ile kompleks haldeyken elde edilmiş olmaları, bundan dolayı da, ligant ile optimum etkileşim için gerekli her türlü konformasyonel değişime uğramış olmasıdır. Oysa MD konformasyonları ligant molekülleri olmadan optimize edilmiş yapılardır. Dolayısıyla, kristal ve MD yapılar arasındaki bu fark olağan bir durumdur.

Tablo 7. Carazolol için 11 kristal yapı ve 13 MD konformasyonuna yapılan doking sonuçları



Sıra	AutoDock	ChemPLP	DSX/PDB	Glide
1	3D4S	2RH1	3D4S	2RH1
2	2RH1	3D4S	2RH1	3D4S
3	3NY9	3NY9	3NY9	3NYA
4	3NYA	3NYA	3NYA	3NY9
5	3NY8	fr136S	3NY8	fr71S
6	fr136S	3NY8	fr1648	fr1648
7	fr1648	fr71S	3SN6	3NY8
8	fr71S	fr1648	fr71S	fr531
9	3SN6	4LDL	fr9	fr136S
10	3POG	fr9	4LDE	fr2231
11	fr531	fr844	fr210	fr9
12	fr2231	3SN6	4LDL	fr58S
13	4LDO	4LDE	4QKX	fr210
14	4LDE	fr2311	3POG	
15	fr844	fr58S	fr531	
16	fr9	fr531	fr136S	
17	fr58S	fr210	4LDO	
18	fr2311		fr2311	
19	fr210		fr844	
20			fr58S	
21			fr2661	

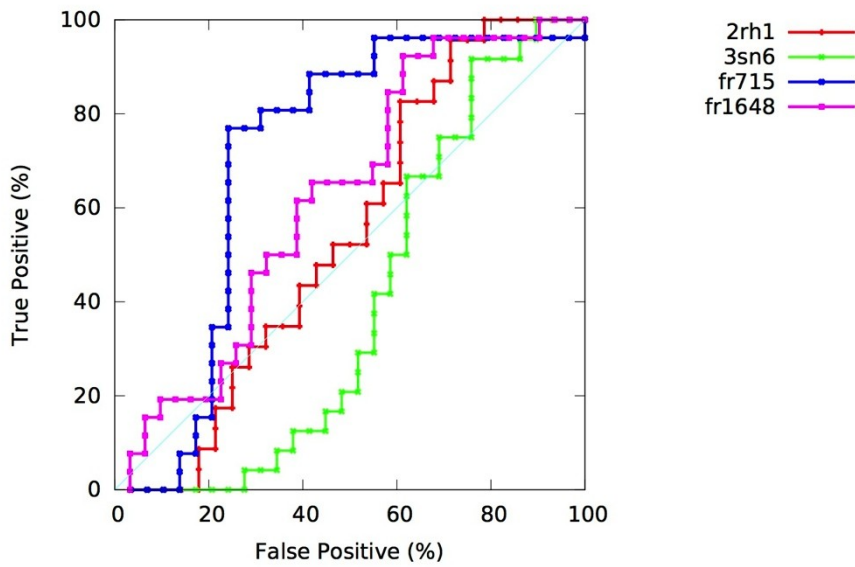
Tablo 8. Ligant moleküllerin doking sonuçlarında ilk 11'de yer alan ve en az üç doking programında çıkan MD konformasyonları

Mechanism of Action	Ligand Name	fr# 9	fr# 210	fr# 531	fr# 58S	fr# 71S	fr# 844	fr# 136S	fr# 1479	fr# 1648
Inverse Agonist	Carazolol					✓		✓		✓
	Timolol									✓
	JSZ								✓	✓
Antagonist	Alprenolol		✓							✓
	Nebivolol						✓			
	Esmolol					✓				
	Carvedilol									✓
Agonist	Formoterol									
	Salbutamol									
	XQC									
	POG									
	ALE		✓							

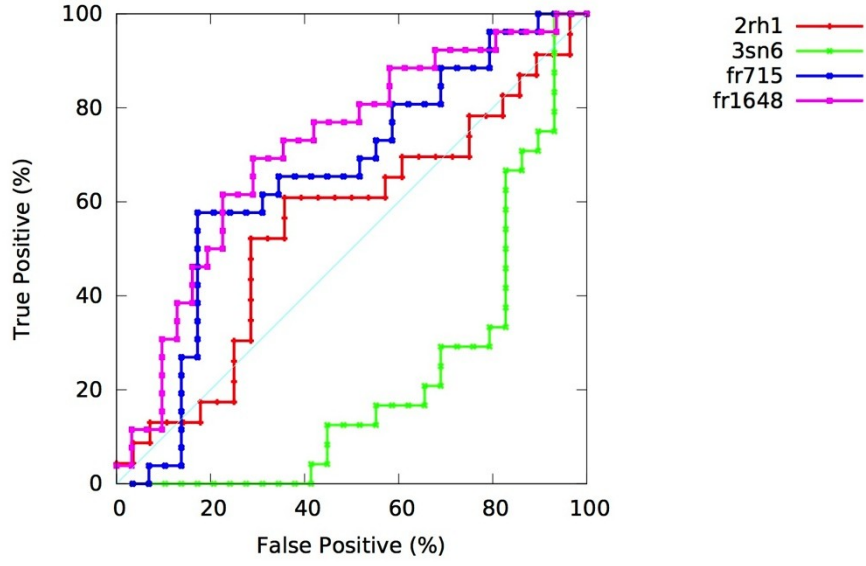
#### 4.4 Sanal Tarama ve Analiz

Tablo 8'de görüldüğü gibi 715 ve 1648'inci MD konformasyonları doking sonuçlarında 4 doking programından en az üçünde sıralamada ilk 11'de çıkmıştır. Bir sonraki çalışma, bu iki konformasyon ile 50 agonist ve 50 antagonist/inverse agonist moleküllerinden oluşan bir veri bankası taranmıştır (Gatica ve Cavosotto, 2012). Burada amaç, seçilen bu iki konformasyonun ne derece seçici olduklarını ortaya çıkartmaktır. Kullanılan scoring fonksiyonu ChemPLP olarak seçilmiştir, zira diğer üç programa göre en hızlı olanıdır. Sonuçlar ROC eğrileriyle Şekil 17'deki gibi gösterilmiştir. Kontrol amaçlı, bir aktif kristal yapı (PDB kod: 3SN6), bir de inaktif kristal yapı (PDB kod: 2RH1) için de benzer hesaplar yapılarak ROC eğrileri çıkartılmıştır.

ROC eğrisi (receiving operating characteristic), tarama sonuçlarının analizinde sıklıkla kullanılan bir ölçüm tekniğidir. x ve y axis'leri sırasıyla, belirli bir yüzdelik dilimde (top %) true positive'lerinin yüzdesine ( $TP/(TP+FN)$ ) karşılık false positive'lerin yüzdesine karşılık gelmektedir ( $FP/(FP+TN)$ ). Buna göre, eğer aranan molekülün türü bir antagonist/inverse agonist ise, o halde TP değeri bakılan yüzdelik dilimde antagonist/inverse agonist'lerin toplam antagonist/inverse agonist'lere oranını vermektedir. FP ise yüzdelik dilimde çıkmış agonist'lerin toplam agonistlere oranıdır. İlk denememizde, inaktif kristal yapı (2RH1), 3SN6, fr715 ve fr1648 Şekil 17a'daki gibi gösterilmiştir. Buna göre, her iki MD konformasyonu da, antagonist ya da ters agonistler için inaktif kristal yapı olan 2RH1'dan daha yüksek seçiciliğe sahiptir.



(a)



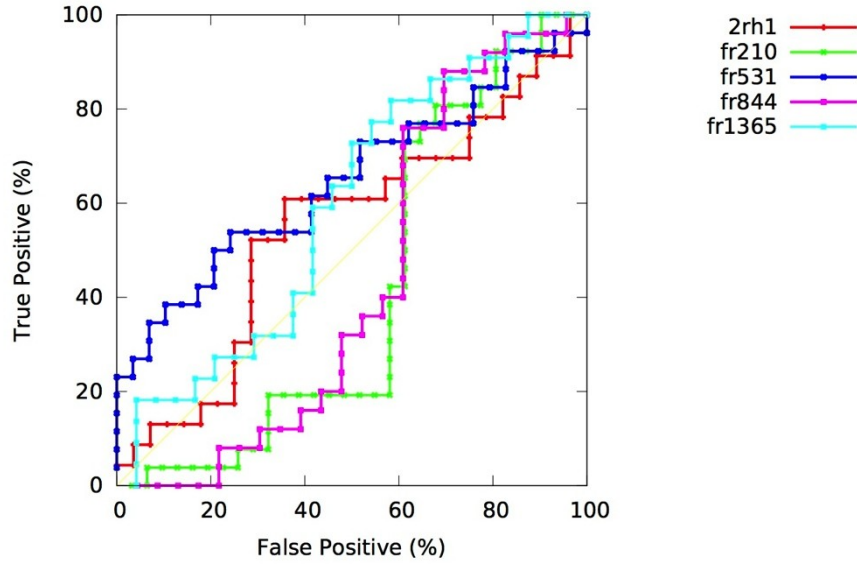
(b)

Şekil 18. Kristal yapılar ve MD konformasyonları için ROC eğrileri (a) normalize edilmemiş (b)  $N^{0.5}$  ile normalize edilmiş skor değerleri için

Skor değerleri, molekülün boyutuyla doğru orantılı bir şekilde yükselmektedir. Dolayısıyla, büyük bir molekülün tarama çalışmalarında ilk sıralarda yer alması kaçınılmaz olmaktadır. Skor değerlerinin moleküler ağırlıkla (ya da Hidrojen dışındaki ağır atomların sayısı) normalize edilmesi sonucunda, her bir atomun toplam skor değerine olan katkısı elde edilir ve bu değer o molekülün ağırlığından bağımsız bir bağlanma afinitesidir. Bu çalışmada, iki farklı normalizasyon denendi. Birincisinde her bir molekülün skor değeri (S) o moleküldeki toplam ağır atom sayısının (N; hidrojen atomları dışında kalan tüm atomlar) kare köküne ( $S/N^{0.5}$ ) bölündü. ROC eğrisi bu yeni skor değerlerine göre hesaplanınca Şekil 17b'deki bir görüntü ortaya çıktı. Roc eğrilerinin yükseldiği açıkça görülmektedir. Benzer şekilde fr1648 ve fr751, 2RH1 kristal yapıdan daha seçici davranmaktadır.

Roc eğrilerinden görülen bir diğer bulgu da, 3sn6 aktif kristal yapısının agonist moleküller için oldukça seçici davrandığıdır. Buna benzer bir bulgu, Cavasotto ve arkadaşları tarafından yapılan tarama çalışmalarında da ortaya konmuştur (Gatica ve Cavasotto, 2012). Dolayısıyla, 3SN6 kodlu aktif yapı, agonist taramalarında başarıyla kullanılabilecek bir konformasyona sahiptir. Diğer taraftan 2RH1 kodlu inaktif yapı, antagonist/ters agonist bulmak için yeterli seçiciliğe sahiptir ve kesinlikle tarama çalışmaları için kullanılabilecek bir hedef molekül değildir. Ancak, MD konformasyonları, ligant ile optimize edilmemiş bir konformasyonu temsil etmelerine rağmen, seçicilik konusunda oldukça başarılı bir performans sergilemişlerdir.

Deneme amaçlı seçilen diğer 4 MD konformasyonları da benzer bir çalışmaya tabii tutularak ROC eğrileri hesaplanmıştır. Şekil 18'de toplam 4 konformasyon (fr210, fr531, fr844, fr1365) ile birlikte 2RH1 inaktif yapı gösterilmiştir. Bu konformasyonlardan, sadece fr531 2RH1 kristal yapıdan biraz daha iyi seçiciliğe sahiptir, ancak fr751 ya da fr1648 kadar etkili değildir.



Şekil 19. MD konformasyonları için ROC eğrileri.  $N^{0.5}$  ile normalize edilmiş skor değerleri için. İnaktif kristal yapı ile beraber gösterilmiştir.

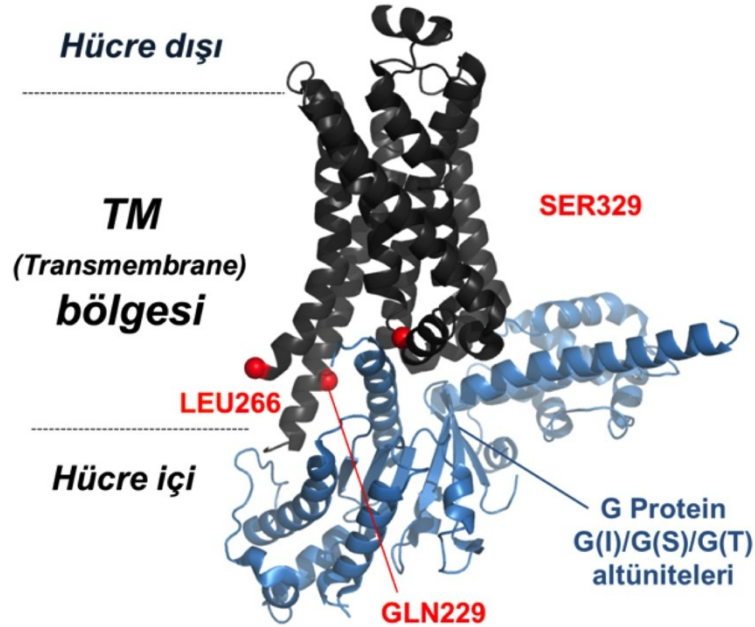
Bu çalışmanın sonucunda, daha kapsamlı veri bankalarını antagonist/ters agonist bulmak için yapılacak tarama çalışmalarında kullanılacak iki farklı MD konformasyonu önerilmektedir. Ancak bu iki konformasyon, bir ligant ile optimize edilmemiş olduğundan, taramadan önce dok edilmiş bir antagonist ya da ters agonist ile kısa bir MD simülasyonu yapılması tavsiye edilir.

#### 4.5 Allosterik Sinyal Aktarım Yollarının Belirlenmesi

Bu yeni iş paketi projemizde sunulan çalışmaya önemli katkı yapacağına gerekli görülmüştür.  $\beta_2$ AR'daki allosterik sinyal aktarım yollarının farklı bir yöntemle belirlenmesi projede hedeflenen allosterik mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmada,  $\beta_2$ AR'ın literatürde mevcut aktif ve inaktif kristal yapılarına (Rasmussen vd., 2007; Cherezov vd., 2007) ek olarak önceki iş paketlerinde bahsedilen MD simülasyon gidişlerinin kümelenmesi sonucu elde edilen farklı konformasyonlar kullanılmıştır. Özellikle ortosterik ligant bağlantı bölgesi ile G-protein bağlantı bölgesi arasındaki en kısa haberleşme yolları incelenmiştir. MD simülasyonlarından elde edilen konformasyonlar, literatürdeki x-ışın kristal yapılarda yer almayan ve transmembranın kolektif dinamiğini oldukça etkilediği bilinen hücre içine bakan ICL3'ü içermektedir (Ozcan vd., 2013). Bu da, çalışmanın benzerlerinden farklı olarak allosterik mekanizmanın daha doğru ve detaylı incelenmesine olanak sağlamıştır.

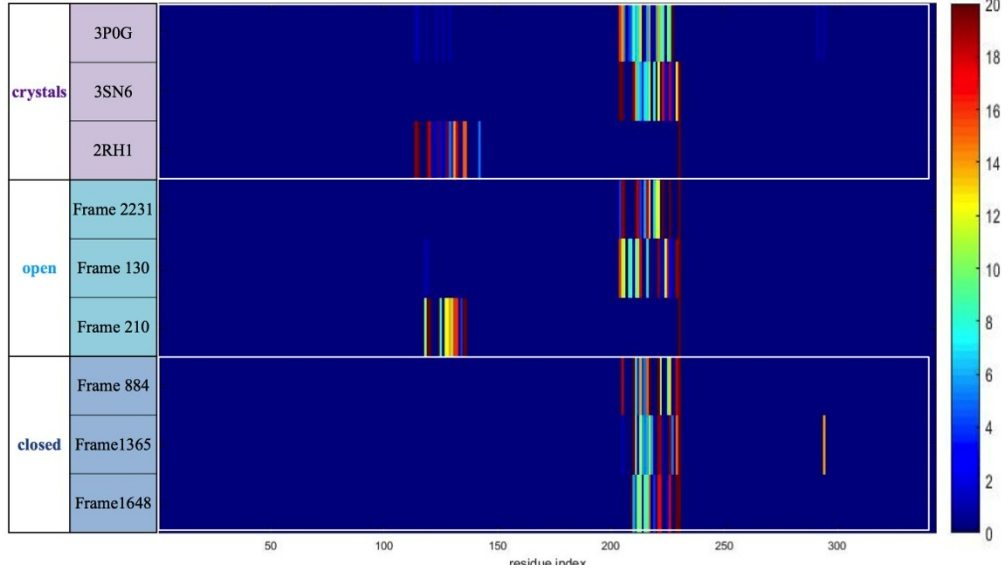
En kısa yol hesabı için başlangıç noktası olarak carazolol'un bağlandığı bölge alınmış ve üç farklı bitiş noktası belirlenmiştir. Bitiş noktaları sırasıyla, TM5, TM6 ve TM7 sarmallarının hücre içine bakan en uç noktalarıdır; GLN229, LEU266, ve Ser329 (Şekil 19).



Şekil 20. G Protein bağlanma bölgesi ve seçilen bitiş noktalarının görüntüsü

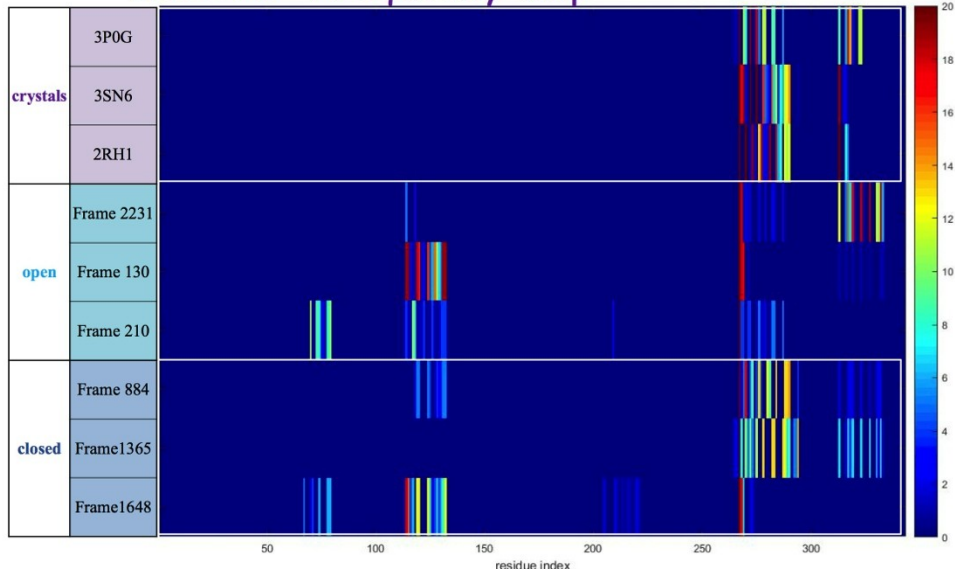
Şekil 20'de ise, her üç durum için hesaplanan en kısa (skor değeri en düşük) 20 haberleşme yolunda bulunan rezidülerin ortalama görülme sıklıkları hesaplanmıştır. Buna göre, TM5'in ucuna gidecek bir sinyalin seçtiği en kısa yol, ICL3'ün kapalı olduğu konformasyonlar için, sadece TM5 üzerinden geçerken, ICL3'ün açık olduğu durumlarda, (ör. fr210) TM3'ü de tercih etmiştir. Bu sonuca daha dikkatli bakıldığında sinyal aktarımının büyük bir kısmı TM3 üzerinden geçmiş, TM5'e son anda geçiş yapmıştır. Kristal yapılarda benzer bir durum inaktif olanda görülmüştür.

### GLN229 - frequency map

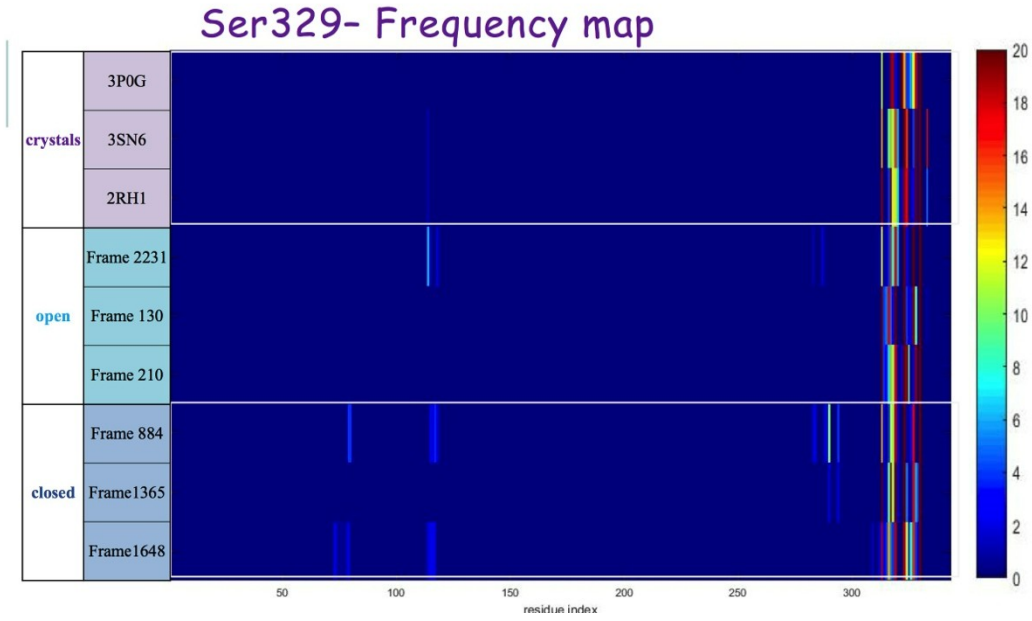


(a)

### LEU266- Frequency map



(b)



(c)

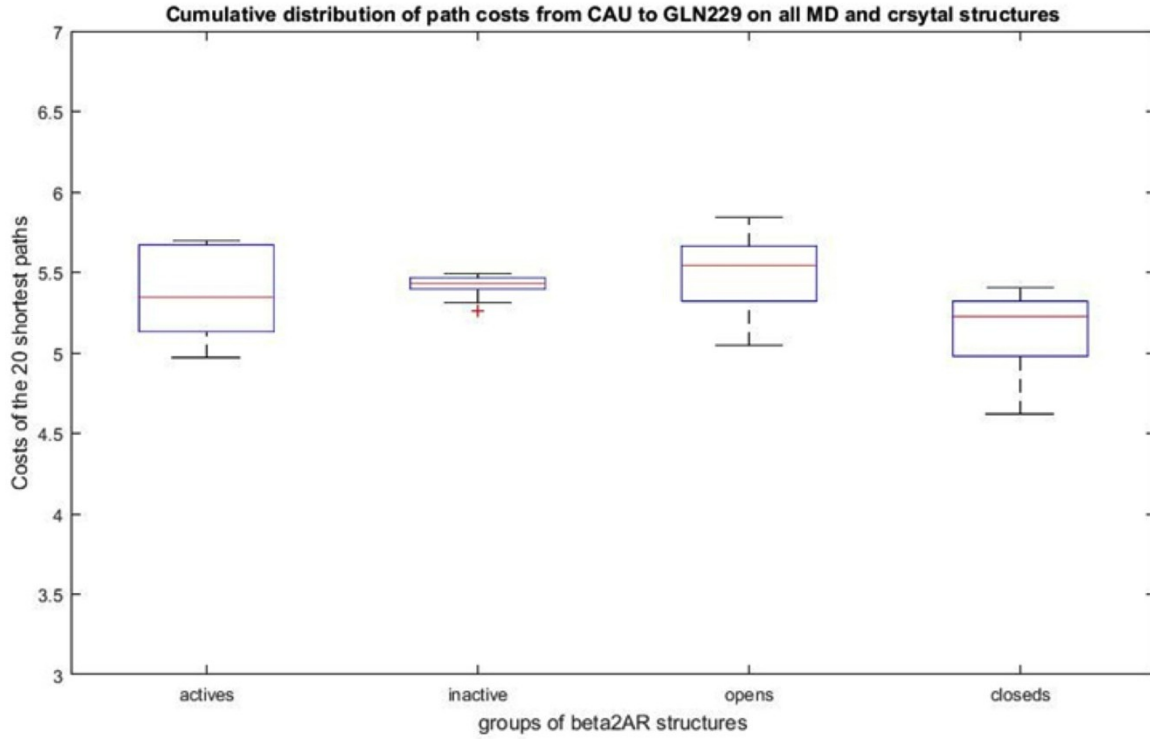
Şekil 21. En kısa 20 haberleşme yolunda bulunan rezidülerin ortalama görülme sıklıkları (a) GLN229, (b) LEU266, ve (c) Ser329

TM6'nın sonuna giden aktarım yoluna bakıldığında, sinyalin TM6'dan farklı olarak TM7'e ve TM3'e sıçradığı görülmektedir. Çoğunlukla sinyal aktarımı, başlarda TM3'e bir geçiş yapmakta, daha sonra kesintisiz TM6 üzerinde devam etmektedir. Hem kristal yapılar da, hem de MD konformasyonlarında büyük bir çoğunlukla TM6 üzerinde ilerliyor. Bu da TM6'nın sinyal aktarımında oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Önemli bir diğer bulgu da, kristal yapıların hiçbirinde TM3'e geçişin olmamasıdır. Bu durum, kristal yapılar da sarmallar arası etkileşimin daha zayıf olduğunu bir göstergesidir. MD konformasyonlar, reseptörün doğadaki salınımlarını daha iyi temsil ettiğinden, TM3'ün TM5 ile etkileşimi muhtemeldir ve bu aktarım yolunda seçilmesinin beklenen bir durum olduğu söylenebilir.

TM7'nin sonuna giden (Ser329) sinyal aktarımının büyük bir çoğunluğunun TM7 üzerinden geçmesi önemli bir bulgudur. Buna göre TM7 ile bağlantılı  $\beta$ -arrestin aktarım yolunun G protein aktarım yolundan tamamen bağımsız olduğu görülmektedir. Bu bulguları destekleyen çok sayıda deneysel çalışma mevcuttur [38-44]. TM7 konum itibariyle diğer sarmallarla çok yakın temasta değildir ve bu da iki bağımsız sinyal aktarım yolunu ortaya çıkartmıştır.

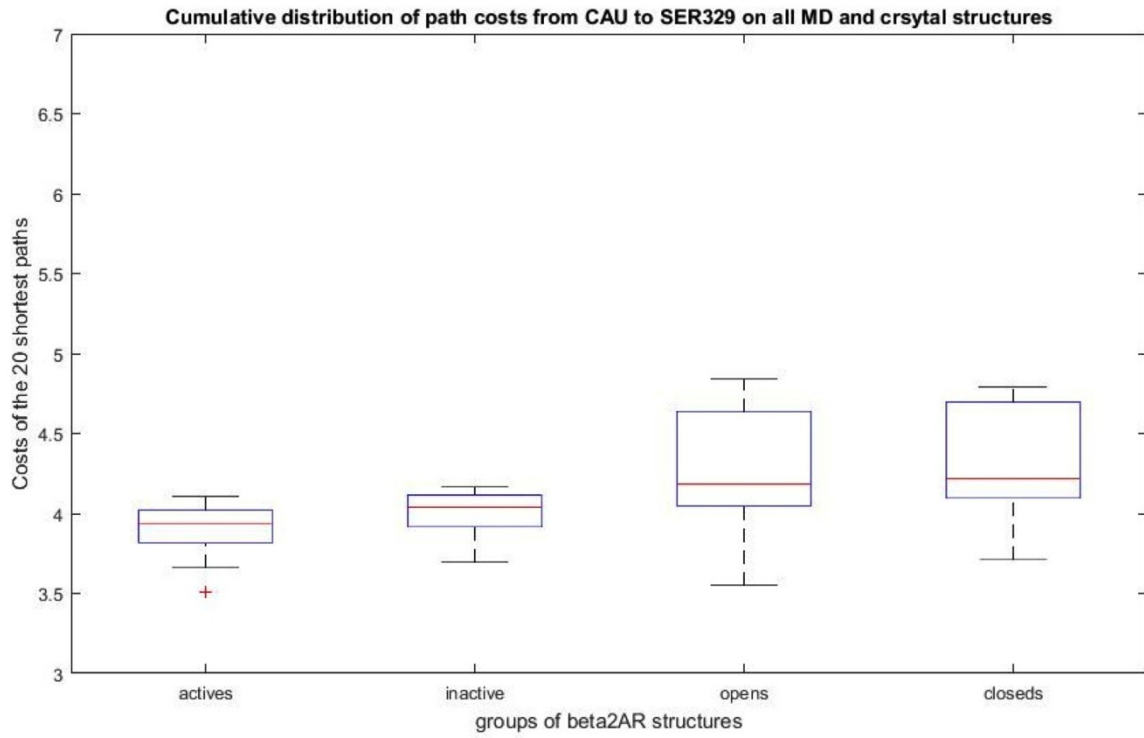
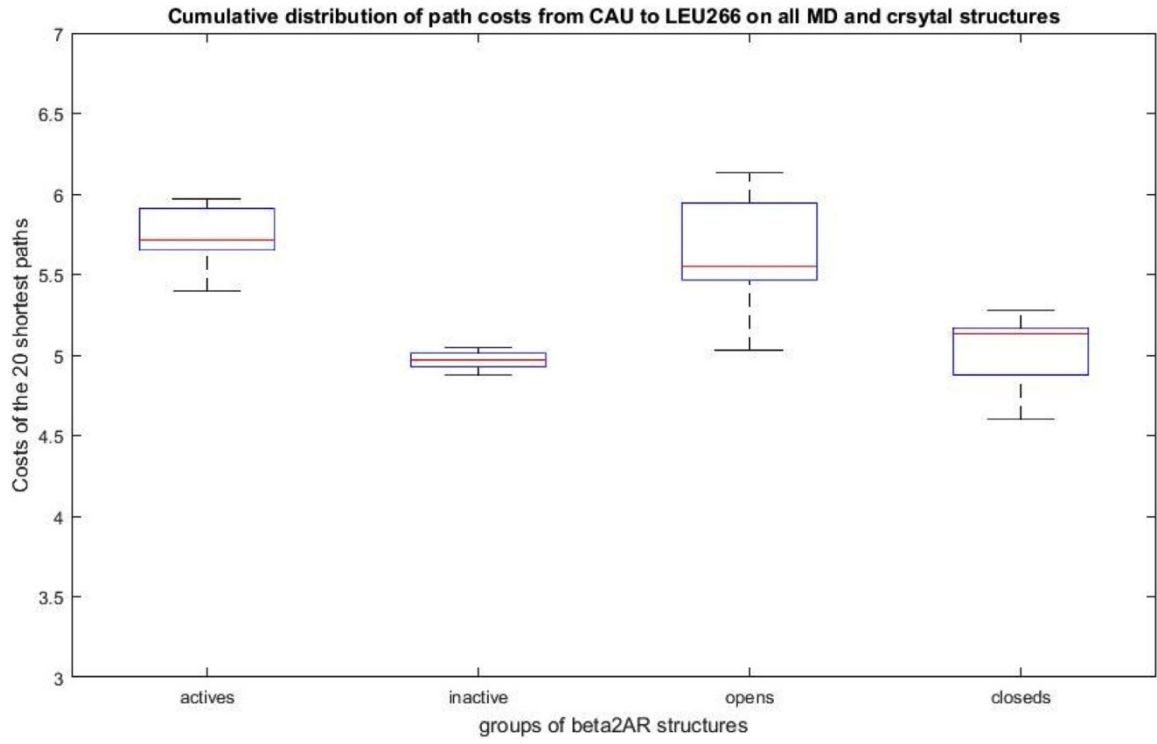
Her konformasyon için en düşük skorlu ilk 20 yol seçilmiş ve analiz edilmiştir. En düşük skor değerleri (cost) rezidüler arası en yüksek bağlantı miktarlarını ifade etmektedir. Şekil 21a'da

gösterildiği gibi, bu değerler sinyalin TM5'in sonuna gittiği durum için kapalı ICL3 konformasyonlarında biraz daha düşüktür. Bu durum, TM5 üzerinden geçen yolun üzerindeki rezidü-rezidü etkileşimlerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Benzer bir durum TM6'nın ucuna giden sinyal aktarım yolları için de söylenebilir. ICL3 konformasyonu kapalı hale geçtikçe, sarmal üzerindeki bağlar biraz daha sıklaşıyor, bu da skor değerinin düşmesine yol açıyor. Bunu daha da kayganlaşan, en az çaba sarfederek geçiş imkanı veren bir yol gibi düşünebiliriz. Diğer taraftan, TM7'nin sonuna giden yol için ICL3'ün açık ya da kapalı olmasının bir şey farketmediği, ancak ICL3'ün her iki durumunda da TM5 ve TM6'daki yollardan daha düşük skorlu oldukları görülmektedir. Bu düşüklük, TM7'nin daha kısa bir sarmal olmasından da kaynaklanmaktadır.



(a)





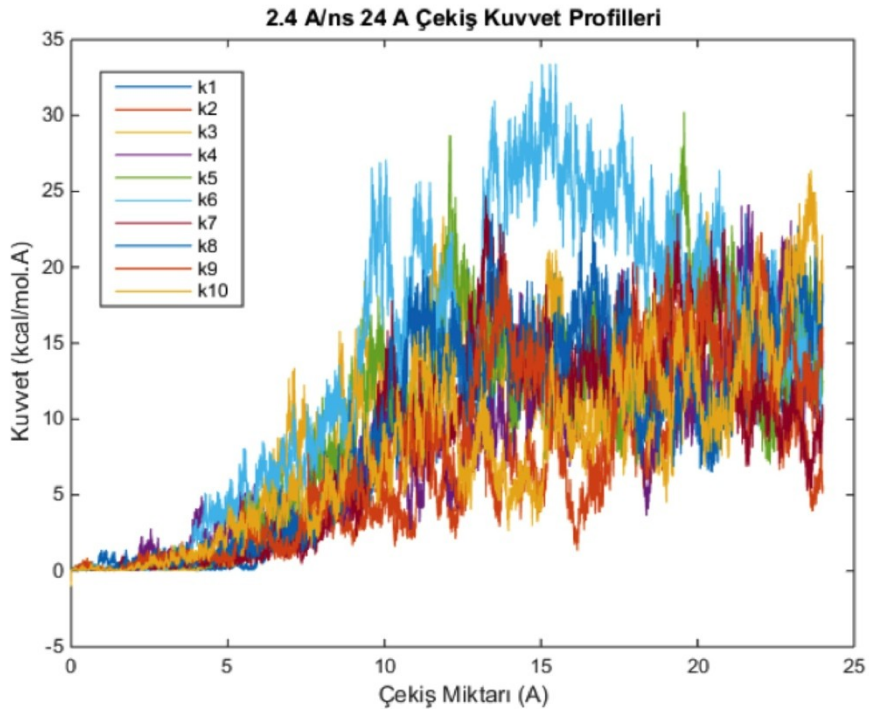
Şekil 22. En kısa 20 haberleşme yolu için hesaplanan skor değerlerinin dağılım grafiği (a) GLN229, (b) LEU266, ve (c) Ser329

#### 4.6 Yönlendirilmiş MD (steered MD) Yöntemiyle ICL3'ün Serbest Bağlanma Enerjisinin ( $\Delta G$ ) Hesaplanması

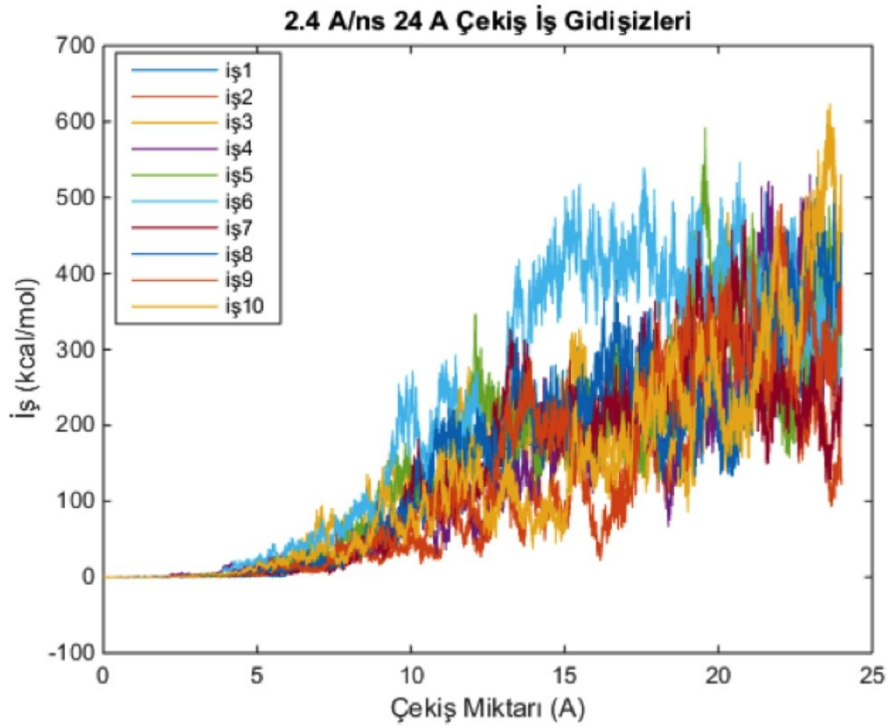
Yönlendirilmiş MD simülasyonlarında, ICL3'ün üzerine uygulanan bir kuvvet ile kapalı konumdan açık konuma getirilmesi hedeflenmektedir. Bilindiği üzere, ICL3 bölgesi kapalı hale geçtikten sonra gerçekleştirilen birçok MD simülasyonunda kapalı konumu korumuş ve genel hareketliliğinde ciddi bir düşüş meydana gelmiştir. Bu çalışmada, ICL'ü kapalı konumdan açık konuma getirmek için gereken aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır. Öncelikle, ligant bağlanma bölgesine Tablo 2'de *rstr5* simülasyonu için kullanılan bölgeyi daraltacak şekilde 8 Å civarında olan kısıtlamalar getirilmiştir. Ardından, üç farklı hızda, 1 Å/ns, 2.4 Å/ns ve 10 Å/ns, ICL3 lipid tabakaya doğru çekilmiştir.

##### 4.6.1 Ligant Bağlanma Bölgesini Daraltacak Şekilde Kısıtlamalı 24 Å Yönlendirilmiş MD Analizi

2.4 Å/ns hızla ligant bağlanma bölgesindeki kısıtlama serbest bırakılarak gerçekleştirilmiş olan yönlendirilmiş MD simülasyonlarında, Ser246-C $\alpha$  atomu 24 Å çekilmesi sonucunda Thr68-C $\alpha$  ve Ser246-C $\alpha$  arasındaki mesafe 49.85 Å kadar açılmıştır. Gerçekleştirilen iş simülasyonlarının standart sapması 98.76 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kuvvet ve iş profilleri Şekil 22'de gösterilmiştir.



(a)

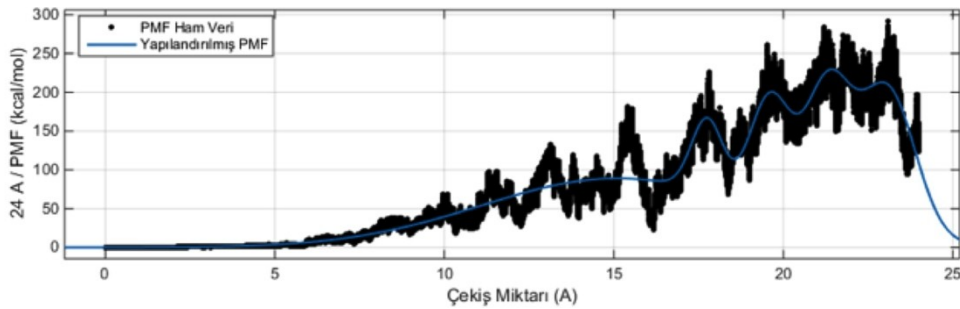


(b)

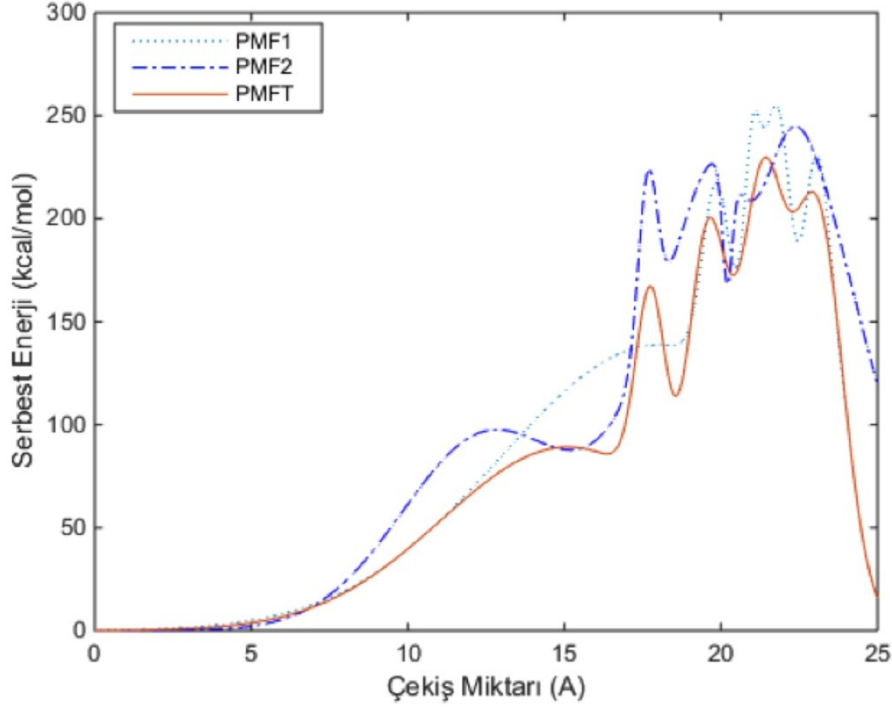
Şekil 23. 10 Å/ns hızda gerçekleştirilen simülasyonda (a) kuvvet profilleri (b) iş gidişizleri

#### 4.6.2 PMF Hesapları: 24 Å Yönlendirilmiş MD Analizi

Reaksiyon koordinatı sabitlenerek gerçekleştirilmiş olan yönlendirilmiş MD analizlerinde 2.4 Å/ns hızla 24 Å çekilmiş, üçüncü hücre içi düğümünün açık konformasyona geçmesi için aşılması gereken enerji bariyerleri saptanmıştır. 24 Å çekişte toplam 10 simülasyon gerçekleştirilmiştir. *Gaussian Drift* yöntemiyle arındırılmış kuvvet verileri üzerinden gerçekleştirilen PMF ölçümleri Doğrusal Olmayan En Küçük Kareler Yöntemiyle (NonLinear Least Squares Method) ile 5. dereceden yeniden yapılandırılmıştır. (Gullingsrud vd., 1999) 10 ölçüm üzerinden Gaussian olarak uyarlanan PMF verisi ile ham PMF verisinin 0.9443 r-square güven aralığında saptanmıştır (Şekil 23a).



(a)



(b)

Şekil 24. (a) 2.4 Å/ns 24 Å çekiş uygulanmış ölçümlerin ham PMF verisi ile yapılandırılmış PMF karşılaştırması, ölçümler 10 simülasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir. (b) PMF1 iş gidişizi üzerinden hesaplanan ilk set PMF2 iş gidişizi üzerinden hesaplanan ikinci set PMFT: toplam gerçekleştirilen iş gidişizleri üzerinden hesaplanan set

Yönlendirilmiş MD yöntemiyle yapılan PMF hesaplarında MD simülasyonlarının çekiş miktarı ve çekiş süresi enerji bariyerlerinin hesaplanmasında ve uyarlanan PMF verilerinin hassasiyet aralıklarının gerçekçiliğinde önemli rol oynamaktadır. Şekil 23b'de gözlemlenen 13 Å ve 15 Å tepe noktaları bir rampa oluştururken 18 Å, 20 Å ve 22 Å'luk mesafelerde 3 farklı enerji bariyeri gözlemlenmektedir. Elde edilen verinin güven aralığını saptamak için gerçekleştirilen simülasyonlardan 5'erli iş gidişizlerinin ve toplam iş gidişizlerinin Jarzinsky Eşitliği'ne göre PMF hesabı karşılaştırması Şekil 23b'de gösterilmektedir. Hesaplanan üç farklı PMF değeri 16 Å sonrasında birbirlerine yakın değerler vermektedir. Niceliksel olarak buradan 16 Å'a kadar olan enerji düzleminde SMD atomunun hareket alanında izleyebileceği farklı yolların 16 Å sonrasında gözlenen enerji bariyerine göre daha fazla olduğu söylenebilir. Ayrıca uygulanan 24 Å çekiş miktarı ICL3'ün açık konformasyonun da ötesinde olduğu için buradaki enerji bariyeri proteinin tersiyer yapısını korumak adına oluşturduğu bir enerji bariyeri olabileceği de söylenebilir.

## 5. TARTIŞMA/SONUÇ

Protein işlevlerini belirleyen dinamik yapının ve allosterik mekanizmaların anlaşılması ilaç tasarım çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle ilaç endüstrisinin üzerinde en fazla çalışma yaptığı GPCR ailesinden olmasına rağmen,  $\beta$ 2-AR dinamiği ve işleyiş mekanizması hakkında daha bir çok bilinmeyen mevcuttur. Bu projenin amacı,  $\beta$ 2-AR reseptörünü olabildiğince doğal haliyle modellemek ve dinamik yapı hakkında en gerçekçi tahminlerde bulunarak deneysel çalışmalara destek vermektir. Bu kapsamda elde edilen önemli sonuçlar aşağıda gibi özetlenmiştir:

1. ICL3'ün protein dinamiğindeki kritik önemi simülasyon çalışmalarında gösterilmiştir.
2. Bir önceki simülasyon çalışmasında ortaya çıkan yeni inaktif yapının son derece kararlı ve olası bir yapı olduğu ortaya çıkmıştır.
3. Reseptörün ligant bağlanma bölgesinden başlayarak ICL3'ü içine alan, G protein bağlanma bölgesine doğru yayılan sinyal aktarım yolunun transmembran sarmallar TM5 ve TM6 üzerinden geçtiği anlaşılmıştır.
4. Ligant bağlama bölgesinin yeni gözlemlenen inaktif yapıdaki gibi geniş tutulması sonucu ICL3'teki kapanma yeni bir alosterik etkileşim ortaya çıkartmıştır. Bu alosterik mekanizma, TM5'in üst yarısının lipid tabakaya doğru bükülmesinin ardından, TM5 üzerinden TM6'ı içine alacak şekilde hücre içine doğru yayılmaktadır. ICL3 loop bölgesi, bu iki sarmalın arasında 32 rezidülük bir yer kapladığından, her iki sarmalda merkeze doğru olan yönelme, ICL3'ün de merkeze yönelmesine ve kapanmasına yol açmaktadır.
5. ICL3'ün kapalı konformasyonu, reseptörün aktivitesini tamamen ortadan kaldırmaktadır, zira G protein bağlanma bölgesini bütünüyle bloke etmektedir.
6. Kapalı haldeki ICL3'ün kendiliğinden ya da ligant bağlanma bölgesinin tetiklemesi sonucu serbest kalması simülasyon koşullarında mümkün değildir. Ancak dışardan bir kuvvet ile bu mümkün olmuştur (yönlendirilmiş, steered MD).
7. Reseptörün alt ve üst kısımlarındaki alosterik etkileşimin en yüksek olduğu durum yeni inaktif yapıya aittir. Reseptör bu yapıdan uzaklaştıkça, üst ve alt yarıların korelasyonu da düşmektedir.
8. MD konformasyonlarından bazılarının seçiciliğinin kristal inaktif yapınıninkinden daha iyi olduğu görülmüştür. Sanal tarama çalışmalarında hedef molekül olarak kullanıldıklarında başarı oranını yükseltecektir.
9. Reseptörün en kısa yolizlerine bakıldığında, TM7'nin ucuna doğru giden bir sinyalin TM5 ve TM6'dan bağımsız bir yol izlediği ve sadece TM7 üzerinde gittiği

görülmektedir. Bu da, G-protein bağlanma yolundan tamamen bağımsız olan beta-arrestin sinyal aktarım yolunun varlığını destekler niteliktedir.

Projeye ilgili konular kapsamında devam edilmesini düşündüğümüz çalışmalar aşağıda gibi sıralanmıştır:

1. Yönlendirilmiş (steered) MD çalışmalarına daha kapsamlı bir şekilde devam edilecek. Özellikle, ICL3, TM5, TM6 ve TM7'nin üst bölgesine uygulanacak kuvvetlerle reseptörün dinamik yapısı hakkında daha detaylı bilgiler ortaya çıkartılabilecektir.
2. Bu projede elde ettiğimiz ve sanal taramada başarılı olan konformasyonlar, dok edilecek moleküllerle birlikte kısa bir MD simülasyonuna tabii tutularak optimize edilecek, bu sayede kristal yapılarıdaki kadar yüksek skor değerleri elde edilebilecektir. Daha sonra, bu konformasyonlarla daha kapsamlı ve büyük bir veri bankası taraması yapılacaktır.
3. Reseptörün dimer yapısı daha önceki bir çalışmamızda (Koroglu ve Akten, 2015) tahmini birden fazla modeli oluşturulmuş ve en olası model seçilmiştir. Bu dimer modelin MD simülasyonlarıyla dinamik yapısının çalışılması planlanmaktadır.

## 6. REFERANSLAR

- Azzi, M. Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., Piñeyro, G. 2003. "Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G-protein-coupled receptors", *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 11406–11.
- Baker, J.G. Hall, I.P., Hill, S.J. 2003. "Agonist and inverse agonist actions of  $\beta$ -blockers at the human  $\beta_2$ -adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling", *Mol Pharmacol*, 64, 1357–69.
- Bhattacharya, S., Vaidehi, N. 2014. "Differences in Allosteric Communication Pipelines in the Inactive and Active States of a GPCR", *Biophys J.*, 107, 422-34.
- Bhattacharya, S., Salomon-Ferrer, R., Lee, S., Vaidehi, N. 2016. "Conserved Mechanism of Conformational Stability and Dynamics in G-Protein-Coupled Receptors", *J. Chem. Theory Comput*, 12(11), 5575–84.
- Bock, A., Bermudez, M., Krebs, F., Matera, C., Chirinda, B., Sydow, D., Dallanocce, C., Holzgrabe, U., De Amici, M., Lohse, M.J., Wolber, G., Mohr, K. 2016. "Ligand Binding Ensembles Determine Graded Agonist Efficacies at a G Protein-Coupled Receptor", *J Biol Chem*, 291(31), 16375-89.
- Bokoch, M.P., Zou, Y., Rasmussen, S.G., Liu, C.W., Nygaard, R., Rosenbaum, D.M., Fung, J.J., Choi, H., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Puglisi, J.D., Weis, W.I., Pardo, L., Prosser, R.S., Mueller, L., Kobilka, B.K. 2010. "Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor", *Nature*, 463, 108–12.
- Chennubhotla, C., Bahar, I. 2007. "Signal Propagation in Proteins and Relation to Equilibrium Fluctuations", *PLOS Comp. Biol*, 3, 1716-26.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Steven, R.C. 2007. "High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor", *Science*, 318, 1258-65.
- Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W., Kollman, P.A. 1995. "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules", *J Am Chem Soc*, 117(19), 5179-97.
- DeVree, B.T., Mahoney, J.P., Vélez-Ruiz, G.A., Rasmussen, S.G., Kuszak, A.J., Edwald, E., Fung, J.J., Manglik, A., Masureel, M., Du, Y., Matt, R.A., Pardon, E., Steyaert, J.,

Kobilka, B.K., Sunahara, R.K. 2016. "Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs", *Nature*, 535(7610), 182-6.

Dijkstra, E.W. 1959. "A note on two problems in connection with graphs", *Numerical Mathematics*, 1, 269–271.

Dror, R.O., Arlow, D.H., Maragakis, P., Mildorf, T.J., Pan, A.C., Xu, H., Borhani, D.W., Shaw, D.E. 2011. "Activation mechanism of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor", *PNAS*, 108, 18684–9.

Eddy, M.T., Didenko, T., Stevens, R.C., Wuthrich, K. 2016. " $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Conformational Response to Fusion Protein in the Third Intracellular Loop", *Structure*, 24, 1-8.

Elling, C.E., Frimurer, T.M., Gerlach, L.O., Jorgensen, R., Holst, B., Schwartz, T.W. 2006. "Metal ion site engineering indicates a global toggle switch model for seven-transmembrane receptor activation", *J Biol Chem*, 281, 17337–46.

Elling, C.E., Thirstrup, K., Holst, B., Schwartz, T.W. 1999. "Conversion of agonist site to metal-ion chelator site in the beta(2)-adrenergic receptor", *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 12322–7.

Feig, M., Mackerell, A.D., Brooks, C.L. 2003. "Force field influence on the observation of pi-helical protein structures in molecular dynamics simulations", *J Phys Chem B*, 107, 2831–36.

Foloppe, N., Mackerell, A.D. 2000. "All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: I. Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data", *J of Comput Chem*, 21(2), 86-104.

Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S. 2004. "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy", 47(7), 1739-49.

Gatica, E.A., Cavasotto, C.N. 2012. "Ligand and Decoy Sets for Docking to G Protein-Coupled Receptors", *Chem Inf Model*, 52, 1–6.

Gesty-Palmer, D. Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C.D., Wang, S., Eckhardt, A.E., Cowan, C.L., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. 2006. "Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation", *J Biol Chem*, 281, 10856–64.



Gohlke, H., Hendlich, M., Klebe, G. 2000. "Knowledge-based scoring-function to predict protein-ligand interactions", *J Mol Biol*, 295, 337-56.

Gouldson, P.R., Winn, P.J., Reynolds, C.A. 1995. "A molecular dynamics approach to receptor mapping: application to the 5HT<sub>3</sub> and beta 2-adrenergic receptors", *J Med Chem*, 38, 4080-6.

Gullingsrud, J.R., Braun, R., Schulten, K. 1999. "Reconstructing Potentials of Mean Force through Time Series Analysis of Steered Molecular Dynamics Simulations", *Journal Of Computational Physics*, 151(1), 190-211.

Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.P., Chien, E.Y., Velasquez, J., Kuhn, P., Stevens, RC. 2008. "A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor", *Structure*, 16(6), 897-905.

Heringa, J., Argos, P. 1991. "Side-chain clusters in protein structures and their role in protein folding", *J of Mol Biol*, 220, 151-71.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. 1996. "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J Mol Graph*, 14, 33-8.

Jones, G., Willett, P., Glen, R.C. Leach, A.R., Taylor, R. 1997. "Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking" *J Mol Biol*, 267, 727-48.

Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L. 1983. "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water", *J Chem Phys*, 79, 926-35.

Kahsai, A.W., Xiao, K., Rajagopal, S., Ahn, S., Shukla, A.K., Sun, J., Oas, T.G., Lefkowitz, R.G. 2011. "Multiple ligand-specific conformations of the β<sub>2</sub>-adrenergic receptor", *Nat Chem Biol.*, 7(10), 692-700.

Katritch, V., Reynolds, K.A., Cherezov, V., Hanson, M.A., Roth, C.B., Yeager, M., Abagyan, R. 2009. "Analysis of Full and Partial Agonists Binding to Beta<sub>2</sub>-adrenergic Receptor Suggests a Role of Transmembrane Helix V in Agonist-Specific Conformational Changes", *J. Mol. Recognit.*, 22, 307-18.

Kenakin, T. 2007. "Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors", *Trends Pharmacol. Sci.*, 28, 407-15.

Kim, T.H., Chung, K.Y., Manglik, A., Hansen, A.L., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Shaw, D.E., Kobilka, B.K., Prosser, R.S. 2013. "The Role of Ligands on the Equilibria Between

Functional States of a G Protein-Coupled Receptor”, *J Am Chem Soc*, 135, 9465-74.

Kolb, P., Rosenbaum, D.M., Irwin, J.J., Fung, J.J., Kobilka, B.K., Shoichet, B.K. 2009. “Structure-based Discovery of Beta2-adrenergic Receptor Ligands”, *PNAS*, 106, 6843–48.

Kurkcuoglu, O., Turgut, O.T., Cansu, S., Jernigan, R.L., Doruker, P. 2009. “Focused functional dynamics of supramolecules by use of a mixed-resolution elastic network model”, *Biophys J*, 97(4), 1178-287.

Lefkowitz, R.J. Shenoy, S.K. 2005. “Transduction of receptor signals by b-arrestins”, *Science*, 308, 512–17.

Liapakis, G., Ballesteros, J.A., Papachristou, S., Chan, W.C., Chen, X., Javitch, J.A. 2000. “The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor”, *J Biol Chem*, 275, 37779–88.

Liu, J.J., Horst, R., Katritch, V., Stevens, R.C., Wüthrich, K. “Biased Signaling Pathways in  $\beta$ 2-adrenergic Receptor Characterized by  $^{19}\text{F}$ -NMR”. 2012. *Science*, 335, 1106–10.

Luttrell, L.M. 2005. “Composition and function of G protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity”, *J Mol Neurosci*, 26, 253–63.

Mackerell, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M. 1992. “Self-consistent parameterization of biomolecules for molecular modeling and condensed phase simulations”, *Faseb Journal*, 6(1), A143–A143.

Mackerell, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M. 1998. “All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins”, *J Phys Chem B*, 102, 3586–616.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J. 2009. “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility”, *J Comput Chem*, 30, 2785-91.

Narayanan, E., John, B., Mirkovic, N., Fiser, A., Ilyin, V.A., Pieper, U., Stuart, A.C., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Yerkovich, B., Sali, A. 2003. “Tools for comparative protein structure modeling and analysis”, *Nucleic Acids Res*, 31, 3375–80.

Niesen, M.J., Bhattacharya, S., Vaidehi, N. 2011. "The Role of Conformational Ensembles in Ligand Recognition in G-Protein Coupled Receptors", *J Am Chem Soc*, 133, 13197-204.

Okuda, A., Matsumoto, O., Akaji, M., Taga, T., Ohkudo, T., Kobayashi, Y. 2002. "Solution structure of intracellular signal-transducing peptide derived from human  $\beta$ -adrenergic receptor", *Biochem Biophys Res Commun*. 291, 1297-1301.

Okuno, Y., Yang, J., Taneishi, K., Yabuuchi, H., Tsujimoto, G. 2006. "GLIDA: GPCR-ligand database for chemical genomic drug discovery", *Nucleic Acids Res*, 34, D673-7.

Ozcan, O., Uyar, A., Doruker, P., Akten, E.D., 2013. "Effect of intracellular loop 3 on intrinsic dynamics of human  $\beta$ 2 adrenergic receptor". *BMC Struct Biol*, 13(29), 1-16.

Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K.J. 2005. "Scalable Molecular Dynamics with NAMD", *J of Comput Chem*, 26(16), 1781-1802.

Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I., Kobilka, B.K. 2007. "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein- coupled receptor", *Nature*, 450, 383-7.

Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K. 2011. "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex", *Nature*, 477, 549-55.

Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., DeVree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R.K., Gellman, S.H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W.I., Kobilka, B.K. 2011. "Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta2 adrenoceptor", *Nature*, 469, 175-80.

Reynolds, K.A., Katritch, V., Abagyan, R. 2009. "Identifying Conformational Changes of the Beta2 Adrenoceptor that Enable Accurate Prediction of Ligand/Receptor Interactions and Screening for GPCR Modulators", *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 23, 273-88.

Sabio, M., Jones, K., Topiol, S. 2008. "Use of the X-ray Structure of the Beta2-adrenergic Receptor for Drug Discovery. Part 2: Identification of Active Compounds", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 5391-95.

Samama, P., Pei, G., Costa, T., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J. 1994. "Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta2-adrenergic receptor", *Mol Pharm*, 45, 390-4.

Sato, T., Kobayashi, H., Nagao, T., Kurose, H. 1999. "Ser203 as well as Ser204 and Ser207 in fifth transmembrane domain of the human beta2-adrenoceptor contributes to agonist binding and receptor activation", *Br J Pharmacol*, 128, 272–4.

Shih, Y.K., Parthasarathy, S. 2012. "A single source k-shortest paths algorithm to infer regulatory pathways in a gene network", *Bioinformatics*; 28 ISMB, i49–i58.

Terrillon, S., Bouvier, M. 2004. "Receptor activity-independent recruitment of b-arrestin reveals specific signaling modes", *EMBO J.* 23, 3950–61.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.

Topiol, S., Sabio, M. 2008. "Use of the X-ray Structure of the Beta2-adrenergic Receptor for Drug Discovery", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 1598-602.

Violin, J.D., Lefkowitz, R.J. 2007. "β-Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors", *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 416-22.

Wacker, D., Fenalti, G., Brown, M.A., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Stevens, R.C. 2010. "Conserved binding mode of human beta2 adrenergic receptor inverse agonists and antagonist revealed by X-ray crystallography", *J Am Chem Soc*, 132(33), 11443-5.

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. 2003. "Independent beta-arrestin 2 and G-protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal regulated kinases 1 and 2", *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10782–7.

Weiss, D. R., Ahn, S., Sassano, M. F., Kleist, A., Zhu, X., Strachan, R. 2013. "Conformation guides molecular efficacy in docking screens of activated beta- 2 adrenergic G protein coupled receptor", *ACS Chem. Biol.*, 8, 1018–26.

West, G.M., Chien, E.Y., Katritch, V., Gatchalian, J., Chalmers, M.J., Stevens, R.C., Griffin, P.R. 2011. "Ligand-dependent perturbation of the conformational ensemble for the GPCR β2 adrenergic receptor revealed by HDX", *Structure*. 19(10), 1424-32.

Wieland, K., Zuurmond, H.M., Krasel, C., Ijzerman, A.P., Lohse, M.J. 1996. "Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor", *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9276–81.

Yen, J.Y. 1971. "Finding the k shortest loopless paths in a network", *Management Science*, 17, 712-16.

Zocher, M., Zhang, C., Rasmussen, S.G.F., Kobilka, B.K., Müller, D.J. 2012. "Cholesterol Increases Kinetic, Energetic, and Mechanical Stability of the Human Beta2-adrenergic

Receptor”, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A ., E3463-E3472.

Koroglu, A., Akten, E.D. 2015. “Transmembrane helix 6 observed at the interface of  $\beta_2$ AR homodimers in blind docking studies”, 33(7), 1503-1515.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. EBRU DEMET AKDOĞAN
Proje No:	213M544
Proje Başlığı:	β2 Adrenerjik Reseptöründe Aktif Ve İnaktif Hallere Geçişlerdeki Allosterik Mekanizmanın Araştırılması Ve İlaç Tasarım Çalışmalarında Uygulaması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	PEMRA DORUKER TURGUT
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	KADİR HAS Ü. MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ F. BİYOENFORMATİK VE GENETİK MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2014 - 01/10/2016
Onaylanan Bütçe:	219992.0
Harcanan Bütçe:	150002.09
Öz:	<p>Önemli bir hücre zarı proteini olan β2-adrenerjik reseptörü (kısaca β2-AR), G protein bağlantılı reseptör (GPCR) üstfamilyasından olup, farklı sinyal aktarım yollarında başlangıç konumundadır. Lipid hücre zarı içine gömülü yedi sarmal ve, hücre içi ve dışına bakan loop bölgelerden oluşan tersiyer yapısı, reseptörde sinyal başlatımı için gerekli konformasyonel esnekliği sağlamaktadır. İnsana ait β2-AR'ın üç boyutlu yapısı 2007'den bu yana bir çok defa hem aktif, hem de inaktif hallerindeyken ortaya çıkartılmış olmasına rağmen, konformasyonel çeşitliliği gösteren ara yapılar ve allosterik mekanizma tam olarak çözülememiştir. Diğer tarafta, hücre içine bakan ve proteinin dinamik karakterini önemli ölçüde etkileyen 32 rezidüel bir loop bölgesi olan ICL3 hiç bir deneysel ve simülasyon çalışmasında dikkate alınmamıştır. Bu çalışmanın en temel hedefi, hücre içi ve hücre dışına bakan bölgeler arasındaki allosterik etkileşimi bu son derece önemli ICL3 bölgesiyle beraber ortaya çıkartmak ve aktif/inaktif geçişlerdeki ara halleri belirleyerek ilaç tarama çalışmalarında daha etkin olacak reseptör yapıları belirlemektir.</p> <p>Bu projede toplam 4 mikrosaniyeyi bulan 9 farklı Moleküler Dinamik simülasyonu (NAMD) gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda, ICL3 bölgesinin reseptörün alt kısmında kapalı olduğu inaktif yapının son derece kararlı olduğu, bunun da ICL3 ile beşinci ve altıncı transmembran heliksler (TM5 ve TM6) arasındaki çok sayıda hidrojen bağı sayesinde gerçekleştiği ortaya çıkartılmıştır. Bunun yanı sıra, reseptörün hücre dışına yakın olan ligant bağlama bölgesinde yer alan çok sayıda kritik rezidüel arasına belirli derecelerde uzaklık kısıtlamaları getirilmiştir. Bu kısıtlamaların, reseptörün ICL3'ü de içine alan hücre içine bakan alt bölgesini ciddi biçimde etkilediği, bunun da allosterik etkileşimler sonucunda gerçekleştiği görülmüştür. 4 mikrosaniye gibi bir veri kaynağı kullanılarak, sadece ligant bağlama bölgesindeki rezidüle göre yapılan bir kümeleme yöntemiyle, reseptörün birbirinden çok farklı konformasyonları elde edilmiştir. Elde edilen her konformasyon, ligant bağlama bölgesi için değişik ara halleri temsil etmektedir. Küçük çapta bir veri bankası kullanılarak yapılan taramalar sonucunda, konformasyonlardan bazılarının bilinen kristal yapılardan çok daha seçici olduğu gösterilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	β2-adrenerjik reseptörü, GPCR, allosterik mekanizma, Moleküler Dinamik simülasyonu, ICL3 loop bölgesi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Proje Yapılan Yayınlar:	<ol style="list-style-type: none"><li>1- Conformational Transitions of <math>\beta</math>2-AR using Targeted Coarse-grained Simulations (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),</li><li>2- Constrained MD to Investigate the Allosteric Mechanism of Human <math>\beta</math>2-adrenergic Receptor (<math>\beta</math>2-AR) (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</li><li>3- Constrained MD to Investigate the Allosteric Mechanism of Human <math>\beta</math>2-adrenergic Receptor (<math>\beta</math>2-AR) (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</li><li>4- Discovery of High-Affinity Ligands for <math>\beta</math>2-adrenergic receptor (<math>\beta</math>2AR) via Pharmacophore-Based High Throughput Virtual Screening and Docking (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</li><li>5- INVESTIGATION OF ALLOSTERIC COUPLING IN BETA-2 ADRENERGIC RECEPTOR THROUGH MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</li><li>6- Investigation of allosteric coupling in human beta(2)-adrenergic receptor in the presence of intracellular loop 3 (Makale - İndekli Makale),</li><li>7- CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF PROTEINS USING MULTI-SCALE MODELING APPROACHES (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Doktora Tezi),</li><li>8- CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF PROTEINS USING MULTI-SCALE MODELING APPROACHES (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Doktora Tezi),</li></ol>
-------------------------	--

TÜBİTAK