

**Beta-2 Adrenerjik Reseptör Proteinin Dinamik Yapısının
Araştırılması ve Bilgisayar Destekli
İlaç Tasarımındaki Önemi**

Proje No: 109M281

Yrd. Doç. Dr. E. Demet Akdoğan
Prof. Dr. Pemra Doruker

Aralık 2012
İstanbul

ÖNSÖZ:

Bu projede çalışılan biyolojik sistem, bir hücre zarı reseptörü olan β_2 -adrenerjik reseptörüdür. Bilgisayar üzerinde gerçekleştirilen simülasyon ve modelleme çalışmaları yardımıyla proteinin dinamik yapısı hakkında önemli bulgular elde edilmiştir. Ayrıca, yeni ilaç moleküllerinin keşfedilmesi için daha güvenilir sonuçlar verecek reseptörün yeni konformasyonları ortaya çıkartılmıştır.

TÜBİTAK 1001 destekli 109M281 no'lu bu proje, Kadir Has Üniversite bünyesi altında, Boğaziçi Üniversitesi ile işbirliği çerçevesinde 15 Kasım 2009 - 15 Kasım 2012 tarihleri arasında yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER:

Önsöz	2
Tablo Listesi	5
Şekil Listesi	6
Özet	10
Abstract	11
1. Giriş	12
2. Genel Bilgiler	13
3. Gereç ve Yöntem	15
3.1. İkinci iş paketi: Reseptör ve çevre moleküllerden oluşan sistemin atomistik modelinin kurulması	15
3.2. Üçüncü iş paketi: MD simülasyonun atomistik model için koşturulması	18
3.3. Beşinci iş paketi: ANM elastik ağ modelinin oluşturulması	18
3.4. Altıncı iş paketi: Docking için sistemin kurulması	19
3.5. Sekizinci iş paketi: Reseptörün dimerik yapı tahmini için docking çalışmaları	22
3.5.1. Kısa peptid docking deneyleri	22
3.5.2. Uzun peptid docking deneyleri	23
3.5.3. Monomer-Monomer Docking Deneyleri	23
3.6. Dokuzuncu iş paketi: sanal tarama prosedürü	26
3.7. Onuncu iş paketi: Reseptörün “Rezidü Tabanlı Kaba Taneli” modelinin oluşturulması ve MD simülasyonu için sistemin hazırlanması	28
4. Bulgular	30
4.1. Dördüncü iş paketi: MD simülasyon analizi ve gidişizinden konformasyonların tayini	30
4.1.1. MD gidişizinde yeni bir “ultra inaktif” yapının ortaya çıkması	30
4.1.2. Arg131 ile Glu268 arasındaki iyonik bağ moleküler bir anahtar değildir	36
4.1.3. Temel dinamik (Essential dynamics) analizi “ultra inaktif” yapıya geçişi ilk temel mod’da göstermektedir	37
4.1.4. MD gidişizinden alınan görüntülerin kümelenmesi	37
4.2. Beşinci iş paketine ait çalışma: ANM ile normal mod analizi	42
4.2.1. Örtüşüm Matrisi (Overlap Matrix)	46
4.2.2. Yönelimsel Çapraz Korelasyon Haritaları	49

4.3. Yedinci iş paketine ait çalışma: Docking sonuçlarının analizi	50
4.3.1. Antagonist'ler için docking sonuçları	50
4.3.2. Agonist'ler için docking sonuçları	52
4.4. Sekizinci iş paketine ait çalışma: Reseptörün dimerik yapısının oluşturulması ve benzer yöntemlerin uygulanması	55
4.4.1. Kristalografik homodimerik yapıya uygulanan ANM analizi	55
4.4.2. β_2 AR dimerik yapı tahmini	59
4.4.2.1. TMVI'dan modellenen kısa peptit docking sonuçları	59
4.4.2.2. Her bir TM bölgesinden modellenen uzun peptit sonuçları	61
4.4.2.3. ZDOCK ile protein-protein docking sonuçları	62
4.5. Dokuzuncu iş paketine ait çalışma: sanal tarama ve analiz	66
4.6. Onuncu iş paketine ait çalışma: Reseptörün "Rezidü Tabanlı Kaba Taneli" Moleküler Dinamik simülasyonu ve analizi	68
5. Tartışma/Sonuç	71
6. Referanslar	73

TABLO LİSTESİ:

Tablo 1. Her bir model için proteinin, hücre zarının ve sistemin boyutları

Tablo 2. Protein, lipid ve su molekülleri için her iki modeldeki toplam atom sayısı

Tablo 3. Dört inaktif kristal yapının AutoDock ile docking sonuçları

Tablo 4. β_2 AR'ın farklı konformasyonları ve kısıtlı bölgeler için yapılan docking deneyleri

Tablo 5. TM6'dan modellenen (276-296 arası rezidüleri) kısa peptit için docking sonuçları

Tablo 6. Transmembran bölgelerden modellenen uzun peptitler için docking sonuçları

Tablo 7. Farmakofor taramasını ve bağlanma kriterlerini geçen 32 agonist (kırmızı) ve 42 antagonist (mavi)

ŞEKİL LİSTESİ:

Şekil 1. β_2 -AR'ün (a) “düğüm” (ICL3 magenta renkte) ve (b) “kırpık” modelleri. Peptid bağı Leu230 ve Lys263 rezidülerine ait C ve N atomları arasında olup sırasıyla yeşil ve turuncu küreler ile gösterilmiştir

Şekil 2. β_2 -AR'ün (a) ana bileşeniyle hücre zarına dik olan z eksenini arasındaki açı 6° dir (b) kristal yapıdaki (2RH1) su molekülleri (c) hücre zarı ve su moleküllerinden oluşan sistem x yönündeki periyodik imajı ile birlikte gösterilmiştir (lipid moleküllerin polar başları sarı, su molekülleri mavi, protein macenta, lipid hidrokarbon uçlar pembe ile resmedilmiştir)

Şekil 3. (a) dopamine, (b) norepinephrine (6) (c) epinephrine (6) (d) isoproterenol (7) (e) salbutamol (8) (f) P0G (8) (g) salmeterol (19) and three antagonists (h) ICI ($C_{17}H_{27}NO_2$) (7) (i) alprenolol ($C_{15}H_{23}NO_2$) (9) and (j) novel antagonist ($C_{18}H_{25}NO_5$) (10) *ethyl 4-((2S)-2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propyl}oxy)-3-methyl-1-benzofuran-2-carboxylate*

Şekil 4. β_2 AR monomeri (a) 0.45 Å aralıklı büyük grid kutusu (b) 0.375 Å aralıklı dört farklı çakışan küçük grid kutuları

Şekil 5. Protein-Protein Docking sonucu elde edilen dimerik yapıların analizi için izlenen yöntemin akış grafiği

Şekil 6. Sanal tarama için oluşturulan farmakofor model. “excluded volume” (gri), hidrofobik (sarı), H-bağ alıcısı (kırmızı ok), H-bağ vericisi (yeşil ok), polarize bölge (mavi çubuklar).

Şekil 7. Protein, lipid, su ve iyon moleküllerinden oluşan sistemin (a) atomistik ve (b) basitleştirilmiş kaba taneli CG model ile gösterimi

Şekil 8. “Düğüm” ve “kırpık” model için (a,b) RMSD ve (c) RMSF profilleri. RMSD profilleri reseptörün farklı bölgelerine göre hesaplanmıştır. Core: ICL3 dışında kalan bölge. TMEMB: hücre içine gömülü sarmallar. RMSF profili “düğüm” model için iki farklı zaman dilimi için hesaplanmıştır, tüm 1 μ s’lik ve son 300 ns’lik evre

Şekil 9. (a) TM6 alt bölgesinin aktif ve inaktif yapılar göre RMSD değişimi (b) TM6’nın aktif (pembe), inaktif (mor), MD t=0 (mavi) ve t=1000ns (sarı) anındaki konformasyon görüntüleri (c) ICL3 ve “çekirdek” bölge ağırlık merkezleri arasındaki fark (xy düzleminde)

Şekil 10. (a) Ser207-Asp113 uzaklık değişimi (b) Değişimden önce (mavi) ve sonraki (pembe) durum. TM6 alt kısmın aktif hale göre RMSD’si ve Ser207-Asp113 uzaklık arasındaki korelasyonun (c) “düğüm” ve (d) “kırpık” modeldeki halleri

Şekil 11. Ser203-Asp113 uzaklık değerinin üç adet 100’er ns’lik ve bir adet 1 μ s’lik simülasyon boyunca değişim grafiği

Şekil 12. ICL2 ve TM6 alt kısmın (a) “düğüm” ve (b) “kırpık” modelde aktif hale göre RMSD değerleri, (c) ICL2’nin (solda), ICL3 (sağda) ile birlikte hücre içinden görüntüsü. Şekil 11a’daki ilk evre lacivert, ikinci evre mavi, son evre kırmızı ile gösterilmiştir

Şekil 13. TM3’teki Arg131 ile TM6’daki Glu268 rezidüleri arasındaki iyonik bağın uzunluğu

(a) “düğüm” ve (b) “kırpık” modelde C-alfa (kırmızı) ve yan zincir atomları Arg131-N ve Glu268-O (yeşil) ile gösterilmiştir

Şekil 14. “Düğüm” model için (a) TM6 alt kısmın RMSD profili (b) Ser207-Asp113 uzaklık profili (c) RMSD ile uzaklık arasındaki korelasyon haritası, original gidişizi (mavi), ilk beş modun toplamına (yeşil) ve ilk moda (kırmızı) olan izdüşümden elde edilen gidişizlerinden elde edilmiştir (d) TM6 alt kısmın ilk mod yönündeki hareketi

Şekil 15. “Kırpık” model için (a) TM6 alt kısmın RMSD profili (b) Ser207-Asp113 uzaklık profili (c) RMSD ile uzaklık arasındaki korelasyon haritası, original gidişizi (mavi), ilk beş modun toplamına (yeşil) ve ilk moda (kırmızı) olan izdüşümden elde edilen gidişizlerinden elde edilmiştir (d) TM6 alt kısmın ilk mod yönündeki hareketi

Şekil 16. Reseptör bölgenin dört farklı bölgesinin RMSD değerine göre “düğüm” ve “kırpık” modellerin 1’er μ s’lik ve “düğüm” modelin 100’er ns’lik üç farklı simülasyon gidişizinden elde edilen konformasyonların kümelenme profilleri

Şekil 17. ECL2 bölgesinin hücre dışından dört farklı küme için görüntüleri

Şekil 18. “Düğüm” (looped, kırmızı) model ve “kırpık” (clipped, mavi) model için ANM modeliyle ve deneysel yöntemlerle hesaplanmış (3D4S-Exp, isyah) β faktörlerin karşılaştırmalı grafiği (b) “Kırpık” model için (a)’daki en hareketli iç bölgelerin (2-7) protein üzerindeki konumları

Şekil 19. Her iki model için normalize edilmiş (a) toplam ilk 10 yavaş mod için MSF (\AA) profili. (b) “düğüm” model için 5-14 arası, “kırpık” model için 1-10 arası yavaş mod alınmıştır.

Şekil 20. Her iki model için normalize edilmiş toplam ilk 20 hızlı mod için MSF (\AA^2) profili. (Kırpık=Clipped; Düğüm=Looped) (a) Asp130, Arg131, Glu268 ve Phe282 (b) Leu272, Gly276, Gly280, ve Leu284

Şekil 21. “Kırpık” (Clipped) ve “Düğüm” (Looped) modellerin yavaş modları arasındaki örtüşme matrisi. 0-1 değerleri, beyazdan siyaha doğru değişen ara gri tonlarıyla gösterilmiştir

Şekil 22. Her iki model için farklı modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 1. yavaş mod (b) “Düğüm” model 5. yavaş mod

Şekil 23. Her iki model için farklı modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 3. yavaş mod (b) “Düğüm” model 8. yavaş mod

Şekil 24. “Düğüm” modelde olup “kırpık” modelde benzeri olmayan ilk 4 yavaş mod

Şekil 25. Toplam on mod için korelasyon haritası. (a) “Kırpık” model için ilk on mod, (b) “düğüm” model için ilk on mod (c) “Düğüm” model için 5-14 arası (d) Şekil 25a ve Şekil 25c’deki korelasyon haritaları arasındaki fark

Şekil 26. Docking uygulanan reseptörün açık (mavi) ve kapalı (sarı) konformasyonları. Sağdaki Ser207 ve soldaki Asp113 rezidüleri bilya-sopa (ball and stick) şeklinde gösterilmiştir

Şekil 27. Antagonist molekül ICI için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. Her şekilde gösterilen mavi renkteki ICI molekülü 3NY8'teki bilinen doğal hali. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)

Şekil 28. Antagonist molekül alprenolol için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. Her şekilde gösterilen mavi renkteki ICI molekülü 3NY8'teki bilinen doğal hali. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)

Şekil 29. Agonist molekül POG için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. Her şekilde gösterilen mavi renkteki ICI molekülü 3NY8'teki bilinen doğal hali. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)

Şekil 30. Agonist molekül epinephrine için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)

Şekil 31. (a,b) Epinephrine ve (c,d) ICI moleküllerinin olası aktif ve inaktif hallere dock edilmiş konumlarının hücre dışından ve yandan görüntüleri verilmiştir.

Şekil 32. β_2 AR reseptörünün kristalografik çalışmalardan elde edilen dimerik yapısı (a) "kırpık" ve (b) "düğüm" model için verilmiştir

Şekil 33. "Düğüm" ve "kırpık" model dimer yapılar için yavaş modlar arasındaki örtüşme matrisi. 0-1 değerleri, beyazdan siyaha doğru değişen ara gri tonlarıyla gösterilmiştir.

Şekil 34. Her iki model için belirli modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) "Kırpık model, 1. yavaş mod (b) "Düğüm" model 1. yavaş mod

Şekil 35. Her iki model için belirli modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) "Kırpık model, 2. yavaş mod (b) "Düğüm" model 2. yavaş mod

Şekil 36. Her iki model için belirli modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) "Kırpık model, 3. yavaş mod (b) "Düğüm" model 7. yavaş mod

Şekil 37. (a) Düğüm ve (b) Kırpık model için dimerik yapıdaki monomer ile serbest haldeki monomerin ilk20 yavaş mod'u arasındaki örtüşme değerleri.

Şekil 38. (a,b) birinci ve (c,d) en kalabalık kümeden seçilen konformasyonların (sırasıyla, yeşil ve turuncu renkte) reseptör üzerindeki konumları ve etkileştikleri rezidüler. TM6 kırmızı renkte gösterilmiştir.

Şekil 39. TM6'dan elde edilen peptitin (a) en yüksek skorlu (mavi) ve (b) en kalabalık kümeden (magenta) elde edilen konformasyonları. Reseptördeki TM6 kırmızı renkte gösterilmiştir.

Şekil 40. (a) paralel ve (b) antiparalel yöndeki monomerlerden oluşan dimerik yapılar için

küme profilleri. İnterfaz bölgesinde TM6'nın olup olmasına göre renklendirilmiştir. Kırmızı: her iki monomerin TM6'sı interfazda, turuncu: tek monomerin TM6'sı interfazda, mavi: hiç bir monomerin TM6'sı interfazda olmadığı durum.

Şekil 41. En kalabalık kümelerden seçilen paralel ve antiparalel dimer yapıların (a,c) konumları ve (b,d) her bir rezidü için $dSASA_i$ değerleri. TM6 kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Şekil 42. 47 adet paralel ve 102 adet antiparalel dimer yapı için Z-rank skor değerleri.

Şekil 43. Seçilen farmakofor modeli ile yapılan tarama sonucunda elde edilen ROC eğrisi. 117 molekülden 82'si hit olarak geri dönmüştür.

Şekil 44. CG-MD simülasyonu boyunca başlangıç konformasyonuna göre üç farklı bölge için hesaplanan RMSD profilleri. (All: tüm yapı, Core: ICL3 dışında kalan ve ICL3)

Şekil 45. (a) CG ve Atomistik (FAL) simülasyonlara ait RMSF profilleri (b) RMSF profilindeki tepe noktaların üç boyutlu yapı üzerindeki konumları

Şekil 46. Atomistik (FAL, FAS1, FAS2, FAS3) ve tersine gönderimli atomistik konformasyonların (RM1, RM2, RM3, RM4), farklı reseptör bölgelerine göre kümelenmesi. (a) ICL3 dışında kalan 'core' (b) transmembran (c) bağlanma ve (d) ICL3 bölgeleri.

Şekil 47. 2RH1 (gri) ile tersine gönderimli atomistik konformasyonlardan birinin (RM4, kırmızı) üstüste çakıştırılmış görüntüsü, RMSD değerleri ile birlikte verilmiştir.

Şekil 48. 2RH1 (gri) ile üstüste görüntüleri verilmiş beş farklı atomistik konformasyon.

ÖZET:

Bu projede β_2 -adrenerjik reseptörün (β_2 -AR) dinamik yapısı 1 μ s'lik bir Moleküler Dinamik simülasyonuna tabii tutulmuş ve şimdiye kadar deneysel yöntemlerle kristalize edilmiş yapılarda gözlemlenmemiş oldukça farklı bir konformasyonu ortaya çıkartılmıştır. Bu yapı reseptörün “çok inaktif” diye adlandırdığımız G proteine bağlandığı hücre içine bakan bölgesinin tamamen kapalı, hücre dışına bakan bağlanma kavitesinin açık ve geniş olduğu bir konformasyondur.

Bir diğer bulgu da, şimdiye kadar herhangi bir yöntemle etkisi araştırılmamış reseptördeki ICL3 düğüm bölgesinin reseptörün dinamiğine olan etkisidir. Bu bölgenin etkisini göstermek amacıyla, reseptörün ICL3 bölgesi kesilerek doğada olmayan bir modeli oluşturulmuş ve benzer şekilde 1 μ s'lik Moleküler Dinamik simülasyonuna tabii tutulmuştur. Bunun sonucunda ICL3'süz model ICL3'lü modelden oldukça farklı bir dinamik yapı sergilemiştir.

Bu farklı dinamik yapı, anizotropik elastik ağ modeli (ANM) ile analiz edilmiş ve ICL3'ün reseptöre farklı bir kolektif hareket kazandırdığı gösterilmiştir. Bu kolektif harekette, reseptörün hücre içine bakan kısmındaki ICL3 ile reseptörün hücre dışına bakan ve sinyal moleküllerin bağlandığı bağlanma kavitesinin birbiriyle bağlantılı hareket ettiği ortaya çıkmıştır.

Simülasyon boyunca elde edilen farklı konformasyonlar reseptörün bilinen inaktif yapısının dışına çıkıp aktif bir yapı sergileyememiştir. Ayrıca bu konformasyonların hem agonist'lere hem de antagonist'lere benzer şekilde bağlandıkları, diğer bir deyişle seçici olmadıkları docking çalışmaları ile gösterilmiştir.

β_2 -adrenerjik reseptörleri doğada homodimer, ve hatta oligomer yapılar içinde buldukları deneysel yöntemlerle gösterilmiş, ancak bir araya geldiklerinde hangi bölgeleriyle etkileşim içine girdikleri hakkında kesin bir sonuç elde edilememiştir. Bu çalışmada, iki β_2 -AR monomer yapı birbirlerine dock edilmiş ve monomerlerin altıncı heliks bölgelerinden birbirlerine bağlanmayı diğer bölgelere tercih ettikleri gösterilmiştir. Bu sonuç daha önce yapılmış deneysel bir çalışma ile de örtüşmektedir.

Anahtar kelimeler: Docking, Moleküler Dinamik, ICL3, β_2 -adrenerjik reseptörü

ABSTRACT:

In this project, a 1 μ s long Molecular Dynamics simulation was performed on β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) in order to investigate its dynamic structure. A novel conformational state of the receptor, which was not observed in any crystallographic form, was discovered. In this new state called as “very inactive”, the intracellular region of the receptor that interacts with G protein was narrow and completely blocked, while the extracellular binding site region was wide open.

Another important finding was the effect of intracellular loop 3 (ICL3) on the receptor’s dynamics, which was not reported in any experimental or simulation work, before. For that purpose, a new model of the receptor called as “clipped” model was constructed and subjected to a 1 μ s long Molecular Dynamics simulation. In this new model, the ICL3 region was removed and the two open ends were covalently bonded. The simulation results showed a completely different dynamics of the receptor when ICL3 was missing.

The distinct dynamics of the receptor was also revealed by anisotropic network model (ANM) analysis and it was shown that the presence of ICL3 brought a different collective motion to the receptor. The collectivity existed between the intracellular side (lower part) represented by the motion of ICL3 and the extracellular side (upper part), which consists of the binding cavity for signaling molecules. When the upper part of the receptor widened, the lower part became narrower, and vice versa, as in a pair of pincers.

The distinct conformations sampled throughout the simulation could not escape from the inactive state in order to make a transition to the experimentally known active state of the receptor where the intracellular part is wide open to provide a binding cavity for G protein. In addition, docking calculations showed that these conformers did not possess any specificity for antagonists, as they can bind strongly to agonists as well as to antagonists.

Experimentally, it was determined that β_2 -adrenergic receptors also exist in nature in homodimeric form, and even oligomeric form. However, no conclusive results were obtained about the interfacial region at which these receptors come into contact. In this study, two β_2 -AR monomers have been docked to each other and it was shown that monomers prefer to interact with each other on the transmembrane region 6 (TM6). This result agrees well with a previously reported experimental finding.

Keywords: Docking, Molecular Dynamics, ICL3, β_2 -adrenergic receptor

1. GİRİŞ:

İnsan genomunda en kalabalık hücre zarı protein ailesi olan G protein bağlı reseptörlerin yapısı (GPCR, G protein coupled receptors), yedi adet hücre zarına gömülü transmembran alfa heliks yapılar tarafından karakterize edilmektedir. Hücre dışından gelen sinyal moleküllerin reseptöre bağlanmasının ardından, bir dizi konformasyonel değişim transmembran heliksler aracılığıyla reseptörün hücre içine bakan kısmına iletilir. Bu bölge, reseptörün hetero-trimerik G protein ile etkileşim içine girdiği bölgedir. Hücre dışından gelen sinyal molekül, G proteinin aktif hale geçmesine ve bununla bağlantılı olarak hücre içinde bir dizi kimyasal tepkimenin başlamasına sebep olur. Bağlanan molekülün türüne göre kimyasal tepkimeler farklılık gösterir. Çok farklı mekanizmaların başlangıç noktası olduklarından, GPCR ailesine ait proteinler işleyişlerindeki bir aksama yüzünden çok farklı hastalıklara sebep olabilmektedirler. Dolayısıyla, ilaç endüstrisinde üzerinde en fazla çalışılan reseptörlerden biri haline gelmişlerdir.

Bu projede, daha önceden üzerinde deneysel ya da teorik bir çalışmanın olmadığı bir konu olan ICL3 bölgesinin reseptörün dinamik yapısına olan etkisi ele alınmıştır. ICL3 hücre içine bakan, beşinci ve altıncı heliksler arasında kalan, düzenli bir yapısı olmadığı için “düğüm” olarak adlandırılan bir bölgedir. ICL3, G protein bağlantı bölgesinde adeta bir kapak görevi görmektedir. ICL3’ün reseptörün dinamiğine olan etkisini gösterebilmek amacıyla, iki farklı reseptör modeli oluşturulmuştur. Bunlardan birinde ICL3 bulunurken (“düğüm” model), diğesinde (“kırpık”) yoktur. Her iki model de 1 μ s’lik Moleküler Dinamik simülasyonuna tabii tutulmuştur. Simülasyon gidişizleri, PCA analizi ile incelenmiş ve MD gidişizinden proteinin aktif ve inaktif hallerini temsil eden iki konformasyon seçilerek bilinen agonist ve antagonist’lere dock edilmiştir. MD simülasyon çalışmalarının yanı sıra, Anisotropic Network Model (ANM) ile analizi yapılmış ve iki modeldeki farklılıklar ortaya konmuştur.

β_2 -adrenerjik reseptörü doğada sadece monomerik halde değil, dimerik hatta oligomerik hallerde de bulunmaktadır. Öncelikle doğadakini yansıtmayan kristalografik ortamdaki dimer hali ICL3 ile (“düğüm”) ve ICL3 olmadan (“kırpık”) iki farklı modeli oluşturulmuş ve ANM ile karşılaştırmalı analizi yapılmıştır. Kristalografik ortamdaki dimerik yapıda, transmembran helisklerden birinci ve yedinci sarmallar interfaz bölgesinde bulunmaktadır. Ancak, doğadaki dimerik yapıda reseptörün hangi bölgelerden etkileştiği henüz bilinmemektedir. Bunun için, iki monomer yapı birbirlerine dock edilerek farklı dimerik yapılar oluşturulmuş ve en olası dimerik yapı enerji hesapları ile tespit edilmiştir.

Son olarak, reseptörün rezidü-tabanlı kaba-taneli (residue-based coarse-grained) modeli oluşturulmuş ve 6 μ s’lik MD simülasyonu koşturulmuştur. Seçilen kaba-taneli dört konformasyona “tersine haritalanma” (reverse-mapping) tekniği uygulanarak atomistik modelleri elde edilmiş ve her biri için 100 ns’lik bir kısa MD simülasyonu daha sistemin dengeye ulaşması için koşturulmuştur. Burada amaç, konformasyonel tarama alanını genişleterek reseptörün özellikle bağlanma bölgesi için farklı konformasyonlarını ortaya çıkartmak ve bunu hızlı bir şekilde yapabilmektir. Elde edilen farklı bağlanma bölgeleri, ilaç tasarım çalışmalarında kullanıldığında daha spesifik bağlanan ilaç moleküllerinin ortaya çıkmasına olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER:

Proteinin dinamik yapısı biyolojik işlevini belirleyen içsel bir özelliktir. Önceleri, ligant moleküllerin proteine bağlanmasıyla birlikte proteinde çeşitli konformasyonel değişimlerin tetiklendiği söylenmekte idi (Kohland, 1958 ve Daniel, 2003). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda, bu çeşitli konformasyonel değişimler ligant olmadan da gözlemlenebilmiştir. Diğer bir deyişle, protein liganta bağlı olsa da olmasa da, değişik yapılar içinde bulunabilmektedir (Eisenmesser, 2005 ve Fetler, 2007). Bu içsel özellik, proteinin üç boyutlu yapısında şifrelenmiş olup proteinin işlevsel özelliğinde ve çevre moleküllerle olan etkileşiminde belirleyici rol oynamaktadır.

Çalışılan protein sistemi G protein bağlantılı reseptör (GPCR) ailesinden β_2 -adrenerjik reseptörüdür. Hormonlar ve nörotransmitterler aracılığıyla hücre zarından başlayan sinyal aktarımında, başlangıç sinyalini hücre içine ileten önemli bir hücre zarı proteindir. Hücre zarına gömülü olup, hızlı nabız, göz bebeği büyümesi ve kan damarlarının sıkışması gibi bir çok farklı biyolojik olayı kontrol altında tutar. Agonistleri tarafından uyarıldığında, hücre içinde bitişikte duran G proteinlerini aktif hale getirir. G proteinleri de bu sinyali yakınındaki proteinlere aktararak sinyal aktarım sürecini devam ettirir. Bu mekanizma tüm GPCR proteinleri için aynıdır.

Kristal yapısı ilk belirlenen GPCR, rodopsine aittir (Palczewski, 2000). Bunu 2007'de yayınlanan insana ait inaktif β_2 -adrenerjik reseptörü (β_2 AR) izlemiştir (Cherezov, 2007; Rasmussen, 2007). 2007'den bu yana, β_2 AR'ın farklı inaktif halleri (Rosenbaum, 2011) ve son olarak aktif hali (Rasmussen, 2011) ortaya çıkartılmıştır. Buna rağmen hiç bir model, reseptörün dinamik karakterini tam olarak ortaya koyamamıştır; aktif halden inaktif hale geçiş sırasındaki yapısal değişimler, kolektif hareketler ya da sinyal moleküllerin bağlanmasıyla tetiklenen konformasyonel değişimler gibi. Bu projede gerçekleştirilen Moleküler Dinamik simülasyonları ve ANM analizleri reseptörün farklı konformasyonları ve reseptördeki kolektif hareketleri ortaya çıkartmıştır.

Reseptörün G protein ile etkileşim içine girmesinde önemli bir rolü olan ICL3 bölgesi hem teorik hem de deneysel çalışmalarda göz ardı edilmiştir. Oysa, hücre içinde son derece hareketli bir bölge olup, G proteinin reseptöre bağlanacağı bölgeye geçişi sağlayan bir kapak görevi görmektedir (O'Dowd, 1988 ve Liggett, 1991). Düzenli bir yapısı olmadığından kristalografik deneyler sırasında kesilerek yerine T4 lizozim gibi proteinler ya da nanocisimler eklenerek daha kolay kristalize olması sağlanmaktadır. Floresan spektroskopisi ölçümleri agonist bağlanması sonucu oluşan konformasyonel değişimlerin T4 lizozim kesildikten sonra da reseptörde var olduğunu göstermiştir (Rosenbaum, 2007). Buna rağmen, G protein ile doğrudan etkileşim içinde olması, ICL3 bölgesini aktivasyon/inaktivasyon yolunda önemli bir yere koymaktadır.

Bu projede, ICL3'ün konformasyonel değişimlere olan etkisini araştırmak amacıyla reseptörün iki farklı modeli oluşturulmuştur. Her iki model de reseptörün bilinen inaktif kristal yapısından yola çıkılarak elde edilmiştir. "Düğüm" olarak adlandırılan ilk modelde 230 ve 262 rezidüleri arasında eksik olan ICL3 bölgesi modellenmiş, "kırpık" modelde ise iki uç birbirlerine kovalant bağlarla birleştirilmiştir. "Kırpık" model yakın zamanda gerçekleştirilen simülasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmıştır (Dror, 2009 ve Isin 2012). Her iki model de birer mikrosaniyelik moleküler dinamik simülasyonuna tabii tutulmuştur. Hareketin temel bileşenleri belirlenerek, reseptördeki allosterik bağlaşımlar ortaya

çıkartılmıştır. Simülasyon gidişinden seçilen iki yapıya bilinen bir agonist ve bir antagonist dock edilerek ligand bağlanma mod'ları arasındaki fark gösterilmiştir.

β_2 AR'ların diğer tüm GPCR molekülleri gibi dimerik hatta oligomerik halde aktif hale geçerek işlevlerini gerçekleştirdikleri birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir (Fung, 2009). Reseptörün doğadakini yansıtmayan kristalografik ortamdaki dimer hali (Cherezov, 2007) her iki model için de oluşturulmuş ve benzer şekilde ANM ile incelenerek ICL3'ün dimerik yapının dinamiğine olan etkisi incelenmiştir. Doğadaki dimerik yapının tahmini için peptid-protein ve protein-protein docking çalışmaları yapılmış ve sonuçların hem deneysel (Hebert, 1996) hem de simülasyon (Nemoto, 2005) sonuçlarıyla örtüştüğü gösterilmiştir. Buna göre, altıncı transmembran heliks olası bir interfaz bölgesinde tercih edilen bölge olarak ortaya çıkmaktadır. Hebert ve arkadaşlarının deneysel çalışmalarında, altıncı sarmalın rezidülerinden sentezlenen bir kısa peptidin reseptörün dimerizasyonunu inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Buna sebep olarak peptidin dimer yapının oluşumu için gereken interfaz bölgesini bloke ettiği öne sürülmüştür. Bu doğrultuda, docking çalışmaları öncesi TM6 bölgesinden atomistik modeli oluşturulan bir peptit reseptöre dock edilmiş ve reseptördeki TM6 bölgesini diğer bölgelere tercih ettiği gösterilmiştir. Bir başka modelleme çalışması (Baldwin, 1993) TM6'nın reseptörde hücre zarı ile en fazla temas eden bölgesi olduğunu öne sürmüştür. Tüm bu deneysel ve simülasyon çalışmalarının sonuçları TM6 bölgesinin interfaz bölgesinde olma olasılığını arttırmaktadır.

Reseptörün farklı konformasyonlarını ortaya çıkartmak amacıyla rezidü-tabanlı kaba-taneli (residue-based coarse-grained) bir modeli oluşturulmuş ve MD simülasyonu koşturulmuştur. Burada amaç, reseptörün farklı konformasyonlarını daha hızlı bir şekilde elde edebilmektir. Kristalografik yöntemlerle elde edilen aktif ve inaktif hallerine bakıldığında (Rosenbaum, 2011; Humprey, 1996), özellikle bağlanma bölgesinde oldukça benzer konformasyonlar görülmektedir. Bu durum reseptöre tasarlanacak inhibitor moleküllerin agonistler arasından seçilebilme işini zorlaştırmaktadır. Kullanılan yöntem özellikle bağlanma bölgesinde daha farklı konformasyonların ortaya çıkartılmasını mümkün kıldığı için, ilaç tasarım çalışmalarında kullanılacak daha seçici hedef reseptör modelleri ile aday ilaç moleküllerin tespiti daha güvenilir olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. İkinci iş paketi: Reseptör ve çevre moleküllerden oluşan sistemin atomistik modelinin kurulması

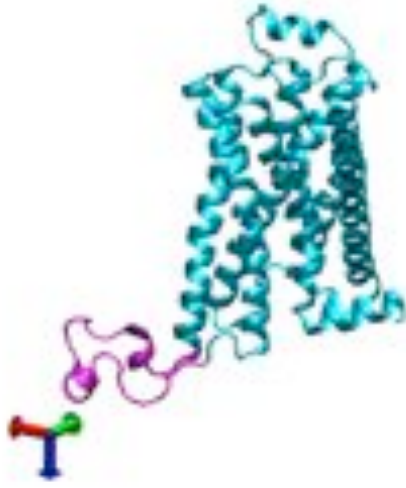
Moleküler Dinamik simülasyonuna tabii tutulacak β_2 -adrenerjik reseptörü (β_2 -AR) için öncelikle, doğada bulunduğu çevre moleküllerle birlikte atomistik bir modeli oluşturulmuştur. β_2 -adrenerjik reseptörü, GPCR (**G**-**P**rotein **C**oupled **R**eceptor) protein ailesinden bir hücre zarı proteindir. İçinde bulunduğu fizyolojik ortamın, proteinin dinamik yapısı üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Bu yüzden, Moleküler Dinamik simülasyon hesaplarına başlamadan önce protein gerçeğe en yakın olacak şekilde lipid hücre zarı ve su molekülleri ile birlikte hazırlanmıştır.

Reseptörün simülasyona tabii tutulan üç boyutlu yapısı Protein Veri Bankası'ndan alınmıştır [PDB kod: 2RH1] (Cherezov, 2007). Bu yapıda proteinin hücre içine bakan üçüncü düğüm bölgesinin (231 ve 262 arasındaki rezidülerden oluşan ICL3) eksik olduğu ve bunun yerine T4 lizozim adlı bir proteinin bağlı olduğu görülmektedir. β_2 -AR'ın son derece esnek olan yapısı ve polar yüzey alanının düşük olmasından dolayı, tek başına kristalize edilmesi mümkün olmamıştır. T4 lizozimin bağlanması sonucu proteinin hareketliliği azalmış ve sistemin toplam polar yüzey alanı artmıştır. Bunun sonucunda kristalleşme işlemi başarıyla gerçekleşmiştir. Bu çalışmada gerçeğe yakın bir β_2 -AR modelleyebilmek için T4 lizozim kaldırılmış ve eksik olan düğüm bölgesi MODWEB (Pieper, 2009) homoloji modelleme yöntemiyle tamamlanmıştır (Şekil 1a).

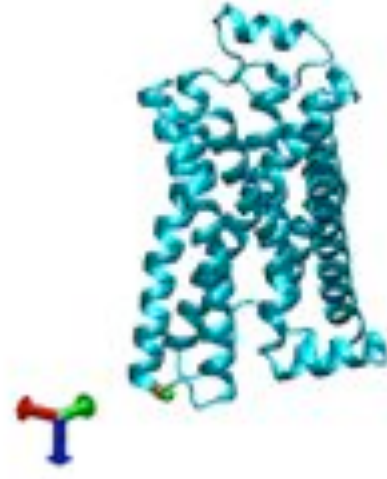
Kullandığımız homoloji yöntemi reseptör için Şekil 1b'de gösterildiği gibi ikinci bir alternatif model oluşturmuştur. Proje için düşündüğümüzün dışında gelişen bu modelde, eksik bölgenin bağlı olduğu iki uçta bulunan Leu230 ile Lys263 rezidüleri peptid bağla birbirlerine bağlanarak eksik olan ICL3 bölgesine ait olan 32 adet rezidü modelden çıkartılmıştır. Çalışmalar boyunca ilk oluşan modeli "düğüm" model, ikinci oluşan modeli ise "kırpık" model olarak adlandırdık ve her iki modelin sonuçlarını karşılaştırarak, ICL3'nin proteinin dinamiğine olan etkisini ortaya çıkartmak istedik.

Simülasyon ortamları, proteinin her iki farklı modeli için de benzer şekilde hazırlanmıştır. Reseptör model, hücre zarı içinde 6° derece eğik bir açıyla duracak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 2a). Bu eğik açı bilgisi teorik hesaplar sonucunda elde edilmiş ve OPM (Orientations of Proteins in Membranes) veribankasına kaydedilmiştir (Lomize, 2006).

Reseptörün iç bölgesindeki su molekülleri 7 sarmalın birbiriyle olan etkileşiminde rol oynayarak, reseptörün dinamiğini, dolayısıyla sinyal aktarımını önemli ölçüde etkilediği düşünülmektedir. Bu yüzden, çalışmalarımızda reseptörün iç bölgesinde kristalografik deneylerle tespit edilmiş 15 adet su molekülü sisteme dahil edilmiştir. Şekil 2b'de gösterildiği gibi su molekülleri kritik iç bölgelerde bulunmakta olup en fazla korunmuş rezidülerle kritik Hidrojen bağları oluşturmaktadır.

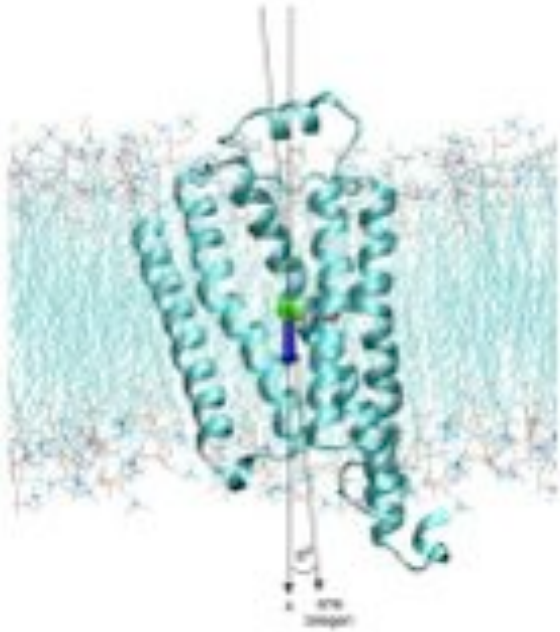


(a)

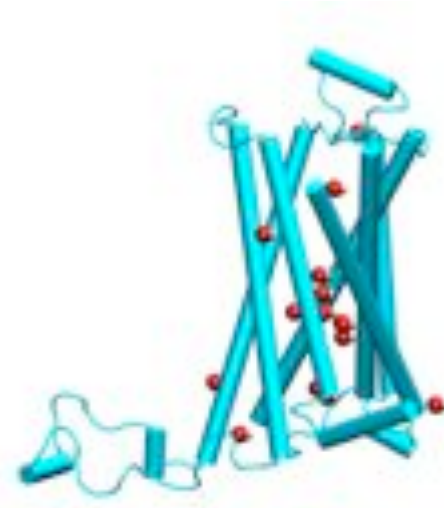


(b)

Şekil 1. β_2 -AR'ün (a) “düğüm” (ICL3 magenta renkte) ve (b) “kırpık” modelleri. Peptid bağı Leu230 ve Lys263 rezidülerine ait C ve N atomları arasında olup sırasıyla yeşil ve turuncu küreler ile gösterilmiştir.

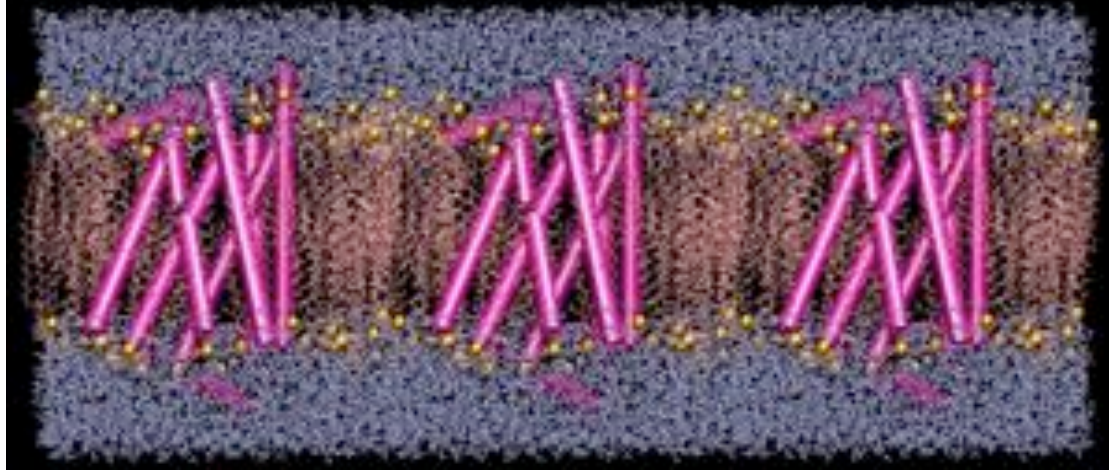


(a)



(b)

Şekil 2. (bir sonraki sayfada devam ediyor)



(c)

Şekil 2. β_2 -AR'ün (a) ana bileşeniyle hücre zarına dik olan z eksenine arasındaki açı 6° dir (b) kristal yapıdaki (2RH1) su molekülleri (c) hücre zarı ve su moleküllerinden oluşan sistem x yönündeki periyodik imajı ile birlikte gösterilmiştir (lipid moleküllerin polar başları sarı, su molekülleri mavi, protein macenta, lipid hidrokarbon uçlar pembe ile resmedilmiştir)

Hücre zarı çift katmanlı bir fosfatidilkolin fosfolipid (POPC) molekülüdür ve VMD'nin Membrane Plugin Version 1.1 programı ile oluşturulmuştur. Hücre zarının boyutları, proteinin boyutlarına göre belirlenmiştir. Protein, hücre zarı içine yerleştirildikten sonra gerçek ortamı simüle etmek amacıyla su molekülleri ile bir çözelti oluşturulmuştur (Şekil 2c). Su molekülleri protein ve hücre zarının z ekseninin her iki yönünde 15 \AA ("kırpık model" için düğüm bölgesi olmadığından 12 \AA) kalınlıkta olacak şekilde eklenir. Proteinin z yönündeki minimum ve maksimum değerleri -33.3 ve 38.0 ise bu yöndeki boyutu yaklaşık 71 \AA 'dur. Her iki yöndeki su kalınlığı toplam 30 \AA olacağından sistemin bu yöndeki boyutu yaklaşık 100 \AA olacaktır. Proteinin her iki modeli için x , y , ve z yönündeki minimum ve maksimum değerleri, yaklaşık boyutları, oluşturulan hücre zarı ve sistemin boyutları Tablo 1'deki gibi verilmiştir.

Sistemin toplam net yükü, VMD'nin Autoionize Version 1.2 programı ile sıfıra eşitlenecek şekilde, konsantrasyonu fizyolojik değer olan 0.154 mol/L 'i geçmeyecek şekilde belirli sayıda iyon Na^+ ve/ya Cl^- eklenmiştir. Bunun sebebi, Moleküler Dinamik simülasyonu sırasında hesaplanan elektrostatik enerji hesapları için kullanılan PME (Particle-Mesh Ewald) toplama yöntemi için sistemin toplam yükünün sıfır olması gerekliliğidir. Eklenen iyonlar, "düğüm" model için 17Na^+ , 24Cl^- , "kırpık" model için 10Na^+ , 14Cl^- olmuştur.

Tablo 1. Her bir model için proteinin, hücre zarının ve sistemin boyutları

Model	Protein x_{\min} / x_{\max}	Protein y_{\min} / y_{\max}	Protein z_{\min} / z_{\max}	Protein xyz	Hücre zarı (xy)	Sistem boyutu (xyz)
Düğüm	-25.4/30.0	-36.0/21.2	-33.3/38.0	56x57x71	86x86	86x86x100
Kırpık	-25.9/20.7	-18.6/20.9	-33.1/32.9	47x39x66	77x69	77x69x90

3.2. Üçüncü iş paketi: Moleküler Dinamik simülasyonun atomistik model için koşturulması

Simülasyon NAMD v2.7 programı ile gerçekleştirilmiştir (Phillips, 2005). Sistemin görüntülenmesi içinse VMD grafik görüntüleme programı kullanılmıştır (Humphrey, 1996). Reseptör, lipid ve sudan oluşan karmaşık sistem dengeye ulaşmak için üç adımdan oluşan bir ön hazırlık evresinden geçirilmiştir. Bu ön evrenin gerçekleştirilmesi için NAMD'nin hücre zarı proteinleri için geliştirildiği prosedür izlenmiştir. Birinci adımda, sadece lipid moleküllerin hareketine izin verilerek 1000 adım minimizasyon ve 0.5 ns'lik MD simülasyon gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, lipid hidrokarbon uçları "eritilerek" hücre zarına daha gerçekçi bir sıvı hal kazandırmıştır. Zira, hücre zarı ilk oluşturulduğunda gerçeği yansıtmayan düzgün sıralanmış lipid moleküllerden oluşmaktadır. İkinci adımda proteinin hareketi kısıtlanarak, hücre zarı ve çevre su molekülleri serbest bırakılmıştır. Birinci aşamadaki gibi sistem bu haliyle 1000 adım minimizasyon ve ardından 0.5 ns'lik bir MD simülasyonuna tabi tutulmuştur. Aşamalı olarak serbest kalan sistemdeki bileşenlerin daha hızlı bir şekilde lokal minimum'a ulaşması sağlanmıştır. Çünkü bir protein ve bir lipid molekülün aynı anda dengeye ulaşması mümkün değildir. Son olarak, üçüncü adımda, sistemdeki tüm bileşenler serbest bırakılarak çevre moleküllerle birlikte 5 ns'lik kısa bir MD simülasyonuna tabi tutularak dengeye ulaşması sağlanmıştır.

Lipid'lerin erimesi, su ve lipid'lerin gevşemesi ve hücre zarı yoğunluğunun deneysel değere göre ayarlanmasından oluşan ayrıntılı bir hazırlık evresinden sonra, her iki model için de 1000 ns'lik (1 μ s) bir Moleküler Dinamik simülasyonu başlatılmıştır. Sistemdeki toplam atom sayısını göz önünde bulundurduğumuzda (Tablo 2), varılmak istenilen simülasyon süresi atomistik düzeyde bir model için oldukça çarpıcıdır. Simülasyon analiz sonuçları "Bulgular" başlığı 4. iş paketi altında verilmiştir.

Tablo 2. Protein, lipid ve su molekülleri için her iki modeldeki toplam atom sayısı

Model	Protein	Lipid	Su	İyon	Toplam
Düğüm	5.055	20.770	42.135	41	68.001
Kırpık	4.551	13.400	24.726	24	42.701

3.3. Beşinci iş paketi: ANM elastik ağ modelinin oluşturulması

Anizotropik Ağ Modeli (ANM) proteinlerin ve komplekslerinin kendi doğal yapıları etrafındaki harmonik hareketlerini hesapsal olarak belirlemede son derece etkili bir yöntemdir. Proteinleri tam katı hal benzeri özellikte kabul ederek, sistem içindeki etkileşimlere basit bir harmonik potansiyel uygulamalarına rağmen, proteinlerin biyolojik olarak önemli olan kolektif hareketlerini başarılı bir şekilde tahmin edebilmektedir (MA, 2005; TOBI, 2005; BAHAR, 2005).

Modeldeki anizotropi, hareketin x, y ve z koordinatlarına göre üç boyutlu karakterini ifade etmektedir. Kaba ölçekli ağın her bir nodu, bir rezidüdeki C ^{α} atomunu temsil etmektedir. Komşu nod çiftleri arasındaki uzaklık, önceden belirlenmiş bir değerden daha düşük olmak zorundadır ve birbirlerine, aynı kuvvet sabitine sahip harmonik yaylarla bağlanmışlardır.

Kuvvet sabiti, modeldeki tek ayarlanabilir parametredir. N tane rezidüden oluşan N nodlu bir sistemin toplam potansiyel enerjisi aşağıdaki gibi tanımlanmıştır,

$$V_{tot} = \frac{\gamma}{2} \sum_i \sum_j h(r_{cut} - R_{ij})(\Delta \mathbf{R}_j - \Delta \mathbf{R}_i)^2 \quad (1)$$

Burada, $h(x)$ Heavyside adım fonksiyonu ($h(x) = 1$ eğer $x \geq 0$; diğer durumlarda 0), R_{ij} i ve j merkezleri arasındaki uzaklıktır. Kesim mesafesi (r_{cut}), daha önceki çalışmada belirlendiği gibi 13-15 Å aralıkta alınmaktadır. Toplamlar N adet nod üzerinden yapılmaktadır. Toplam potansiyel enerji denkleminin diğer bir şekli de Gaussian formunda aşağıdaki gibi tanımlanmıştır,

$$\mathbf{V} = (\gamma/2) \Delta \mathbf{R}^T \mathbf{H} \Delta \mathbf{R} \quad (2)$$

Burada $\Delta \mathbf{R}$, bireysel nodların ($1 \leq i \leq N$) konum vektörleri yönündeki $\Delta \mathbf{R}_i$ dalgalanmaların $3N$ boyutlu vektörü, $\Delta \mathbf{R}^T$ konum vektörünün devriği, \mathbf{H} tüm etkileşim bölgeleri için potansiyelin ikinci türevinden oluşan $3N \times 3N$ boyutlu Hessian matrisidir. Hessian matrisi'nin ortogonal ayrışımından $3N-6$ adet özvektör ve $3N-6$ adet özdeğer elde edilmektedir. Özvektörler tekil harmonik nodlardaki frekansı, özdeğerler ise tekil harmonik nodlardaki hareketi ifade eder.

ANM'den elde edilen düşük frekanslı modlar, doğal haldeki proteinin kolektif hareketlerinin mekanizması ve olası konformasyonel geçişler hakkında bilgi vermektedir. Belirli bir bölgeye sınırlanmış yüksek frekanslı dalgalanmalar ise ancak birkaç rezidü içermektedir ve proteinin kararlılığı için önemli olan kinetik açıdan sıcak bölgeleri belirlemektedir. Bu bölgeler genellikle evrimsel açıdan korunmuş rezidülerden oluşmaktadır.

Her bir i rezidü için k 'inci mod'daki (\mathbf{u}_{ik}) dalgalanmanın ortalamasının karesi ("mean square fluctuation") aşağıdaki ifade ile elde edilir:

$$\langle \Delta \mathbf{R}_i^2 \rangle = (k_B T / \gamma) \sum_k \frac{(u_{ik})^2}{\lambda_k} \quad (3)$$

Burada k Boltzman sabiti, T sıcaklık ve γ genel yay sabiti, λ_k k 'inci moda ait özdeğerdir. Bu değer, deneysel olarak ölçülebilen β faktörüne (ya da sıcaklık faktörü) aşağıdaki ifade ile bağlıdır:

$$\beta = \frac{8\pi^2 \langle \Delta \mathbf{R}_i^2 \rangle}{3} \quad (4)$$

3.4. Altıncı iş paketi: Docking için sistemin kurulması

Docking için AutoDock yazılım programı kullanılmıştır (Morris, 1998; Goodford, 1985). Test amaçlı olarak, beta-2 adrenerjik reseptörüne X-ışınli kristalografide ne şekilde bağlı olduğu bilinen üçü *inverse agonist* (ICI 118,551/pdb id: 3NY8, carazolol/pdb id: 2HR1 ve yeni keşfedilmiş bir bileşik/pdb id: 3NY9), biri *antagonist* (alprenolol/pdb id: 3NYA) dört ayrı ligand molekülü dock edilmiştir. Bu sayede, programın en yüksek skor değerini verdiği

bağlanma biçiminin doğada bilinen bağlanma biçimine yakın olup olmadığı gösterilerek programın güvenilirliği test edilmiştir.

AutoDock'ta hesaplanan en yüksek skor değeri en düşük bağlanma serbest enerjisine denk düşmektedir. Tablo 3'de verilen ortalama değer, en düşük serbest enerjili konformasyon ile bu konformasyona benzer (RMSD'si 2 Å veya daha az) diğer konformasyonların bir ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Her bir ligand için toplam 100 docking programı koşturulmuştur. Tablo 3'deki değerlere bakılacak olursa, ortalama değerler 2 Å değerinin altındadır. Bilinen yapıya oldukça yakın bir tahminin en yüksek skorla bulunmuş olması kullandığımız docking programının güvenilirliğini göstermektedir. Ayrıca, en yüksek skor tahmini yerine, ortalama bir RMSD değerine bakmak her zaman daha güvenilir sonuçlar verir. Zira 3NYA için en yüksek skorlu konformasyonun RMSD'si 2.16 Å olarak görülmektedir. Bu değer, 2 Å üstünde olduğundan iyi bir tahmin olarak görülmeyebilir, ancak ortalama tahmine bakıldığında 1.43 ± 0.68 gibi bir değer oldukça başarılı bir sonuçtur. Dolayısıyla, bu çalışmada docking sonuçları, her zaman ortalama bir RMSD değerine göre yorumlanmıştır.

Docking için kullanılacak konformasyonlar 1 μ s'lik MD simülasyon gidişinden elde edilmiştir. Bağlanma bölgesinde olup agonist ve antagonist'lerle etkileşim içindeki iki kritik rezidü olan Ser207 ve Asp113 arasındaki uzaklık esas alınarak "aktif" ve "inaktif" yapıları temsil edecek iki farklı konformasyon seçilmiştir. Bunlardan ilki iki rezidü arasındaki uzaklığın 8.6 Å olduğu ve "kapalı" olarak adlandırılan "aktif" konformasyondur. Bu türden bir yapı, agonist'ler için elverişli bir bağlanma bölgesi oluşturmaktadır, zira agonistlerin bu iki rezidü ile aynı anda etkileşim içinde olabilmesi için daha dar bir ortamda bulunmaları gerekmektedir. Buna karşılık, antagonist'ler daha büyük moleküller olduklarından bir "inaktif" yapının sağladığı geniş bağlanma kavitesi için uygundur. "İnaktif" yapıyı temsil etmek üzere iki rezidü arasındaki uzaklığın 16.3 Å olduğu bir yapı seçilmiştir.

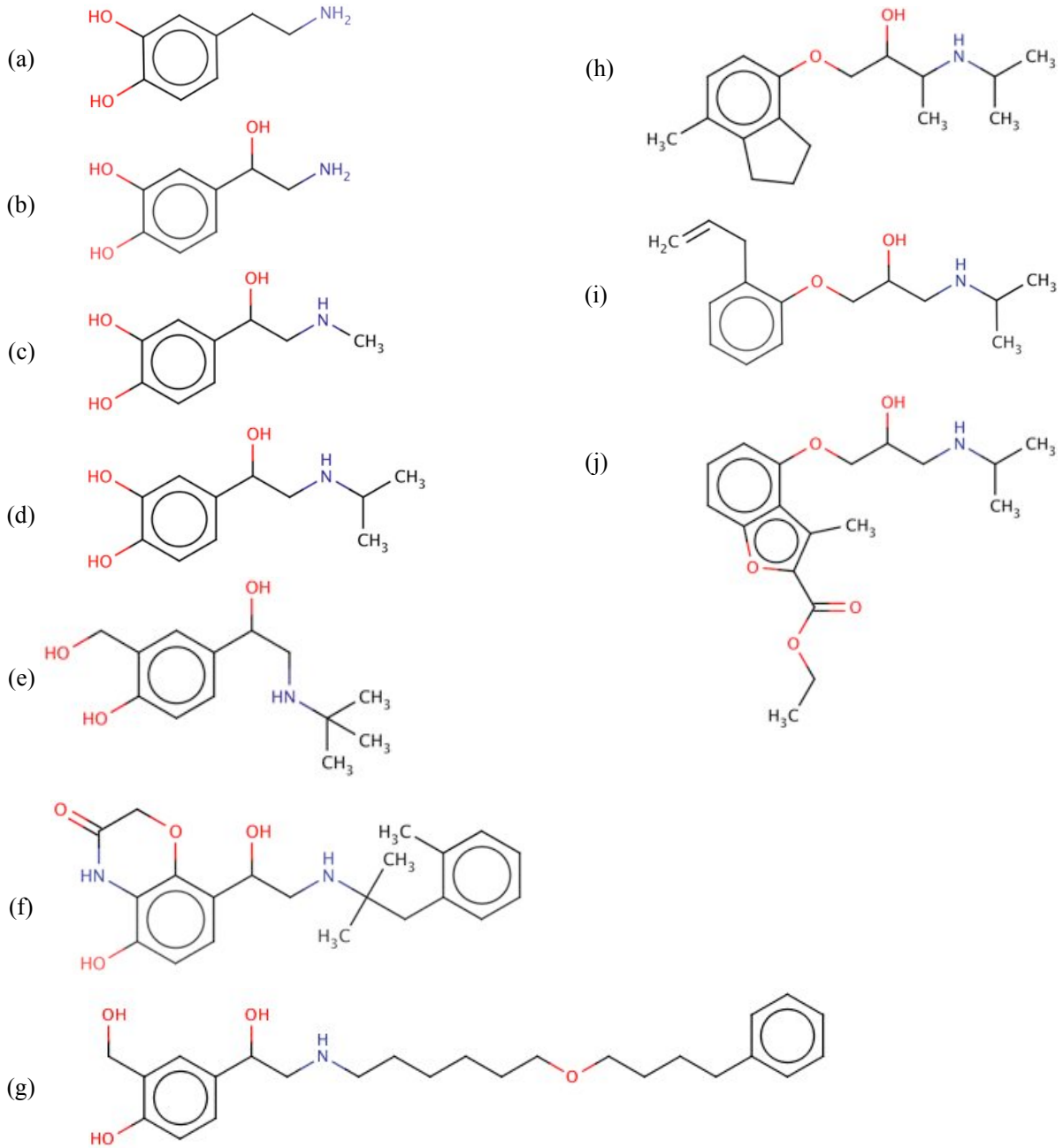
Tablo 3. Dört inaktif kristal yapının AutoDock ile docking sonuçları

Sistem (PDB id)	En yüksek skorlu konformasyon için RMSD değeri (Å)	Birinci kümedeki konformasyonların ortalama RMSD değeri (Å)
2RH1	0.77	0.99 ± 0.18
3NY8	1.29	1.47 ± 0.30
3NY9	0.77	1.02 ± 0.15
3NYA	2.16	1.43 ± 0.68

Bunun dışında reseptörün bilinen aktif halini gösteren kristal yapısı ile (PDN kodu: 3SN6), inaktif kristal yapıları olan dört farklı yapı (PDB kod: 2RH1, 3NY8, 3NY9, 3NYA) docking için kullanılmıştır. Dock edilen moleküller Şekil 3'te gösterilen 3 antagonist (alprenolol, ICI ve yeni bir antagonist türevi), 6 agonist (norepinephrine, epinephrine, isoproterenol, salbutamol, P0G, salmeterol) ve 1 partial agonist (dopamine, yarı etkili agonist)'tir.

Her bir molekül için toplam 200 farklı docking koşturulmuştur. Docking'den çıkan tüm yapılar 2Å RMSD değerine göre kümelenebilir. En doğru olarak seçilen yapı, bilinen

bağlanma bölgesine en doğru şekilde konumlanmış konformasyondur. Bu her zaman en yüksek skorlu birinci kümedeki yapı olmak zorunda değildir. Ancak seçilen yapının skor değeri ile en yüksek skor arasındaki fark 1 kcal/mol'dan fazla olmamalıdır. Analiz kısmında farklı reseptörlerin aynı moleküle ya da farklı moleküllerin aynı reseptöre ne şekilde farklı bağlandıklarına bakılmıştır. Sonuçlar “Bulgular” bölümünde verilmiştir.



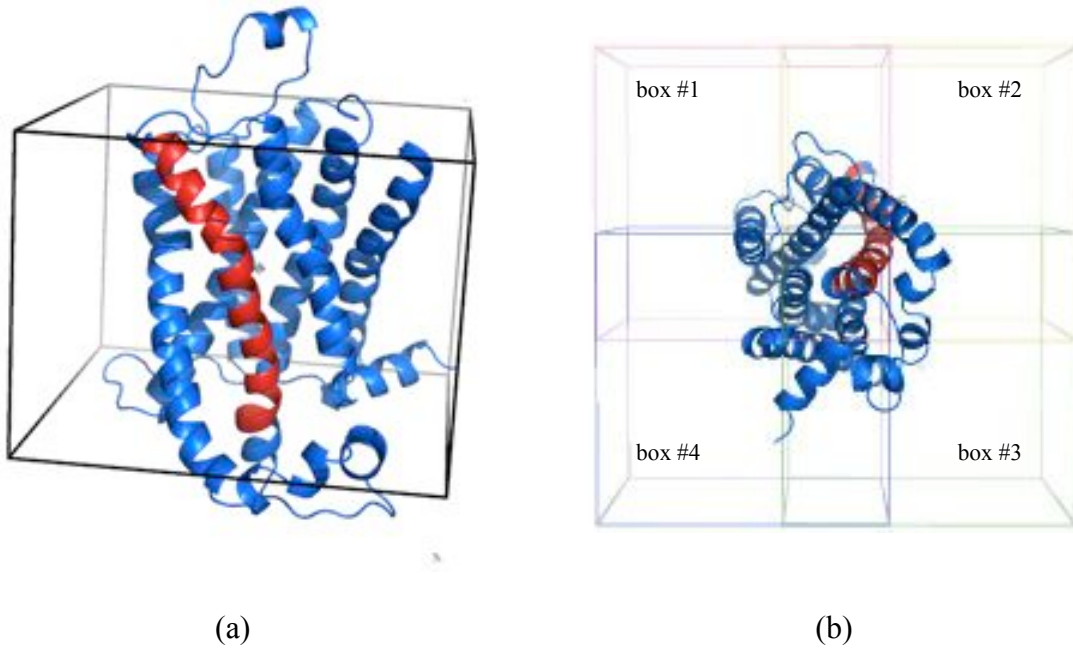
Şekil 3. (a) dopamine, (b) norepinephrine (6) (c) epinephrine (6) (d) isoproterenol (7) (e) salbutamol (8) (f) POG (8) (g) salmeterol (19) and three antagonists (h) ICI ($C_{17}H_{27}NO_2$) (7) (i) alprenolol ($C_{15}H_{23}NO_2$) (9) and (j) novel antagonist ($C_{18}H_{25}NO_5$) (10) *ethyl 4-((2S)-2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propyl}oxy)-3-methyl-1-benzofuran-2-carboxylate*

3.5. Sekizinci iş paketi: Reseptörün dimerik yapı tahmini için yapılan docking çalışmaları

3.5.1. Kısa peptid docking deneyleri:

Hebert ve grubunun 1996 yılında yaptığı deneysel peptid çalışmaları [9] ve bunu izleyen diğer mutasyon çalışmaları (Salahpour, 2004), β_2AR 'daki altıncı sarmalın (TM6) homodimerizasyonda önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkartmıştır. 2005'te Nemoto ve grubu tarafından yapılan teorik çalışmada ise altıncı sarmalın iki monomer arasında olduğu tahmin edilen interfaz bölgesinde ortaya çıkması deneysel çalışmaları destekler niteliktedir (Nemoto, 2005). Hücre zarı proteinleri için dimerizasyon motifi olarak adlandırılan amino asit dizilimi LIXXGVXXGVXXT ilk olarak glikoforin proteini için öne sürülmüştür (Senes, 2001). Ardından Hebert ve grubu β_2AR için LKTLGIIMGTFTL motifini öne sürmüştür. Her dört amino asitte bir tekrar eden Leu ya da Gly rezidülerinin dimerizasyonda kritik rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu veriler ışığında, Hebert ve grubunun sentezlediği ve dimerizasyonu inhibe ettiği düşünülen altıncı sarmala ait 276-296 arasında bulunan bölge NH₂-GIIMGTFTLCWLPFFIVNIVH-COOH bilgisayar ortamında oluşturulmuş ve hemen ardından β_2AR 'a dock edilmiştir. Docking sırasında peptidin farklı konumlarının reseptöre bağlanacağı iki farklı ortam, grid kutusu aracılığıyla oluşturulmuştur. Grid kutusu, docking işleminin sınırlarını belirlemektedir. Şekil 4a'da gösterildiği gibi, birinci ortamda grid kutusu, proteinin "düğüm" bölgeler dışında kalan kısmını kapsamaktadır. Dolayısıyla, peptit, proteinin her tarafına bağlanma serbestliğine sahiptir. Bu tür serbest docking işlemleri "kör" docking (blind docking) olarak adlandırılır ve bağlanma bölgesinin bilinmediği durumlarda kullanılır (Hetenyi, 2002). İkinci ortamda ise grid kutusu reseptörü, çevresindeki bölge ile birlikte dört farklı bölgeye ayırmıştır (Şekil 4b). Her bölge için docking işlemi birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. β_2AR monomeri (a) 0.45 Å aralıklı büyük grid kutusu (b) 0.375 Å aralıklı dört farklı çakışan küçük grid kutuları

AutoDock v4.0, peptit docking işlemlerinde kullanılmıştır. Her bir grid ortamı için docking işlemi 200 kere koşturulmuştur. Docking sırasında, protein ve peptidteki dönebilen bağların hepsi kapatılmıştır. Zira, dimerizasyon sırasında peptidin ve proteinin esnek olmasının dimerizasyonu olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. En yüksek skorla bağlanan konformasyonlar daha sonra DSX ile yeniden değerlendirilmiştir (Gohlke, 2000).

Moleküler Dinamik simülasyonu sonucu elde edilen gidişizinden örneklenen toplam 5608 yapı ICL3 bölgesinin RMSD'sine göre *k-clust* algoritması ile kümelendirilmiştir. Bunun sonucunda elde edilen farklı ICL3 konformasyonlarından, ICL3 bölgesinin reseptörün alt kısmına doğru iyice paketlenmiş olanı (Şekil 4a), docking çalışması için seçilmiştir.

Docking öncesinde, eşit aralıklarla bölünmüş üç boyutlu enerji ızgarası (grid box) AutoGrid (Morris, 1998) programı ile oluşturulmuştur. Bu sayede, docking sırasında en fazla zaman alan enerji hesapları çok hızlı bir biçimde gerçekleştirilmektedir. Docking sırasında kullanılan konformasyonel tarama işlemi, Lamarckian genetic algoritması (LGA) ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Uzun peptid docking deneyleri

Bir sonraki docking çalışmaları, daha uzun bir peptid kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada, her heliks bölgesinden bir peptid oluşturulmuş ve kısa peptidler için kullanılan 0.45 Å aralıklı büyük bir grid kutusu içinde (Şekil 4a) “kör” docking (blind docking) dediğimiz şekilde gerçekleştirilmiştir. Toplam 7 transmembran heliks için, her biri 200 kere koşturulan toplam 7 farklı docking deneyi yapılmıştır.

3.5.3. Monomer-Monomer Docking Deneyleri:

β_2 AR dimerik yapı tahmini için uygulanan protein-protein docking algoritması FAST Fourier transform yöntemini kullanmakta olan ZDOCK (Pierce, 2007) programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu program olası tüm bağlanma bölgelerini translasyonel ve rotasyonel uzayda taramaktadır. Programın girdisi β_2 AR monomer, çıktısı ise bir β_2 AR homodimer yapısıdır. Program bir defada en fazla 2000 dimerik yapı oluşturabilmektedir. Daha fazla sayıda yapı elde edebilmek için program iki farklı β_2 AR monomer konformasyonu için ve reseptördeki farklı bölgelerin docking bölgesi dışında tutulması şeklinde 8 defa çalıştırılmış, dolayısıyla toplamda 16.000 homodimerik yapı elde edilmiştir. Tablo 4'te bu farklılıklar listelenmiştir.

Tablo 4. β_2 AR'ın farklı konformasyonları ve kısıtlı bölgeler için yapılan docking deneyleri

Set	ICL3'nin varlığı	Kısıtlanan bölge	Dimerik yapı sayısı
1	Var	Yok	2000
2	Var	Bir monomerdeki ECL2 ve ICL3	2000
3	Var	Bir monomerdeki tüm düğüm bölgeler	2000
4	Var	Her iki monomerdeki tüm düğüm bölgeler	2000
5	Yok	Yok	2000
6	Yok	Bir monomerdeki ECL2 ve ICL3	2000
7	Yok	Bir monomerdeki tüm düğüm bölgeler	2000
8	Yok	Her iki monomerdeki tüm düğüm bölgeler	2000

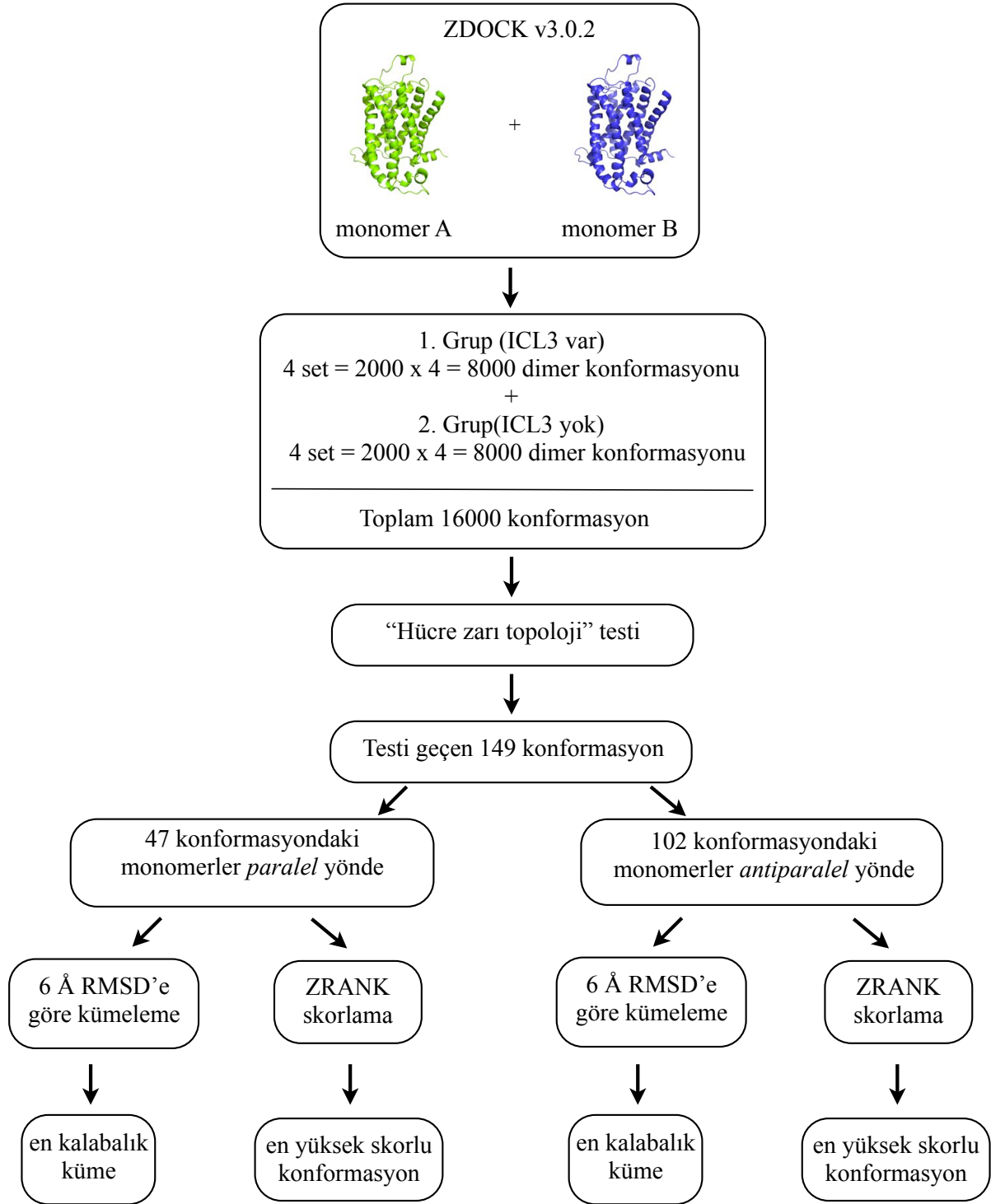
Docking'den elde edilen 16.000 farklı yapı "hücre zarı topoloji" süzgecinden geçirilmiştir. Bu testte reseptöre ait iki özelliğe bakılır. Bunlardan biri *eğim açısı*, diğeri *z-ofset* değeridir. Bu iki değer ikinci monomerin birinciye göre hücre zarı içinde uygun bir yerde olup olmadığını test etmek için kullanılır. *Eğim açısı*, proteinin hücre zarı yüzeyine dik yöndeki temel bileşeni ile hücre zarı yüzeyine dik olan z-ekseni arasındaki eğim açısıdır (Şekil 2a). *z-ofset* ise ikinci monomerin geometrik merkezinin birinciye göre z eksenini boyunca yer değiştirdiği miktardır. 0.4 radyan ve 6 Å, *eğim açısı* ve *z-ofset* için maksimum kabul edilen değerlerdir. 16.000 yapıdan sadece 149 tanesi "hücre zarı topoloji" süzgecinden geçebilmiştir.

149 dimerik yapı incelendiğinde bunlardan 47'sinde monomer'lerin birbirine göre paralel, 102'sinde ise antiparalel durduğu görülmektedir. İnterfaz bölgesini, diğeri bir deyişle iki monomerin birbiriyle etkileşim içinde oldukları bölgeyi belirlemek için, her rezidünün dimer oluşumu sırasında SASA (solvent accessible surface area) değerindeki değışim aşağıda verilen denklik ile hesaplanmıştır.

$$dSASA_i = \frac{SASA_{u,i} - SASA_{c,i}}{SASA_{u,i}}$$

Bu denklikte, $SASA_{u,i}$ ve $SASA_{c,i}$ sırasıyla rezidü i 'nin dimer oluşumundan önceki ve sonraki hallerdeki SASA değerleridir. $dSASA$ "0" ile "1" arasında değışmektedir. "0" olduğu durumlar, SASA değerinde bir değışim olmadığını gösterir. Dolayısıyla o rezidünün interfaz bölgesinden uzakta olduğu anlaşılabilir. "1" ya da 1'e çok yakın olduğu durumlarda ise, $SASA_{c,i}$ değeri sıfıra yakındır, diğeri bir deyişle rezidü i sıvı ortamdan uzakta, gömülü diğeri bir deyişle interfazda bulunmaktadır.

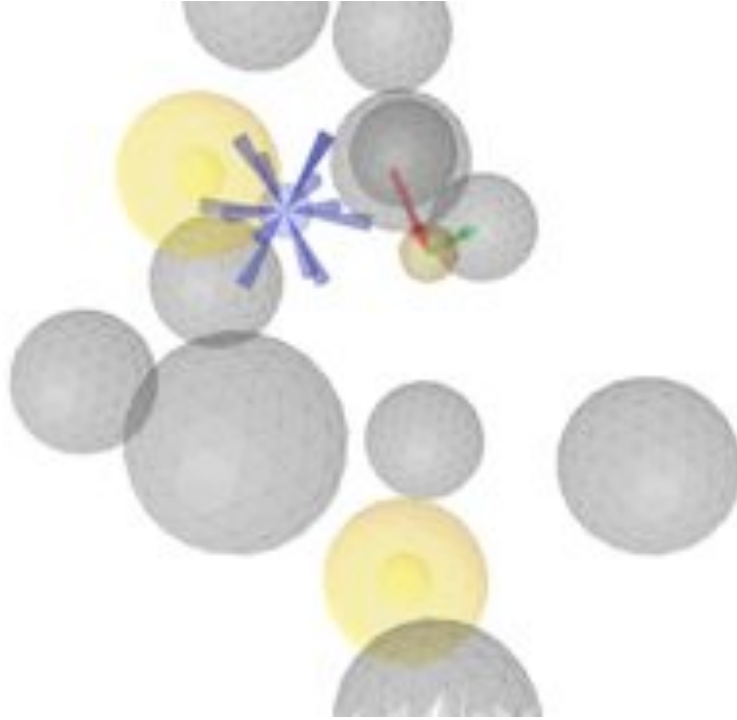
149 dimerik yapı 6 Å RMSD'e göre kümelenmiş, ve en kalabalık kümelerde bulunan yapılarıdaki interfaz bölgesinin hangi transmembran helikslerden oluştuğı ortaya çıkartılmıştır. Son olarak, her bir 149 yapı ZRANK skor denkleme ile yeniden değılendirilmiş ve en yüksek skora sahip yapılar incelenmiştir. Bu bölümde anlatılan yöntem Şekil 5'teki akış grafiğinde özetlenmiştir. Analiz sonuçları, "Bulgular" altında verilmiştir.



Şekil 5. Protein-Protein Docking sonucu elde edilen dimerik yapıların analizi için izlenen yöntemin akış grafiği

3.6. Dokuzuncu iş paketi: sanal tarama prosedürü

Bu iş paketinde, reseptör için yeni antagonist olabilecek aday moleküller, ZINC veri bankasının (Irwin, 2005) farmakofor taraması sonucu ortaya çıkartılacaktır. Seçilecek farmakofor modelindeki özelliklere sahip moleküller seçilecek, sahip olmayanlar elenecektir. Bunun için, reseptörün bilinen beş inaktif kristal yapısı (PDB id: 2RH1, 3D4S, 3NY8, 3NY9, 3NYA) protein veri bankasından alınarak LigandScout programı (Wolber, 2005) ile farmakofor modelleri oluşturulmuştur. Daha sonra bu beş farklı farmakofor modelde ortak olan farmakofor özellikler kullanılarak temsili bir farmakofor model elde edilmiştir. Şekil 6'da gösterilen bu modelde iki adet hidrofobik (sarı küreler), birer adet hidrojen bağ alıcısı (kırmızı ok) ve vericisi (yeşil ok), ve bir polarize bölge (mavi çubuklar) bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, gri küreler *dışarılanmış hacim* (excluded volume) olup bu bölgede yer kaplayan reseptöre aittir.



Şekil 6. Sanal tarama için oluşturulan farmakofor model. “excluded volume” (gri), hidrofobik (sarı), H-bağ alıcısı (kırmızı ok), H-bağ vericisi (yeşil ok), polarize bölge (mavi çubuklar).

Oluşturulan farmakofor modeli ZINC veribankası taramasından önce güvenilirlik testine tabii tutulmuştur. Bu testin amacı, kullanılan farmakofor modelin antagonist seçiciliğini ölçmek, diğer bir deyişle veri bankasından seçilecek moleküllerin antagonist bir molekül olma olasılığını ortaya çıkartmaktır. Güvenilirlik testi için aktivitesi bilinen 117 molekülden oluşan bir veritabanı oluşturulmuştur. Bu moleküller GPCR ligand veritabanı olan GLIDA'dan alınmıştır (Okuno, 2006). Bu veritabanında 53 antagonist ve 64 agonist bulunmaktadır. İnhibitör aktivitesi bilinen antagonist'ler “aktif veribankası” adı altında, inhibitörün tersi göreve sahip agonist'ler ise “inaktif veribankası” adı altında toplanmıştır. Her bir farmakofor modelinin bu iki veribankasını tarayarak buldukları “hit” moleküller arasında gerçekte aktif inhibitör olanlar “gerçek pozitif”, olmayanlar ise “yanlış pozitif” olarak kabul edilmiştir. Farklı farmakofor skor değerleri için bu işlem tekrar edilmiş ve ROC eğrileri (Receiver Operating Characteristics) (Swets, 1996) elde edilmiştir.

ROC (**R**eceiver **O**perating **C**haracteristics) eğrisinin köşe çizginin üstünde yer alması modelin güvenilirliğini destekler. Tam tersi bir durum olan köşe çizginin altında kalması modelin güvenilir olmadığını gösterir. Tarama yapılırken değiştirilebilen bir diğer parametre ise veritabanındaki bir molekülün “hit” olabilmesi için modelde en fazla gözardı edilebilecek farmakofor sayısıdır. Örnek verilecek olursa, eğer bir model toplam 6 farmakofor özelliği taşıyorsa, bir molekülün hit olabilmesi için bunlardan en az 4’üne sahip olması gerekiyor, dolayısıyla 6’da en fazla 2’si gözardı edilebiliyor.

“Bulgular” bölümünde ayrıntılı olarak verilen ROC eğrilerine bakarak farmakofor taraması için gereken parametreler seçilmiş ve yaklaşık 10 milyon civarında molekül içeren ZINC veritabanı taranmıştır. Bu veritabanısındaki moleküller “Lipinski’nin 5 kuralına” uymakta olup, ilaç olma potansiyeli yüksek moleküllerdir. Sırasıyla bu özellikler aşağıdaki gibi verilmiştir:

- $150 \leq \text{Moleküler ağırlık} \leq 500$
- $x\log P \leq 5$
- H-bağ donör sayısı ≤ 5
- H-bağ akseptör sayısı ≤ 10
- tPSA (topolojik polar yüzey alanı) < 150
- Dönebilir bağ sayısı ≤ 7

Bu özelliklere sahip toplam 9.928.465 molekülden 727.983 adeti farmakofor model taramasını geçebilmiştir, diğer bir deyişle kullanılan farmakofor modeline uymaktadır. 727.983 molekül daha sonra GOLD programı ile ChemPLP skoring fonksiyonu yardımı ile dock edilmesine başlanmıştır. Prosesler halen server’da devam etmektedir.

Yukarda bahsedilen farmakofor modeli bilinen 53 agonist’ten 37’si, 64 antagonist’ten ise 45’i geçebilmiştir. Bu testi geçebilen toplam 82 (=37+45) molekül ChemPLP programı ile 2RH1’deki bilinen inaktif reseptör yapıya dock edilmiştir. Bunun sonucunda her bir molekül için elde edilen en yüksek skora sahip konformasyonun, bağlanma bölgesinde bilinen kritik rezidülerle yaptığı etkileşimlere bakılmıştır. Buna göre, Ser 203, Ser 204, Ser 207 rezidülerinden en az biriyle ve Asp113, Val 114, Asn312 rezidülerinden en az biriyle etkileşim içinde olan konformasyonlar bağlanma testinden geçmektedir. Geçemeyen moleküller doğrudan listeden çıkartılmaktadır. Bu prosedür, yukarda halen docking prosesleri devam eden 727.983 molekül için de uygulanacaktır.

Testi geçen tüm moleküller (ZINC veritabanından gelenler ve bilinen 82 molekül), skor değerlerine göre sıraya sokularak, belirli bir skor değerinin üstünde olan moleküllerin agonist ya da antagonist olup olmadıklarına bakılarak, docking programının ve kullanılan skoring fonksiyonun seçicilik özelliği test edilir. Bu özellik Enrichment Factor (EF) denilen ve aşağıdaki gibi bir denklemle ifade edilen istatistiksel bir değerle ölçülür.

$$EF = \frac{TP/n}{A/N}$$

Burada TP taramadan çıkan “gerçek pozitif” (true positive) sayısı, n veritabanından seçilen molekül sayısı, A veritabanındaki toplam aktif moleküller (bu çalışmada toplam antagonist molekül sayısı), N ise veritabanındaki toplam molekül sayısıdır.

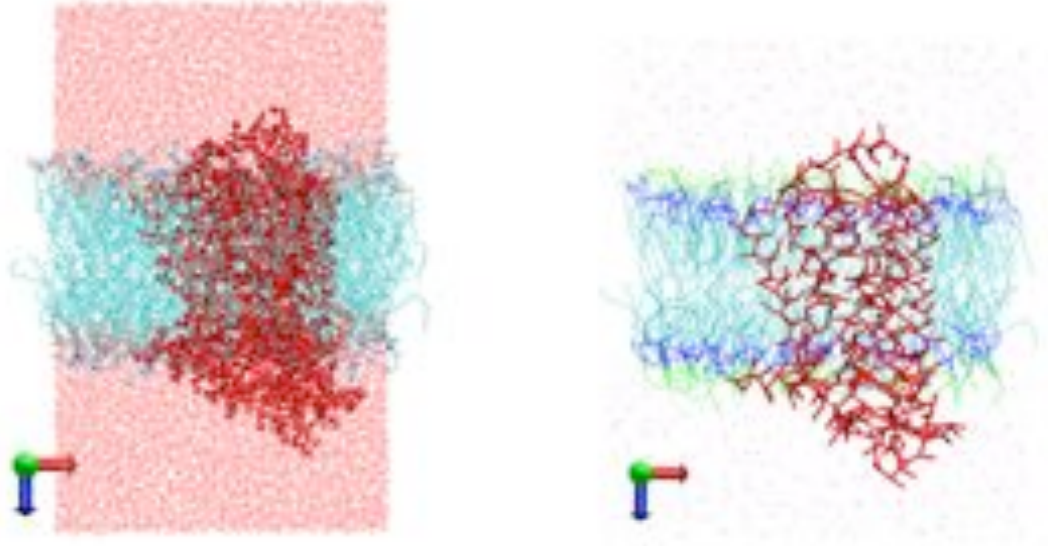
3.7. Onuncu iş paketi: Reseptörün “Rezidü Tabanlı Kaba Taneli” (Residue-Based Coarse Grained) Modelinin oluşturulması ve Moleküler Dinamik simülasyonu için sistemin hazırlanması

Atomistik modeller, tüm atomlar dikkate alındığından simülasyonlarda güvenilir sonuçlar vermektedir. Ancak, bu tür modeller daha büyük sistemlere uyarlandığında simülasyon süresinde ciddi bir artış (sistemdeki atom sayısının karesiyle orantılı) gözlemlenmektedir. Elimizdeki bilgisayarların gücü bu tür simülasyonların makul bir süre içinde sonlanması için yeterli olmadığından basitleştirilmiş modeller kullanmak kaçınılmaz olmuştur. Projede daha önce yapılması planlanmamış, ancak sonrada ihtiyaç duyulmuş bu çalışma 10. iş paketi altında toplanmıştır.

Basitleştirilmiş (Rezidü Tabanlı Kaba Taneli) modelde proteindeki her bir rezidü iki etkileşim noktası (CG tanesi) ile ifade edilmektedir. Bu etkileşim noktalarından biri, protein zincirinin omurgasını (backbone) oluşturan atomları, ikincisi ise yan zincirdeki atomları temsil etmektedir (Shih, 2006). Lipid, su ve iyonlar Marrink’in modelini esas almaktadır (Marrink, 2004, 2007). Bu modelde her bir lipid molekülü toplam 12 CG tanesi ile belirtilmektedir. Bunlardan biri lipid molekülündeki kolin grubunu, bir diğeri fosfat grubunu, iki CG tanesi iki gliserol grubunu, kalan sekiz tanesi ise iki hidrokarbon uçlarını temsil etmektedir. Ayrıca bu modelde, her dört su molekülü bir CG tanesi ile, bir iyon molekülü ise en yakınında bulunan altı su molekülü ile birlikte bir CG tanesi olarak ifade edilir. Şekil 7’de de gösterildiği üzere, yeni modeldeki toplam sayısı 68.003’den, 6.868’e düşmüştür. Yaklaşık 1/10’luk bir sistem küçülmesi, hesaplama hızını yaklaşık 500 kat hızlandıracaktır.

CG modelleme, “düğüm” model üzerine uygulanmıştır. Lipid hidrokarbon uçların “eritilmesi” olan birinci adıma gerek duyulmamıştır, zira, CG model, hazırlık evresinin sonundaki atomistik model temel alınarak elde edilmiştir. Dolayısıyla, hücre zarının doğal düzensiz sıvı hali, üretilen CG modele yansımıştır. CG modelin hazırlık aşamasının ilk evresinde, proteinin hareketi kısıtlı tutulup hücre zarı ve çevre su molekülleri serbest bırakılarak 10,000 adım minimizasyon ve ardından 100 ns’lik bir MD simülasyonuna tabi tutulmuştur. Burada 1 MD adımı 5 femtosaniye (fs) olarak alınmıştır. Atomistik modelde bir MD adımın süresi 2 fs olarak alınmıştır. CG modellerde bu zaman aralığı 25 fs’a kadar arttırılabilmektedir. Ancak, 5 fs üzeri bir artış sistemin yapısının bozulmasına sebep olmuştur, dolayısıyla CG model ile yapılan 6 μ s’lik simülasyon 5 fs ile gerçekleştirilmiştir.

Simülasyon sabit NPT 1 atm basınç ve 310 K sıcaklıkta NAMD programının 2.7’inci sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistem 30 K’den 310 K’e aşamalı olarak ısıtılmıştır, aksi takdirde sistemin stabilitesi etkilenmektedir. Ardından, 30.000 step’lik enerji minimizasyonu (Conjugate Gradient algoritması) uygulanmıştır. 6 μ s’lik simülasyon boyunca aralıklı olarak kaydedilen toplam 5929 konformasyon RMSD’lerine göre *k-clust* algoritması kullanılarak kümelenebilir (Feig, 2004). Kümeleme proteinin dört ayrı bölgesine göre gerçekleştirilmiştir: core (ICL3 dışında kalan protein), ICL3, transmembran (hücre zarı içinde kalan helikal bölge), ve bağlanma kavitesi. Her kümeleme işlemi sonucunda elde edilen en kalabalık kümeden seçilen bir temsilci yapıya *tersine dönüşüm (reverse-mapping)* yöntemi uygulanarak atomistik modeli elde edilmiştir. Atomistik modelin dengeye ulaşması için, daha önce bahsedilen üç hazırlık aşamasından geçirilmiştir ve bunu takiben 100 ns MD simülasyonuna tabii tutularak denge ve üretim safhaları elde edilmiştir. Analiz sonuçları “Bulgular” kısmında 10. iş paketi başlığı altında verilmiştir.



(a)

(b)

Şekil 7. Protein, lipid, su ve iyon moleküllerinden oluşan sistemin (a) atomistik ve (b) basitleştirilmiş kaba taneli CG model ile gösterimi

4. BULGULAR:

4.1. Dördüncü iş paketi: MD simülasyon analizi ve gidişizinden konformasyonların tayini

4.1.1. MD gidişizinde yeni bir “ultra inaktif” yapının ortaya çıkması:

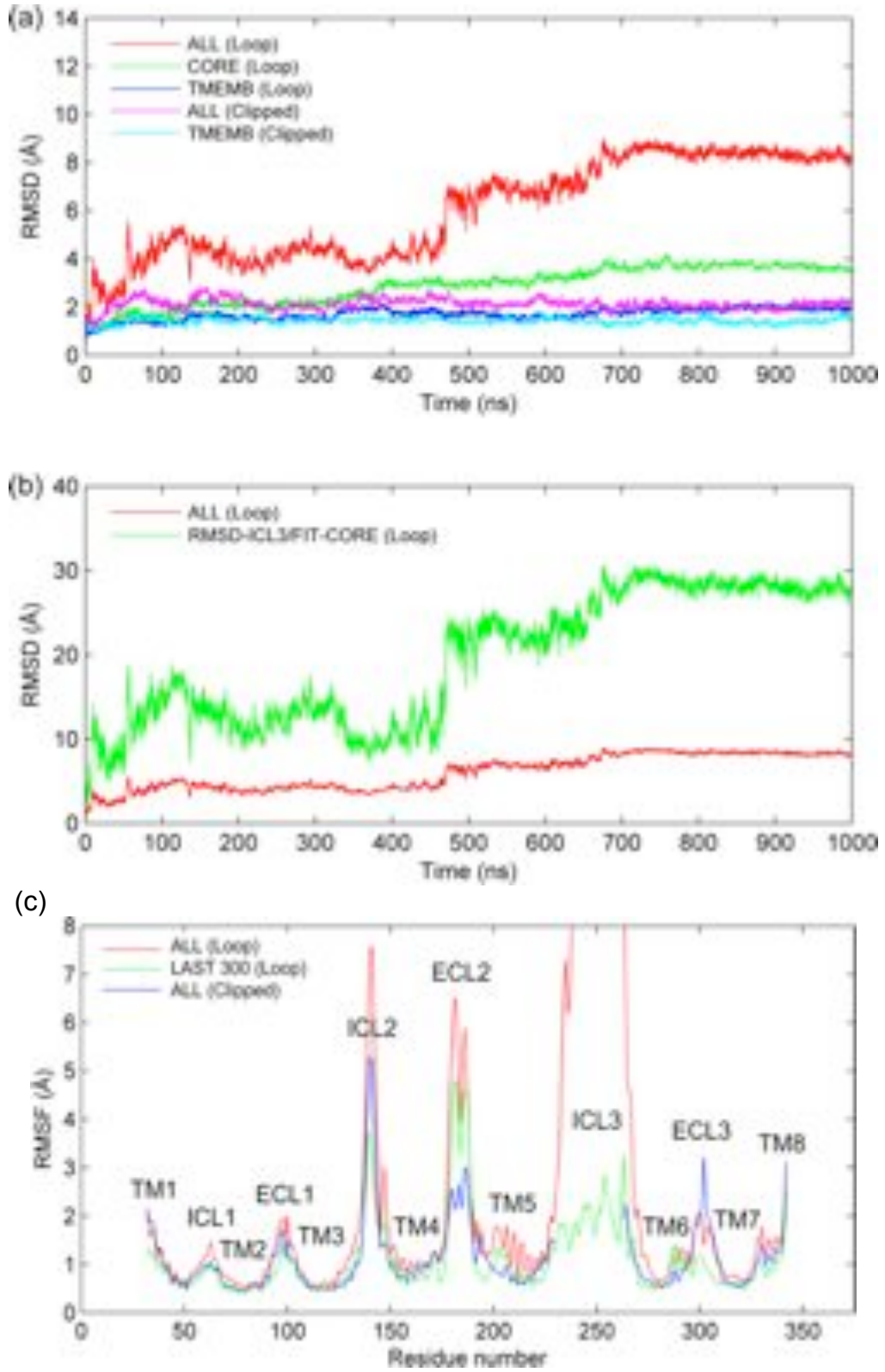
“Düğüm” modelde simülasyonun son 300 ns’lik evresi, reseptörün daha önce gözlemlenmemiş bir yapısal halini ortaya çıkartmıştır. Bu yapısal hal, reseptörün “ultra inaktif” bir durumunu göstermektedir. Bu “ultra inaktif” halde, reseptörün bağlanma bölgesi genişlemiş, hücre içine bakan alt kısım ise daralmıştır. Diğer taraftan, buna benzer bir durum “kırpık” modelde gözlemlenmemiştir. İki model arasındaki tek fark ICL3 düğüm bölgesidir. “Kırpık” modelde bu bölge eksiktir.

Bunun yanı sıra, genelde reseptörden uzağa, yana doğru açılmış serbest bir konformasyonu tercih eden ICL3 düğüm bölgesi, “düğüm” modelin alt kısmındaki daralma gerçekleştiği sırada, reseptörün alt kısmına kıvrılarak kısıtlı bir konformasyonu tercih etmiştir ve simülasyonun sonuna kadar da bu halde kalmıştır. Konformasyonel değişimdeki bu ani değişim Şekil 8’deki RMSD ve RMSF profillerinden de anlaşılmaktadır. “Düğüm” modelin RMSD değeri (Şekil 8a), simülasyonun tam ortalarında artmaya başlamış ve 300 ns’de 8 Å değerinde stabilize olmuştur. Buna benzer bir değişim Şekil 8b’deki ICL3 RMSD profilinde görülmektedir. Dolayısıyla, bu değişime sebep olan bölgenin ICL3 bölgesi olduğu açıktır.

RMSF profilinde ICL3 ün hareketliliği ilk evrelere göre oldukça düşmüştür (Şekil 8c). ICL3 bölgesinin reseptörün en hareketli bölgesi olduğu göz önünde bulundurulursa, “düğüm” modelin alt kısmındaki daralmanın ICL3 ün içe doğru kıvrılması sonucu gerçekleştiği, alt kısımdaki bu daralmanın da üst kısmın genişlemesine yol açtığı söylenebilir. Diğer bir deyişle, reseptörün “ultra inaktif” yapıya geçmesini tetikleyen mekanizmanın ICL3 ün içe doğru kapanma hareketi ile başlatılmış olması muhtemel bir olasılıktır.

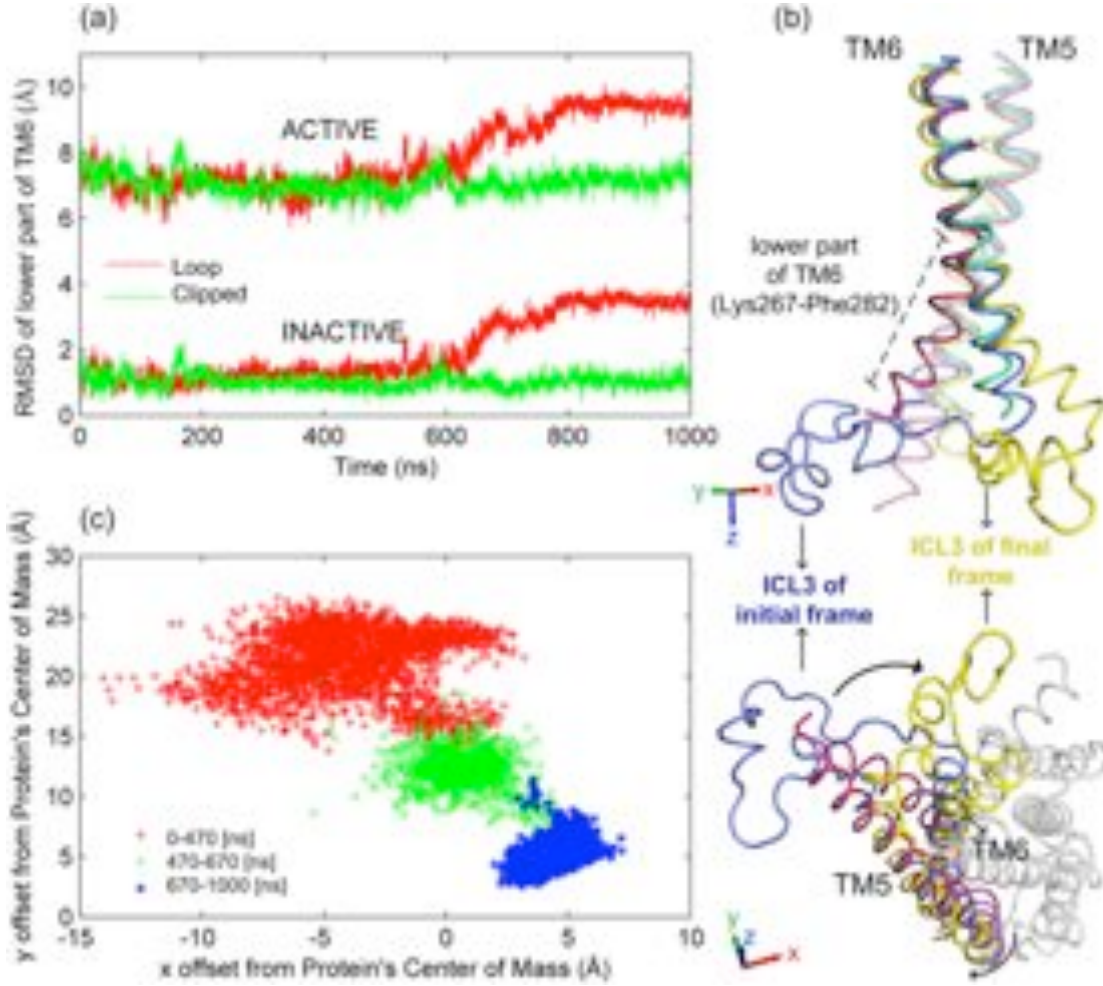
Reseptörün üst ve alt kısmı arasındaki bu yüksek korelasyon, teorik olarak bilinmektedir [1]. Alosterik bir reseptör olan β_2 AR bir sinyal yolunun başlama noktasıdır. Hücre dışından gelip, reseptörün üst bölgesindeki bağlanma çukuruna bağlanan küçük boyutlardaki sinyal molekülleri, tıpkı bir kerpeten modelini andıran bu yapısal korelasyon sayesinde, reseptörün alt kısımlarına etki edebilmektedir. Ancak şimdiye dek yayınlanmış hiç bir deneysel ya da teorik modelleme çalışmasında reseptörün bu “ultra inaktif” hali gözlemlenmemiş, bu değişimin özellikle ICL3 bölgesi ile bağlantılı olduğu ortaya çıkartılmamıştır. Gözlemlenen ilk “ultra inaktif” yapı olması açısından önemli bir sonuçtur.

Reseptörün inaktif halden aktif hale geçerken gösterdiği bilinen en ciddi konformasyonel değişim altıncı sarmalın (TM6) alt kısmında gerçekleşmektedir (Cherezov, 2007; Rasmussen, 2011). Bilinen aktif (PDB id: 3SN6) ve inaktif (PDB id: 2RH1) kristal yapılar karşılaştırıldığında altıncı sarmalın alt kısmı aktif haldeyken hücre zarının içine, reseptörden uzağa doğru konumlanmaktadır (Şekil 9b). Bu durum, üçüncü sarmaldaki Arg131 ile altıncı sarmaldaki Gln268 arasındaki iyonik kilidin bozulmasına yol açarak reseptörün hücre içine bakan alt bölgesinin açılmasına ve G protein için uygun bir bağlanma bölgesinin oluşumuna sebep olmaktadır.



Şekil 8. “Düğüm” ve “kırpık” model için (a,b) RMSD ve (c) RMSF profilleri. RMSD profilleri reseptörün farklı bölgelerine göre hesaplanmıştır. Core: ICL3 dışında kalan bölge. TMEMB: hücre içine gömülü sarmallar. RMSF profili “düğüm” model için iki farklı zaman dilimi için hesaplanmıştır, tüm 1 μ s’lik ve son 300 ns’lik evre.

Bu çalışmada ise TM6 alt bölgesindeki hareket, yukarıda bahsedilenin tersine bir yönde, reseptörün merkezine doğru gerçekleşmiştir. Şekil 9a'da görüldüğü gibi değişim simülasyonun ortalarında başlamış ve simülasyonun son 300 ns'lik evresinde stabilize olmuştur. Buna sebep olan konformasyonel değişimin ICL3 ün kendi içinde toplanarak reseptörün alt kısmına doğru kıvrılması olduğu muhtemeldir. Zira ICL3 oldukça esnek ve hareketli bir bölgedir ve termodinamik açıdan ICL3 ün altıncı sarmalın hareketini tetiklemesi daha olasıdır.

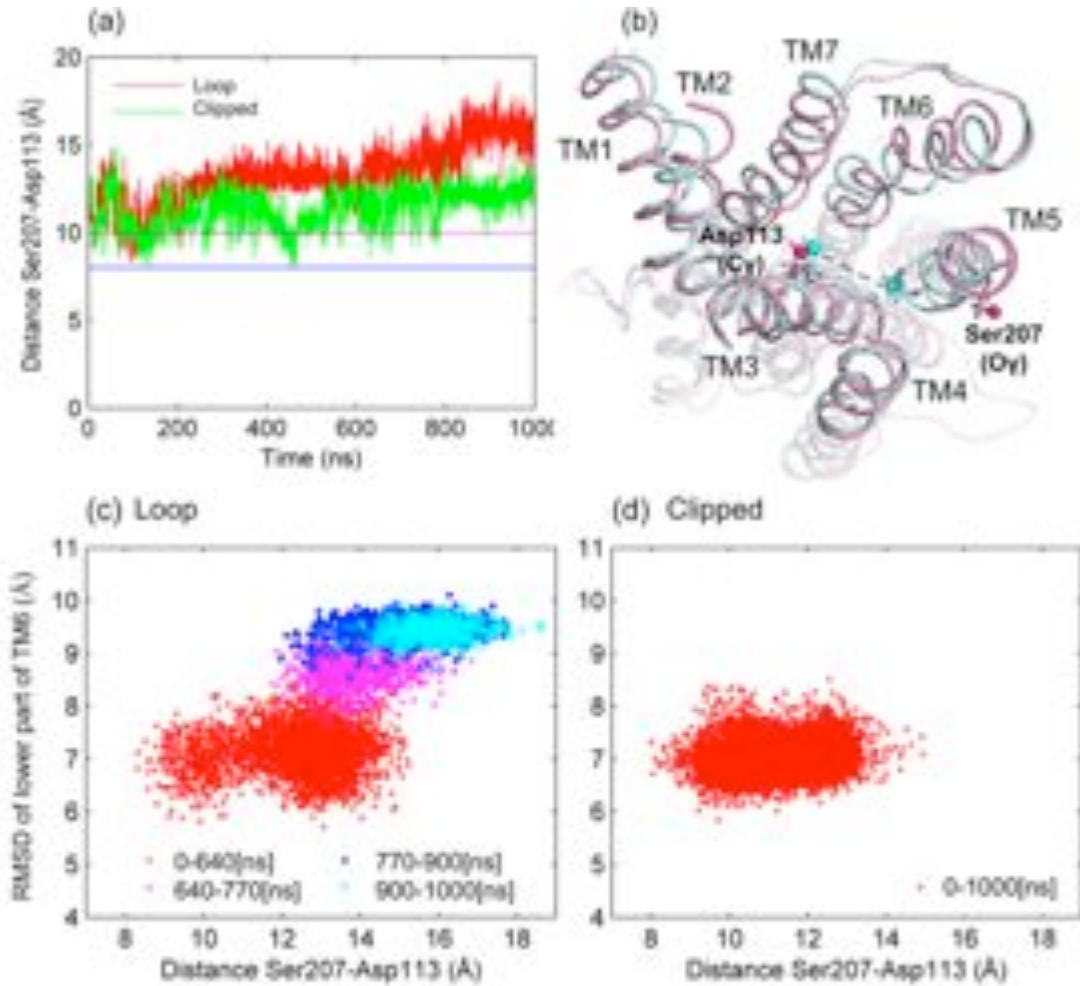


Şekil 9. (a) TM6 alt bölgesinin aktif ve inaktif yapılaraya göre RMSD değişimi (b) TM6'nın aktif (pembe), inaktif (mor), MD t=0 (mavi) ve t=1000ns (sarı) anındaki konformasyon görüntüleri (c) ICL3 ve "çekirdek" bölge ağırlık merkezleri arasındaki fark (xy düzleminde)

ICL3 düğüm bölgesinin dıştan içe doğru kapanması nümerik değerlerle Şekil 9c'de gösterilmiştir. Reseptör, ICL3 ve ICL3 dışındaki "çekirdek" bölge olmak üzere iki farklı bölgeye ayrılmıştır. Her bir bölgenin ağırlık merkezi hesaplanmış ve sadece hücre yüzeyinde (x ve y) iki bölgenin ağırlık merkezlerinin farkının simülasyon boyunca değişimi hesaplanmıştır. Şekil 9c'de y eksenini iki ağırlık merkezinin y eksenindeki farkını, x eksenini ise, iki ağırlık merkezinin x eksenindeki farkını göstermektedir. Buna göre, simülasyon boyunca, ICL3 konum itibarıyla 3 farklı konformasyon içinde görülmektedir. İlk

470 ns'lik evrede ICL3 konformasyonu oldukça geniş bir bölgede savrulularak hareket ederken, 470ns-660 ns arasındaki ikinci evrede, yavaş yavaş toparlanmaya başlamıştır. Son 340 ns'lik evrede ise, ICL3 tam anlamıyla içeri doğru kıvrılmış ve çok az konum değiştiren sabit bir hale geçmiştir. Üçüncü ve son evre, Şekil 9a'da gösterilen TM6'daki konformasyonel değişimle eş zamanlı oluşmuştur. Bu kesinlikle rastlantısal olmayıp, TM6 ve ICL3 hareketleri arasındaki sıkı korelasyonu göstermektedir. Diğer taraftan, "kırık" modeldeki altıncı sarmalda buna benzer bir hareket oluşmamıştır (Şekil 9a).

"Düğüm" modelin alt kısmındaki kapanma, üst kısmındaki bağlanma bölgesini genişletmiştir. Bu genişleme Şekil 10a'da gösterilen Ser207-Asp113 arasındaki uzaklık profilinden de anlaşılmaktadır. Yaklaşık 3 Å'luk artış, simülasyonun son evrelerinde (~ son 400-500 ns) gerçekleşmiştir. Reseptörün bu artıştan hemen önceki ve sonraki halleri karşılaştırıldığında, kritik rezidülerin birbirlerinden ne yönde uzaklaştığı açıkça görülmektedir (Şekil 10b). Uzaklıktaki bu artış, alt kısmın daraldığı, ICL3 ün içe döndüğü, dolayısıyla TM6 alt kısmın içe doğru hareket ettiği zamana denk düşmektedir. Reseptörün üst ve alt bölgelerindeki bu iki farklı konformasyonel değişim arasında Şekil 10c'de görüldüğü gibi sıkı bir korelasyon bulunmaktadır. Diğer taraftan, "kırık" modelin uzaklık profilinde ya da korelasyon haritasında ciddi bir değişim gözlemlenmemektedir (Şekil 10a, d).

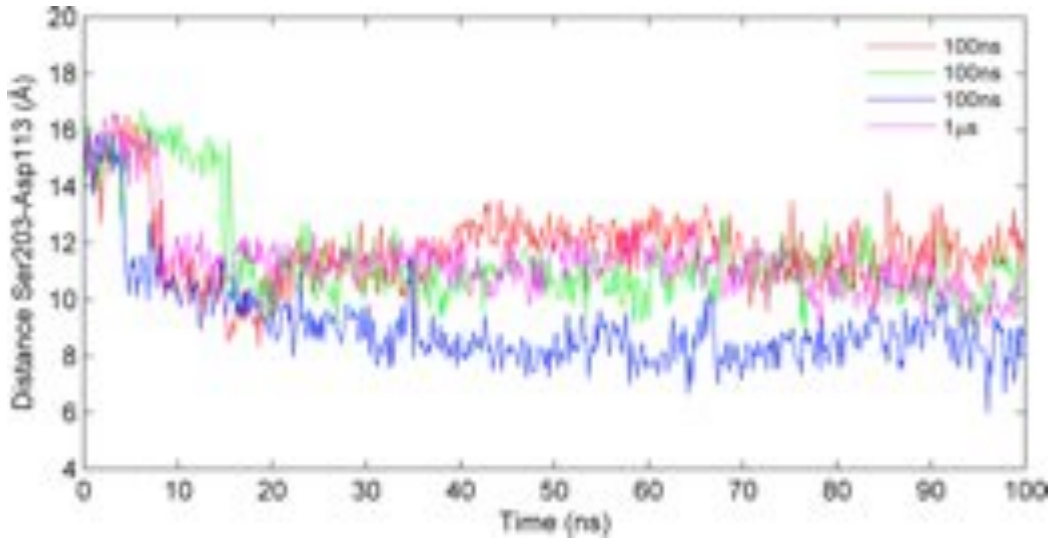


Şekil 10. (a) Ser207-Asp113 uzaklık değişimi (b) Değişimden önce (mavi) ve sonraki (pembe) durum. TM6 alt kısmın aktif hale göre RMSD'si ve Ser207-Asp113 uzaklık arasındaki korelasyonun (c) "düğüm" ve (d) "kırık" modeldeki halleri.

Beşinci sarmaldaki Ser207 ve üçüncü sarmaldaki Asp113 hem agonist, hem de antagonist'ler için kritik rezidüldür. Ser207'nin yan grubundaki oksijen (OG) atomu, ligant moleküldeki "catechol" aromatik grubundaki nitrojen ile hidrojen bağı kurarken, Asp113 ise ligant molekülün polar ucu ile etkileşmektedir. Deneysel çalışmalarda, Ser207-Asp113 arası uzaklık değeri, reseptörün aktif formunda 8 Å ve 10 Å arası, inaktif formunda ise 11-12 Å civarında ölçülmüştür (Simpson, 2011). İnaktif halde bu değerlerin daha yüksek olması, bağlanma bölgesinin aktif haldekine göre daha geniş olduğunu işaret etmektedir. Bu genişleme, agonistlere göre daha büyük olan antagonistler için bölgeyi son derece elverişli hale getirmektedir.

"Düğüm" model için 1 µs'lik simülasyon dışında her biri farklı başlangıç konum ve hızlardan başlayan 100'er ns'lik üç kısa simülasyon daha koşturulmuştur. Zira, bazen simülasyonlar uzun olsa da, sistem dar bir çerçevede kalarak, diğer bir değişle enerji eşiğini aşamayıp yeterli sayıda konformasyon taraması yapamamaktadır. Oysa, kısa simülasyonlar farklı başlangıç koşullarından başladığı için, farklı enerji bölgelerinde bulunabilirler. Bu da farklı konformasyonlar anlamına gelir.

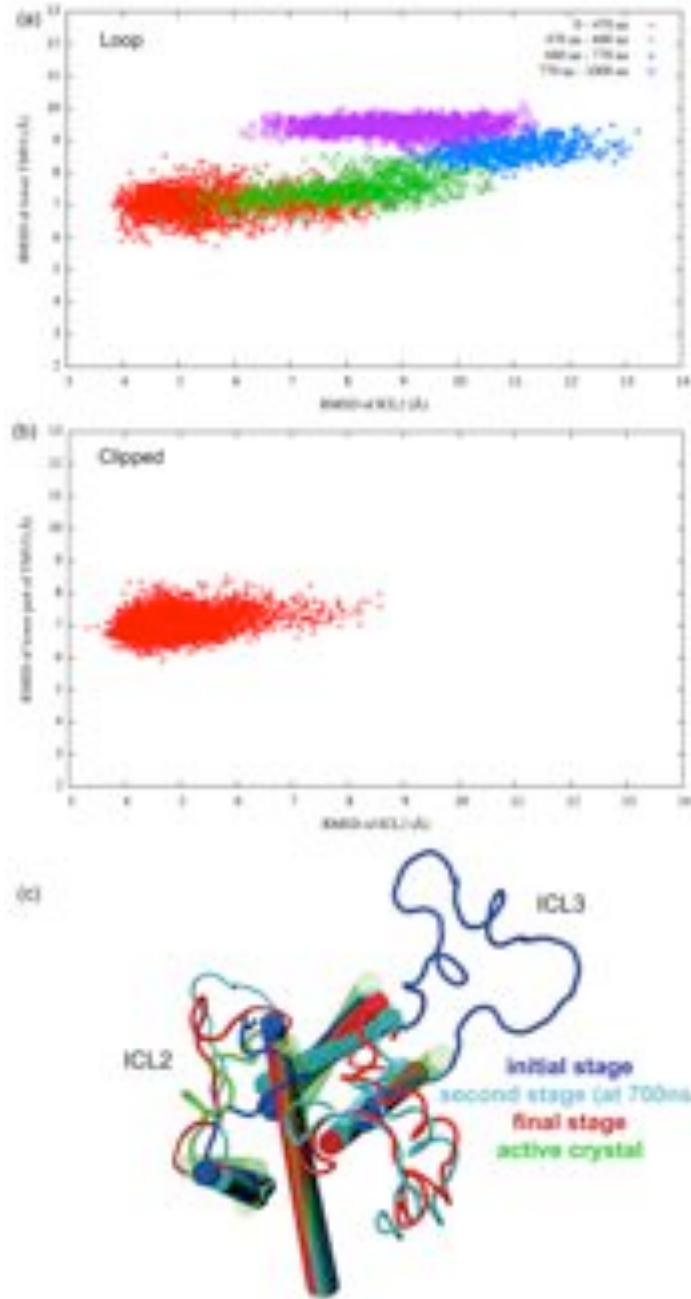
Şekil 11'de her üç simülasyon için Ser207-Asp113 uzaklık profili gösterilmiştir. Profilin ilk 20 ns'lik evresinde görülen değişim reseptörün kerpeten modelini açıkça destekler niteliktedir (Bokoch, 2010). Doğada bilinen β₂AR reseptörü üst kısım açıkken alt kısım kapalı (aksinde de aynı) bir konformasyonu tercih etmektedir. Reseptör, bu sayede işlevsel özelliğini kazanmaktadır. Ancak, her üç simülasyonun başlangıç konformasyonuna bakıldığında hem üst, hem de alt bölgenin açık bir konumda olduğu görülür. Bunun sebebi, reseptörün üç farklı hazırlık aşamasından geçerken kısıtlayıcı koşullar altında kararsız bir hal almasıdır. Simülasyonun ilk 20 ns'lik evresinde hem 100'er ns'lik üç simülasyon hem de 1 µs'lik simülasyon için, Ser203 ve Asp113 arasındaki uzaklık değerinde yaklaşık 16 Å'dan 11-12 Å'a kadar düşüşler gözlemlenmiştir. Bu beklenen bir durumdur, zira reseptör üst kısım kapalı, alt kısım açık olan kararlı haline geçmektedir.



Şekil 11. Ser203-Asp113 uzaklık değerinin üç adet 100'er ns'lik ve bir adet 1 µs'lik simülasyon boyunca değişim grafiği.

"ICL3" düğüm bölgesinin dinamiğinden reseptörün etkilenen bir başka bölgesi de ICL2 düğüm bölgesidir. Üçüncü ve dördüncü sarmallar arasında bulunan bu bölge de ICL3 gibi

hücre içine bakmaktadır, ancak daha kısa bir düğümdür. Şekil 12’de gösterilen ICL2 RMSD değerine göre çizilen TM6 alt kısmının RMSD değeri, bu iki bölge arasında önemli bir korelasyon olduğunu ortaya çıkartmaktadır. Her iki RMSD değeri de aktif yapıya göre hesaplanmıştır. Buna göre, simülasyon boyunca “düğüm” model üç farklı evreden geçmektedir (Şekil 12a). ICL2, ICL3 ün içe doğru kapanmasıyla kenara çekilerek ICL3 için yer açmaktadır (Şekil 12c). Son evrede, ICL2 ilk konumuna az miktarda yaklaşarak daha kararlı bir hal kazanmıştır. Buna benzer bir değişim, “kırpık” modelde gözlemlenmemiştir. Bu da, “düğüm” modeldeki ICL2’nin konformasyonel değişiminin, ICL3 hareketi ve bunun sebep olduğu TM6’daki değişim ile bağlantılı olduğunu göstermektedir.

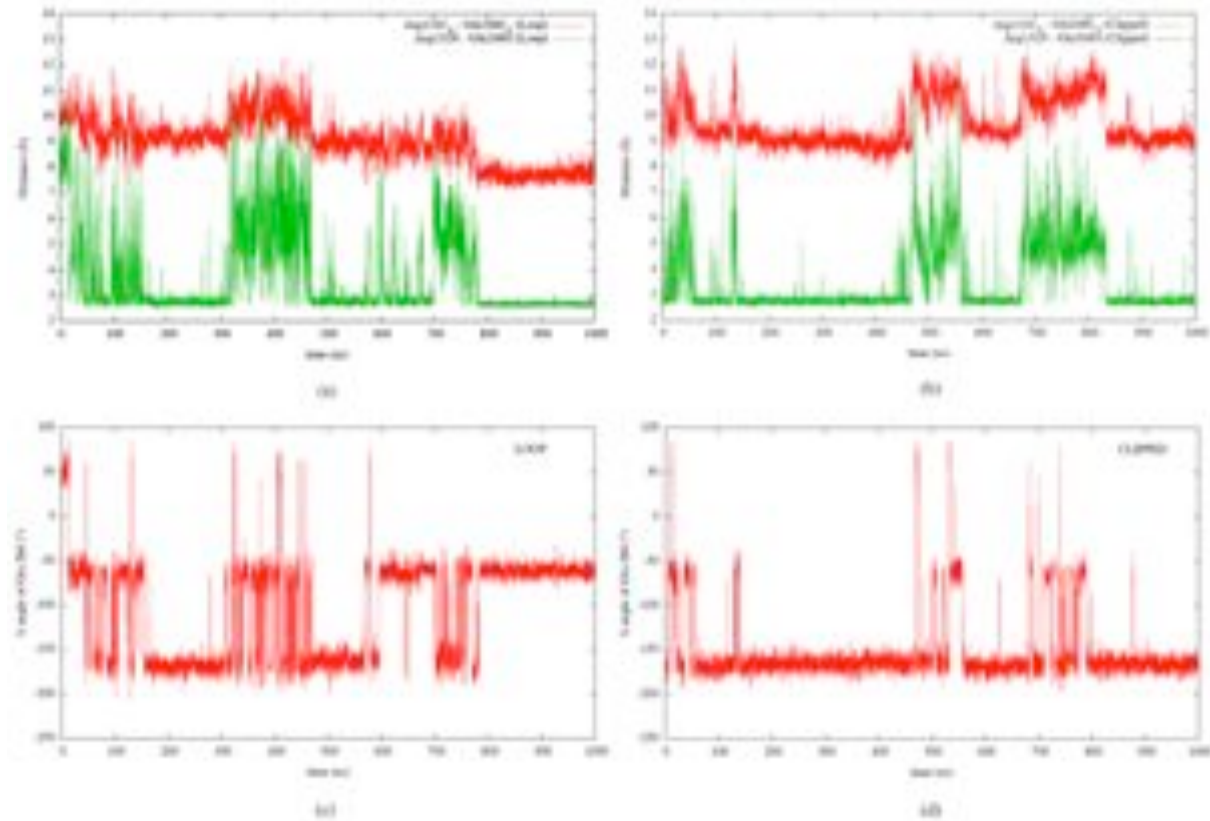


Şekil 12. ICL2 ve TM6 alt kısmının (a) “düğüm” ve (b) “kırpık” modelde aktif hale göre RMSD değerleri, (c) ICL2’nin (solda), ICL3 (sağda) ile birlikte hücre içinden görüntüsü. Şekil 11a’daki ilk evre lacivert, ikinci evre mavi, son evre kırmızı ile gösterilmiştir.

Bir diğer ilginç bulgu da, ICL3 hareketinin ICL2 dışında hücre dışına bakan ECL2 hareketini de etkilemiş olduğudur. Bu durum Şekil 8c’de verilen RMSF profillerinde de anlaşılmaktadır. ICL3 ün son 300 ns’de hareketsiz evresine geçmesiyle birlikte, ICL2 ve ECL2’e ait RMSF’lerde önemli bir düşüş gözlemlenmektedir. ECL2 hücre dışına bakan ve bağlanma bölgesine kapak görevi gören bir yapıdır. Bu yapının “kırpık” modele göre “düğüm” modelde çok daha hareketli olması (Şekil 8c), işlevsel açıdan reseptöre avantaj sağlamaktadır. ECL2’nin “düğüm” modelde daha hareketli olmasının tek nedeni ICL3 ün varlığıdır. ICL3 hareketliliği son 300 evrede önemli ölçüde azalırken, ECL2’deki hareket de benzer şekilde azalmış, ama yine de “kırpık” modeldekinden daha düşük olmamıştır.

4.1.2. Arg131 ile Glu268 arasındaki iyonik bağ moleküler bir anahtar değildir.

Daha önceki deneysel çalışmalarda TM3’teki Arg131 ile TM6’daki Glu268 rezidüleri arasındaki iyonik bağın reseptörün inaktif halden aktive hale geçerken kopması, bu bağın moleküler bir anahtar olarak gösterilmesine sebep olmuştur. Ancak bu çalışmada ve Dror ve grubunun daha önceki bir çalışmasında da gösterildiği gibi (Dror, 2009), bu iyonik bağın oluşması ile reseptörün aktif ya da inaktif halde olup olmaması arasında bir ilişki yoktur. Zira, simülasyon boyunca, her iki modelde de bu bağ bir oluşup, bir kopmaktadır (Şekil 13a,b). Bizim simülasyonlarımızda aktif hale geçiş gözlemlenmemektedir. Tam tersi, inaktif halden, bilinmeyen yeni bir inaktif hale doğru geçiş gerçekleşmiştir. Eğer sanıldığı gibi iyonik bağ inaktif hali temsil ediyorsa, bu simülasyonlarda iyonik bağın hiç kopmaması gerekirdi.



Şekil 13. TM3’teki Arg131 ile TM6’daki Glu268 rezidüleri arasındaki iyonik bağın uzunluğu (a) “düğüm” ve (b) “kırpık” modelde C-alfa (kırmızı) ve yan zincir atomları Arg131-N ve Glu268-O (yeşil) ile gösterilmiştir.

Bu çalışmada gösterilen önemli bir diğer sonuç ise, iyonik bağın kopup tekrar oluşmasının, Glu268'e ait yan zincirdeki X açısı ile alakalı olduğudur. Bu durum, Şekil 13c ve d'deki X açısı profilinden de anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, reseptörün aktif hale geçip geçmediğini gösterecek en önemli parametre iyonik bağ değil, Arg131 ve Glu268'deki C-alfa atomları arasındaki uzaklıktır. Zira, bu değer, inaktif halde 11-12 Å'a kadar çıkabilirken, aktif halde bu değer 16 Å olabilmektedir.

4.1.3. Temel dinamik (Essential dynamics) analizi “ultra inaktif” yapıya geçişi ilk temel mod'da göstermektedir.

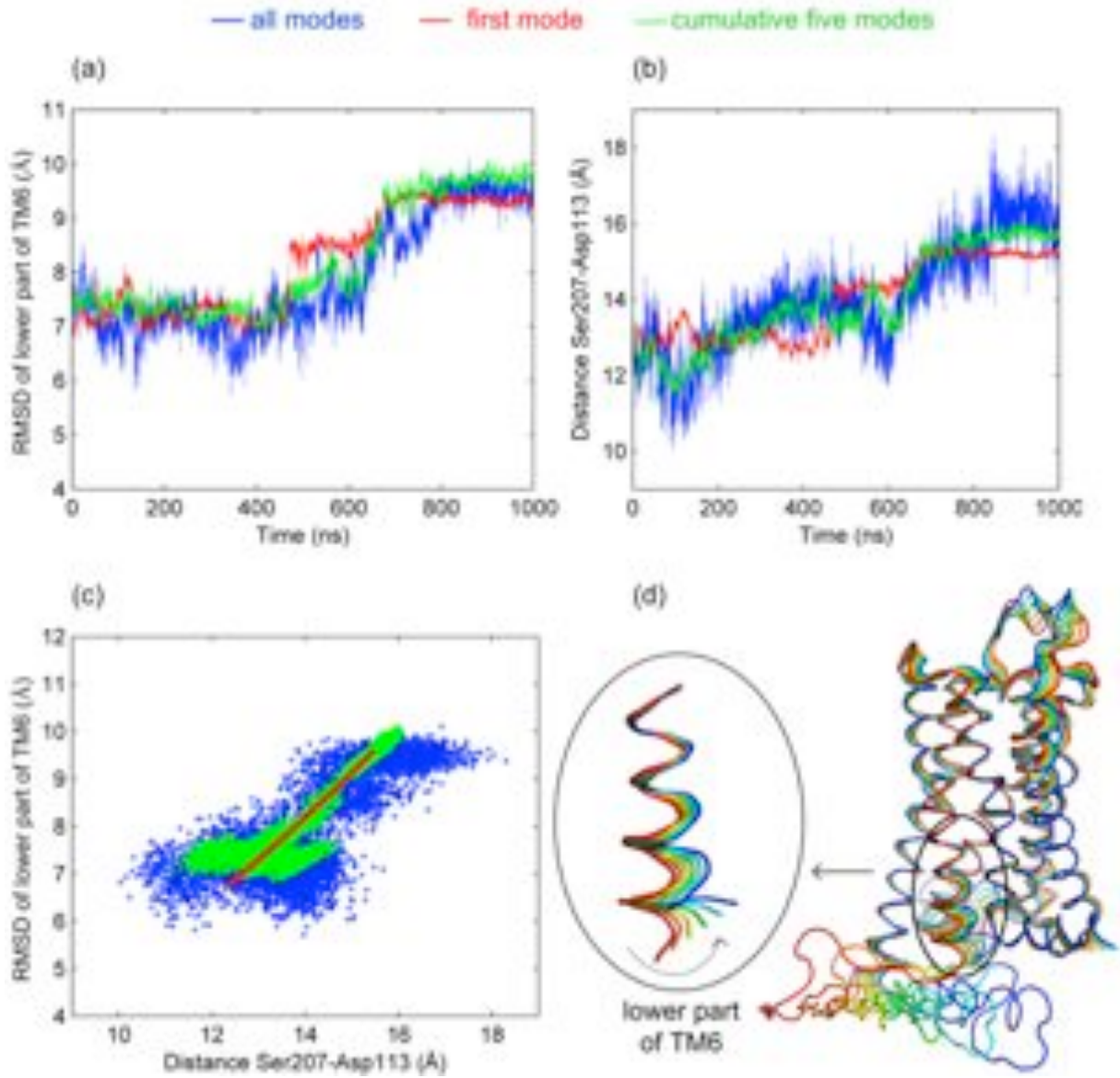
Simülasyonun tüm kaydedilen görüntüleri $t=0$ anındaki görüntüye göre hizalandıktan sonra, sadece C-alfa atomları kullanılarak, temel bileşen analizi (principal component analysis) gerçekleştirilmiştir. Her iki modele de uygulanan bu analiz sayesinde ICL3 bölgesinin temel dinamiğe olan etkisi açıklanabilmiştir (Amadei, 1993). İlk temel mod “düğüm” ve “kırpık” modelde, reseptörün toplam hareketinin sırasıyla %69 ve %22'sini açıklamaktadır.

Şekil 14a ve 14b sırasıyla TM6 alt kısmın RMSD'si ve Ser207-Asp113 arası uzaklık değeri için üç farklı profil göstermektedir. Birinci olan asıl gidişizinden (mavi, Şekil 9a'dakiyle aynı), ikinci ve üçüncü profiller ise ilk mod'a (kırmızı) ve ilk beş mod'un toplamına (yeşil) olan izdüşümlerinden elde edilen gidişizlerinden elde edilmiştir. Özellikle ilk beş modun toplamı reseptörün toplam hareketini oldukça iyi açıklamaktadır. Şekil 14c'de TM6 alt kısmın RMSD'sinin Ser207-Asp113 arası uzaklık profili ile olan korelasyon haritası gösterilmiştir. Buna göre, ilk mod'da ICL3 ün içe kapanması sonucu TM6 alt kısmın kapanması ile bağlanma bölgesinin açılması hareketlerinin çok sıkı bir biçimde bağlantılı olduğu ortaya çıkmaktadır.

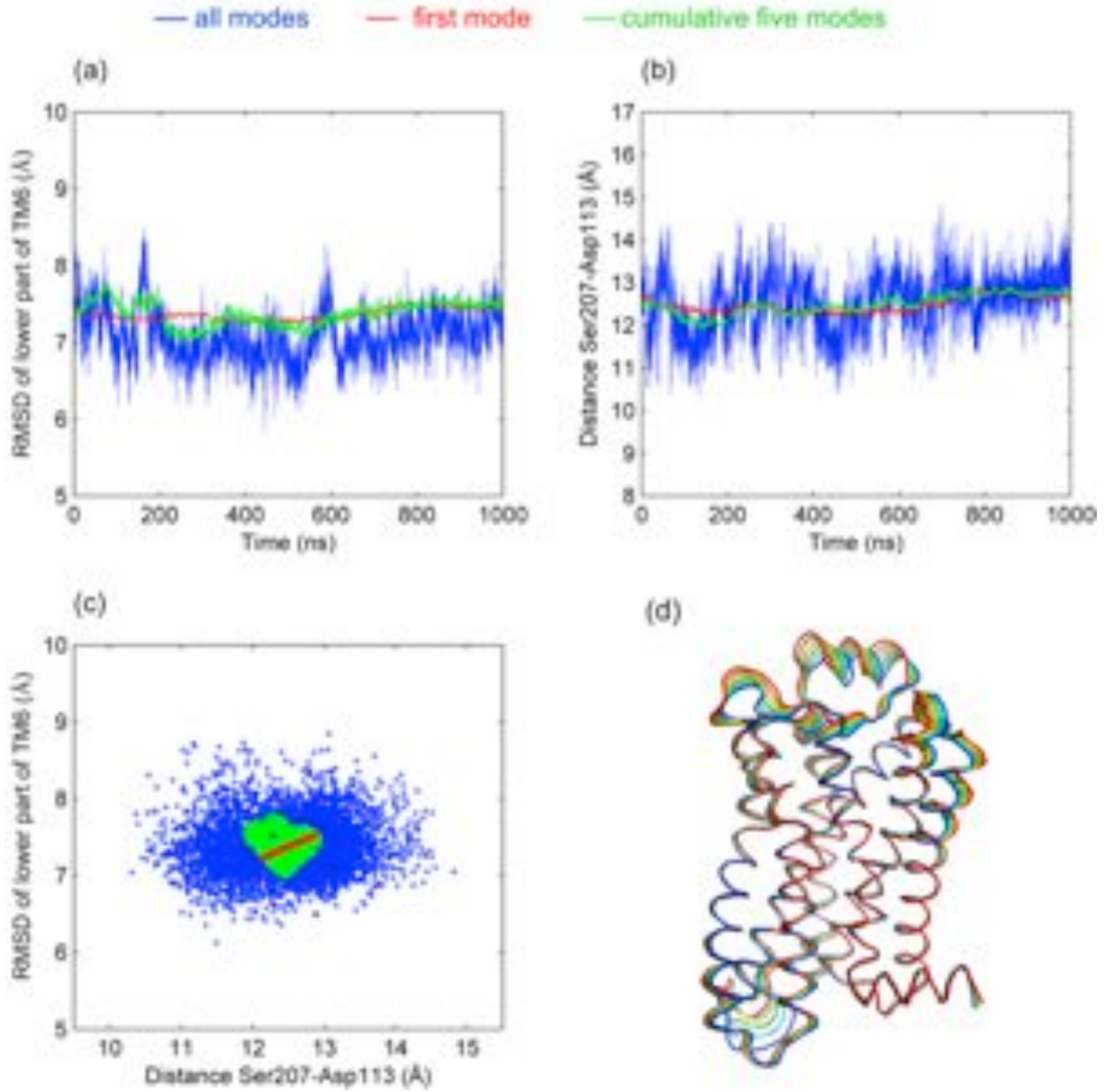
Ser207-Asp113 arasındaki uzaklık bağlanma bölgesinde agonist/antagonist moleküller ile etkileşim içinde olan iki kritik rezidüdüdür. Bu iki rezidünün hem agonist hem de antagonist'ler için optimum birer uzaklık değeri bilinmektedir. Agonist'ler antagonist'lere göre daha küçük moleküller olduklarından bu değer 8-10 Å civarındayken, antagonist'ler için 11-12 Å olabilmektedir. Bizim çalışmamızdaki simülasyonda ise bu değer 18 Å'a kadar çıkmıştır. Daha önce karşılaşılmamış bir uzaklık değeri olmasından dolayı ilginç bir sonuçtur. ICL3 bölgesinin beklenmedik bir biçimde reseptörün alt kısmına kapanıp kalması böyle bir sonucu doğurmuştur ve bunu da ilk beş temel bileşen açıklamaktadır (Şekil 14d). Buna karşılık, “kırpık” modelde TM6 alt kısmın RMSD'si ve Ser207-Asp113 arasındaki uzaklık arasında benzer bir korelasyon hiç bir temel bileşen mod'unda görülmemiştir (Şekil 15).

4.1.4. MD gidişizinden alınan görüntülerin kümelenmesi “düğüm” modelde “kırpık” modele göre daha fazla konformasyonel çeşitlilik olduğunu göstermiştir.

Her bir model için koşturulan 1 μ s'lik simülasyonlar ve üç adet “düğüm” modele ait 100'er ns'lik simülasyonlardan elde edilen yaklaşık 11500 konformasyon k -clust kümeleme algoritması ile reseptörün farklı bölgelerine göre sınıflandırılmıştır. Şekil 16a-d arası gösterilen tüm kümeleme profillerinde ilk 1000 ns “düğüm” modele, daha sonraki “1000” ns “kırpık” modele, son 500 ns'lik üç aralık ise “düğüm” modelin kısa simülasyonlarına denk gelmektedir.

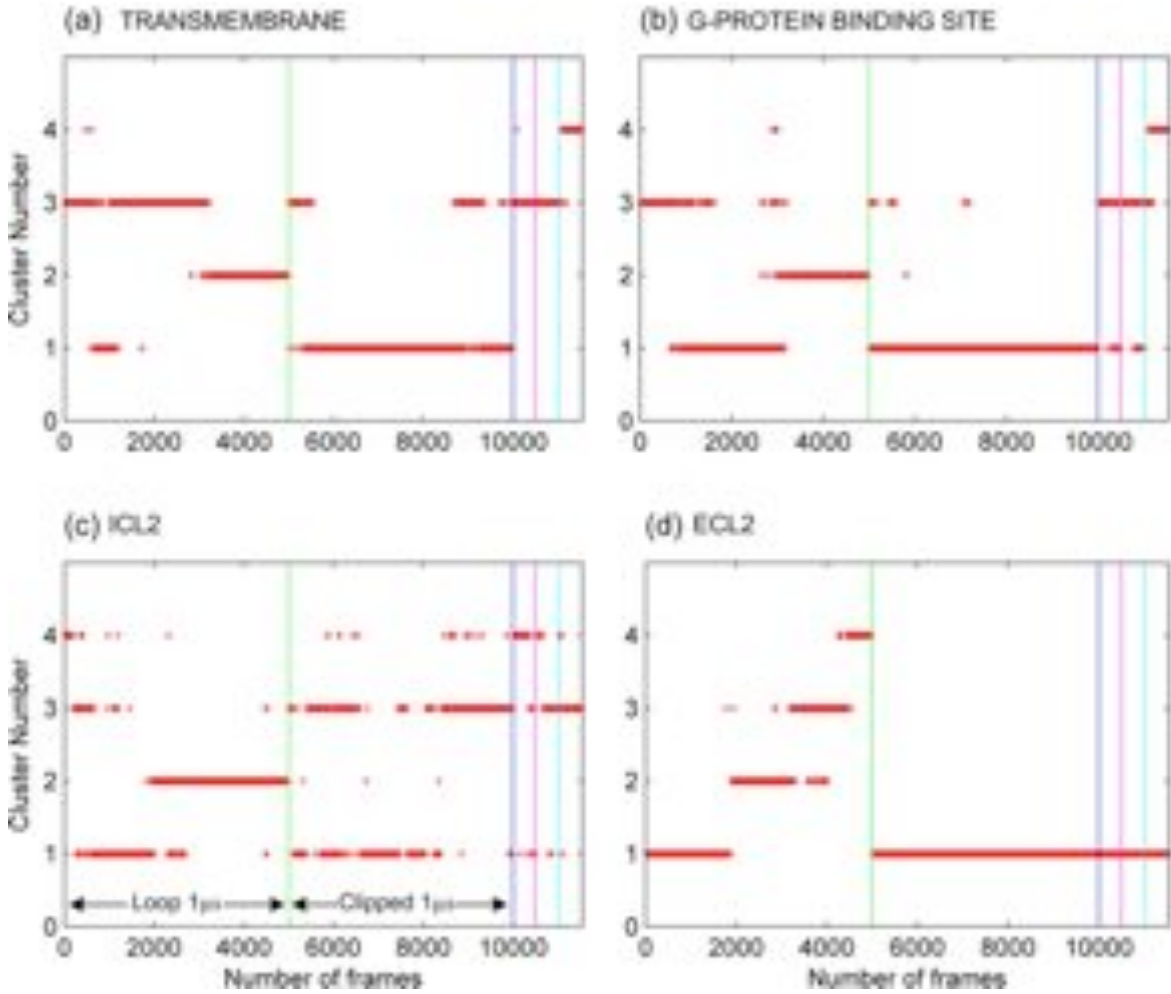


Şekil 14. “Düğüm” model için (a) TM6 alt kısmın RMSD profili (b) Ser207-Asp113 uzaklık profili (c) RMSD ile uzaklık arasındaki korelasyon haritası, original gidişizi (mavi), ilk beş modun toplamına (yeşil) ve ilk moda (kırmızı) olan izdüşümden elde edilen gidişizlerinden elde edilmiştir (d) TM6 alt kısmın ilk mod yönündeki hareketi



Şekil 15. “Kırık” model için (a) TM6 alt kısmın RMSD profili (b) Ser207-Asp113 uzaklık profili (c) RMSD ile uzaklık arasındaki korelasyon haritası, original gidişizi (mavi), ilk beş modun toplamına (yeşil) ve ilk moda (kırmızı) olan izdüşümden elde edilen gidişizlerinden elde edilmiştir (d) TM6 alt kısmın ilk mod yönündeki hareketi

Kümeleme, sırasıyla, hücre içinde kalan “transmembran” bölgesine, reseptörün alt kısmında bulunan G protein bağlandığı bölge, ICL2 ve ECL2 “düğüm” bölgelerine göre gerçekleştirilmiştir. Kullanılan RMSD, sırasıyla 1.8 Å, 1.8 Å, 3.7 Å ve 3.3 Å değerindedir. RMSD değerleri toplamda 4 küme/grup verecek şekilde ayarlanmıştır. Şekil 16’da gösterilen “transmembran” bölgesine göre olan küme profili 1 μ s’lik “düğüm” model için dört ayrı küme ortaya çıkartmıştır. Bunlardan ikisi [0-3000] ns ve [3000-5000] ns aralıklarında olup simülasyonun %54 ve %37 gibi büyük bir bölümünü teşkil etmektedir. Diğer taraftan, “kırpık” modelde sadece iki küme oluşmuştur ve bunlardan biri oldukça baskın olup simülasyonun %92’si boyunca görülmektedir. “Düğüm” model için olan kısa simülasyonlarda ise sadece bir adet küme olup, farklı bir konformasyon oluşmamıştır, zira 100 ns konformasyonel çeşitlilik için yeteri kadar uzun bir simülasyon değildir. Bunun yanı sıra, “düğüm” modelde ICL3 ün içe doğru kapandığı son evrelerde “transmembran” bölgesinin ikinci farklı kümede toplanması bir rastlantı değildir. Buna karşılık “kırpık” modelde sadece tek bir baskın küme olması, ICL3 ün eksikliğinde “transmembran” bölgesinin hareketsiz kaldığını açıkça göstermektedir.



Şekil 16. Reseptör bölgesinin dört farklı bölgesinin RMSD değerine göre “düğüm” ve “kırpık” modellerin 1’er μ s’lik ve “düğüm” modelin 100’er ns’lik üç farklı simülasyon gidişizinden elde edilen konformasyonların kümelenme profilleri

Şekil 16b, reseptörün G proteine bağlanma bölgesine göre yapılmış kümeleme sonuçlarını göstermektedir. Bu bölge reseptörün hücre içine bakan kısmında olup G proteinle etkileşim içinde olduğu rezidülerden oluşmaktadır. “Düğüm” modelde simülasyon yaklaşık üç eşit kümeye ayrılırken, “kırpık” modelde sadece tek bir küme görülmektedir. Reseptörün alt kısmının farklı konformasyonlar içinde bulunabilmesi, G protein ile olan etkileşimde önemli bir faktördür. Reseptöre bu esnekliği kazandıran da ICL3 bölgesidir.

Şekil 16c’de ICL2 bölgesine göre olan kümeleme sonuçları gösterilmiştir. Buna göre, her iki modelde de iki baskın küme oluşmuştur. Bu kümeler, “düğüm” modelde simülasyonun %29 ve %58’i, “kırpık” modelde ise %39 ve %59’u boyunca görülmektedir. Bu sonuçlar ICL3 ün ICL2 bölgesinin taradığı konformasyon uzayında farklılık yaratmadığını göstermektedir.

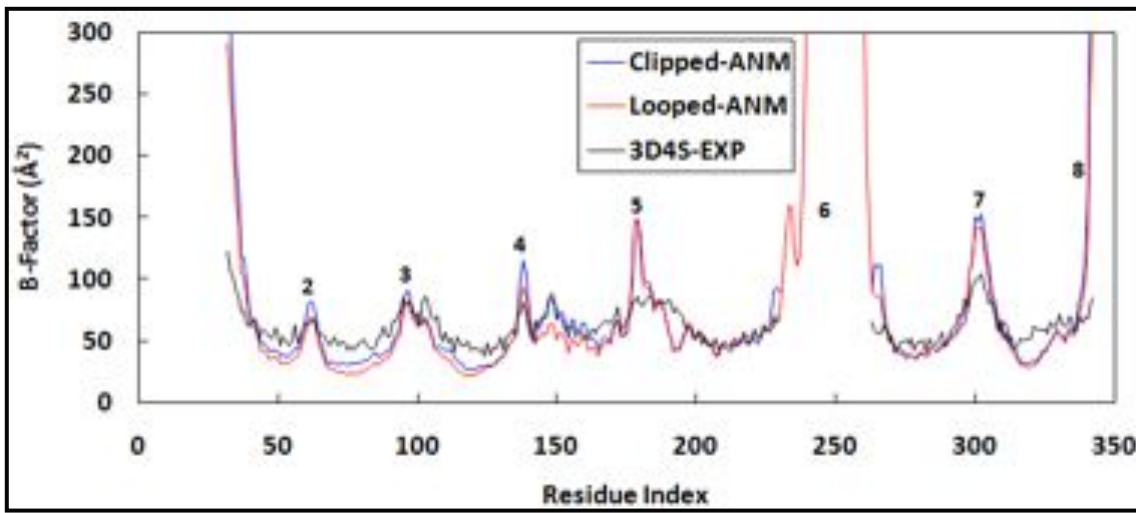
Son olarak, şekil 16d’deki ECL2 bölgesine göre elde edilen küme profiline bakılacak olursa, “düğüm” bölge için simülasyon ardışık gelen dört kümeye ayrılmıştır. Diğer taraftan “kırpık” modelde sadece tek bir küme gözlemlenmektedir. ECL2 reseptörün hücre dışına bakan bölgesinde yer almaktadır ve bağlanma çukuru için adeta bir kapak görevini görmektedir. Dolayısıyla kritik bir rolü vardır ve farklı konformasyonlar taraması reseptör için son derece önemlidir (Şekil 17). Bu farklılığa sebep olan ICL3 düğüm bölgesidir, zira konformasyondaki buna benzer bir farklılık “kırpık” modelde gözlemlenmemektedir.



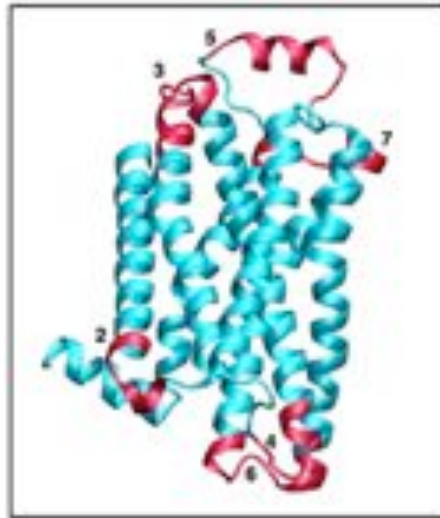
Şekil 17. ECL2 bölgesinin hücre dışından dört farklı küme için görüntüleri.

4.2. Beşinci iş paketine ait çalışma: ANM ile normal mod analizi ve konformasyon setinin oluşturulması

Anizotropik Ağ Modeli (ANM) ile yapılan çalışmalar sonucunda her iki model için benzer ve farklı hareket yönleri tespit edilmiştir. Sonuçlar, Şekil 18a'da sıcaklık (β) faktörü olarak verilmiştir. β faktörü tüm mod'ların ortalaması alınarak hesaplanmış ve deneysel β factor değerleriyle karşılaştırılmıştır. Buna göre, kullanılan teorik modelin deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Özellikle en hareketli tepe bölgeler (Şekil 18a) “kırpık” ve “düğüm” modeller için benzerlik gösterirken, deneysel verilerle de uyumludur. Bu tepe bölgelerin proteinin üç boyutlu yapısında denk düştüğü yerler “kırpık” model için Şekil 18b'deki gibi kırmızı ile belirtilmiştir.



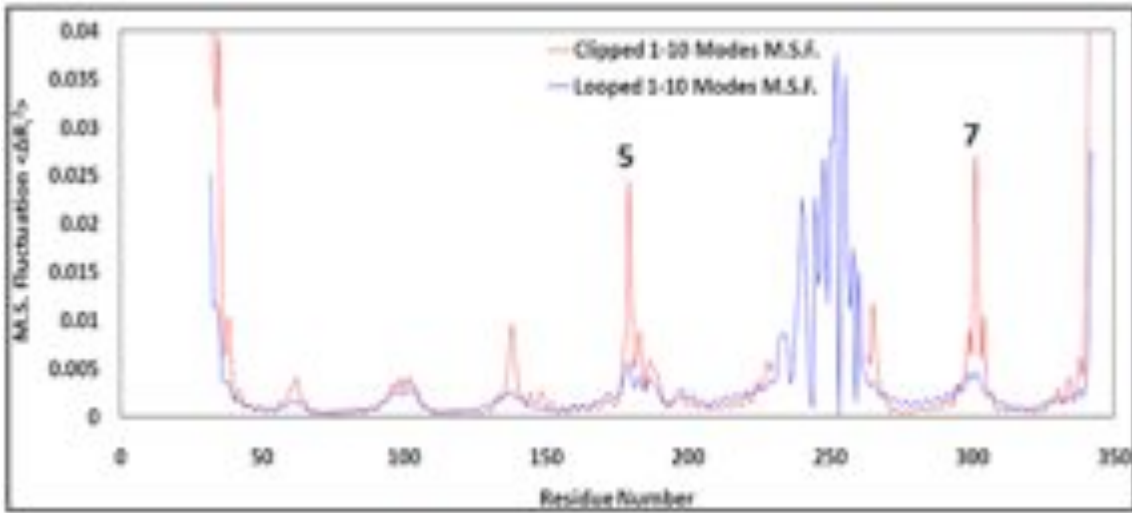
(a)



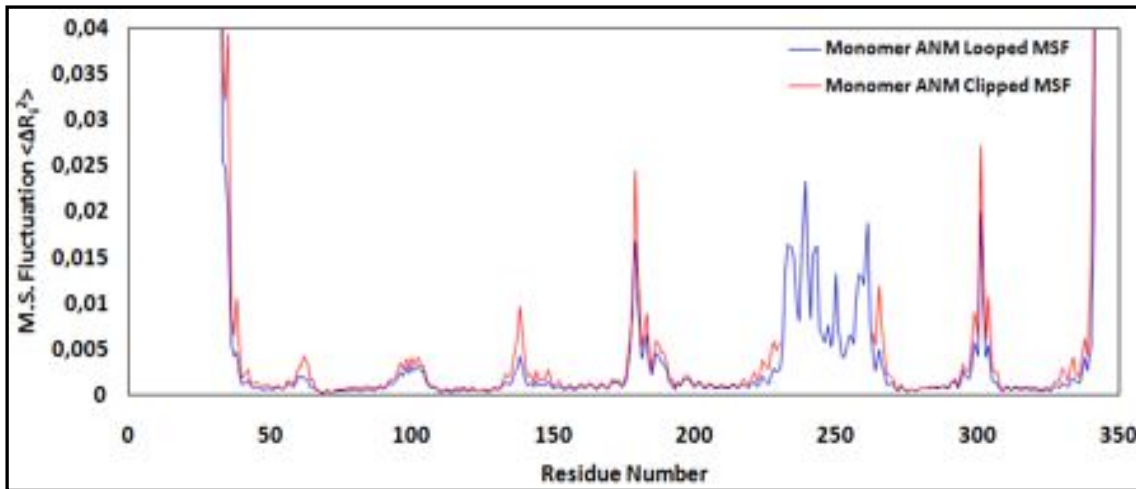
(b)

Şekil 18. “Düğüm” (looped, kırmızı) model ve “kırpık” (clipped, mavi) model için ANM modeliyle ve deneysel yöntemlerle hesaplanmış (3D4S-Exp, isyah) β faktörlerin karşılaştırmalı grafiği (b) “Kırpık” model için (a)’daki en hareketli iç bölgelerin (2-7) protein üzerindeki konumları

Düşük frekanslı (yavaş) modlar proteinlerdeki kooperatif konformasyonel hareketler hakkında son derece bilgilendiricidir. Her iki model için normalize edilmiş toplam ilk 10 yavaş modun ortalaması alınarak hesaplanmış MSF değeri Şekil 19a'daki gibi verilmiştir. MSF (dalgalanmaların ortalamasının karesi) β faktör değeri ile doğrudan ilişkili bir değerdir. Dolayısıyla, β faktör ve MSF grafikleri karşılaştırıldığında tepe bölgelerini aynı bölgelerde görmek beklenen bir durumdur. Her iki model için hareketlilik benzer bölgelerde yoğunlaşmıştır. “Kırpık” modelde, “düğüm” modele göre hareketliliğin şiddeti özellikle 5. ve 7. bölgelere denk düşen tepe bölgelerde daha fazladır. Minimum MSF bölgeleri hareketi en fazla kısıtlanmış ama kolektif hareket için kritik bölgeleri göstermektedir. Bu bölgeler, beklenildiği gibi sarmalların bulunduğu bölgelere denk düşmektedir.



(a)

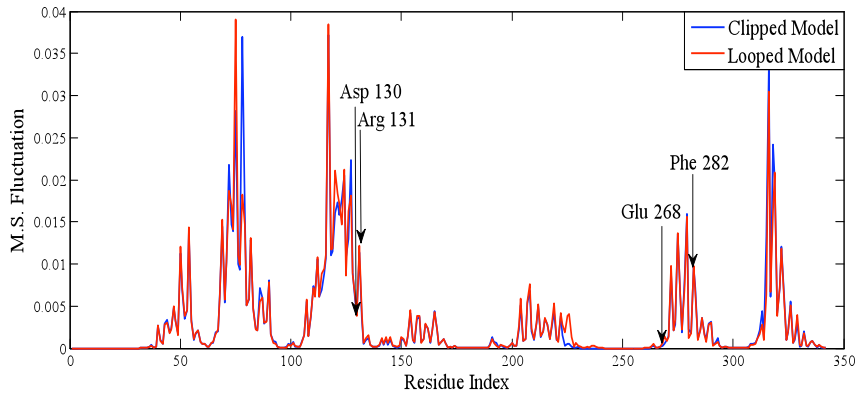


(b)

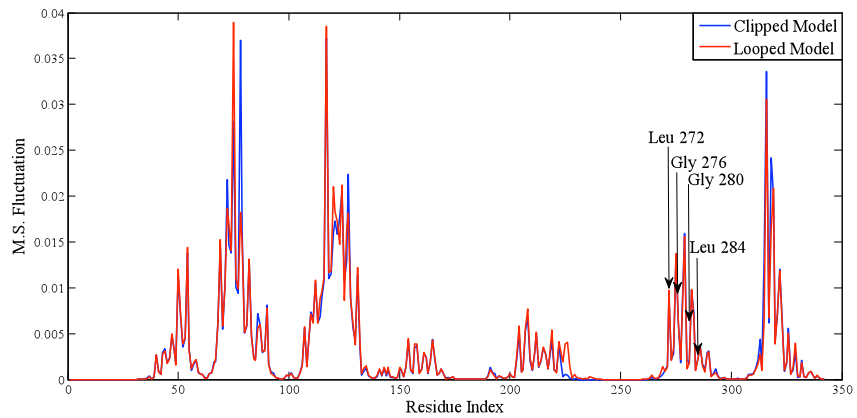
Şekil 19. Her iki model için normalize edilmiş (a) toplam ilk 10 yavaş mod için MSF (\AA) profili. (b) “düğüm” model için 5-14 arası, “kırpık” model için 1-10 arası yavaş mod alınmıştır.

“Düğüm” modele ait ilk 4 mod ICL3 bölgesinin hareketini açıklamaktadır, dolayısıyla “kırpık” modelde bulunmamaktadır. Şekil 19a’da hesaplanan MSF değerlerini her iki model için karşılaştırırken “düğüm” modelde bu bölgenin çıkartılması daha sağlıklı bir karşılaştırma sonucu doğurur. Bu yüzden, “düğüm” modelin MSF değeri 5-14 arası modların ortalaması alınarak yeniden hesaplanmış ve Şekil 19b’de gösterilmiştir. Beklenildiği üzere, iki modelin MSF değerleri birbirlerine daha yakın çıkmıştır.

Elastik ağ modellerinde yüksek frekanslı (hızlı) mod’lara bakıldığında yüksek MSF’lere sahip bölgelerdeki rezidüler “sıcak bölge” rezidüleri olarak adlandırılır (Bahar, 1998). Bu bölgeler, proteinde en kısıtlı bölgelerdir ve çoğunlukla evrimsel açıdan korunmuş bölgelere denk düşmektedir. Şekil 20’de normalize edilmiş toplam ilk 20 hızlı mod için hesaplanmış MSF profillerinden, “kırpık” modelin MSF profilinin “düğüm” modele göre daha yukarıda olduğu görülmektedir. Benzer durum yavaş modlar için de gözlemlenmiştir. Ancak hızlı mod’lar için düşünülecek olursa, yavaş modların aksine yüksek MSF değeri proteinin o bölgelerde daha fazla esnek olduğuna işaret etmez. Aksine, en fazla korunmuş ve proteinin kararlı yapısını korumada en kritik olduğu düşünülen bu bölgelerin “kırpık” modelde daha fazla kısıtlanmış (hapsolmuş) olduğunu gösterir.

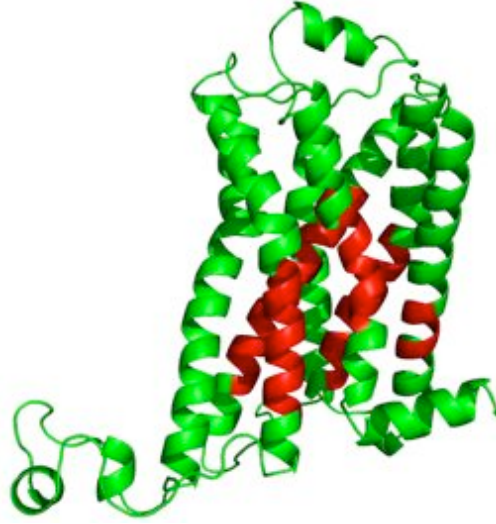


(a)



(b)

Şekil 20. Devamı arka sayfada



(c)

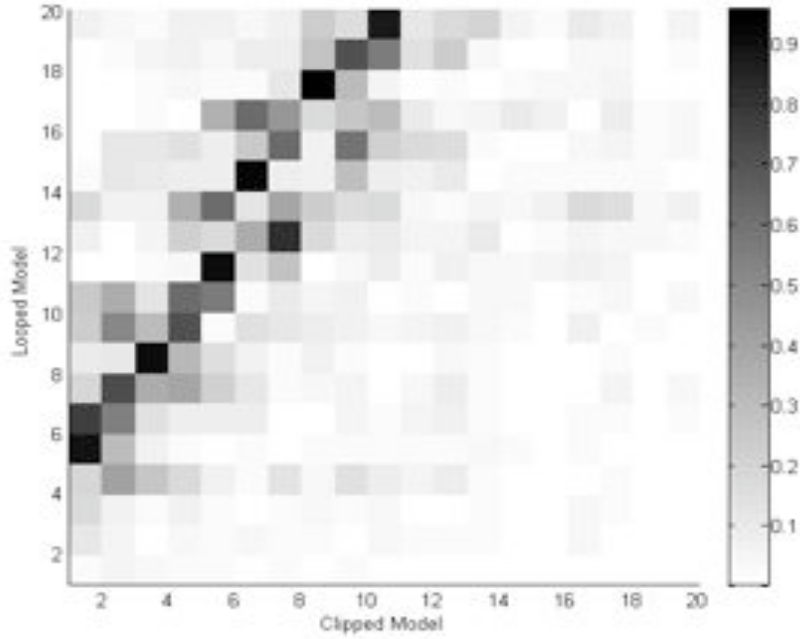
Şekil 20. Her iki model için normalize edilmiş toplam ilk 20 hızlı mod için MSF (\AA^2) profili. (Kırpık=Clipped; Düğüm=Looped) (a) Asp130, Arg131, Glu268 ve Phe282 (b) Leu272, Gly276, Gly280, ve Leu284

Şekil 20a'da gösterilen ve yüksek MSF değerlerinden (0.01) birine sahip olan Phe 282 mütasyon çalışmalarında (Che, 2002) altıncı sarmal üzerinde bulunmaktadır ve üçüncü ve altıncı sarmal arasındaki etkileşimde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Zira, bu rezidünün mütasyona uğratılması sonucu iki sarmal arasındaki etkileşim zayıflayarak, proteinin aktif hale geçtiği gözlemlenmiştir. Benzer bir durum, Asp 130, Arg 131 ve Glu 268 rezidüleri için de geçerlidir. Asp130 – Glu 268 arasında oluşan tuz köprüsü üçüncü ve altıncı sarmallar arasındaki etkileşimi kuvvetlendirmektedir. Üçüncü sarmal üzerindeki Asp 130 - Arg 131 arasındaki tuz köprüsü ise üçüncü sarmalı daha kararlı yapmaktadır (Rasmussen, 1999). Şekil 20a'da görüldüğü gibi bu dört kritik rezidüden üçünün MSF değeri 0.004'ün üstünde çıkmıştır. Sadece Glu268 MSF değeri “düğüm” ve “kırpık” modelde sırasıyla 0.0003 ve 0.0006 olarak beklenilenden düşük çıkmıştır. Buna rağmen, MSF değeri yüksek olan bölgenin yakınında bulunmaktadır. Şekil 20c'de “sıcak” bölgelerin proteinin üzerindeki konumu gösterilmektedir. Beklenildiği gibi, sıcak bölgelerin çoğunlukla proteinin orta ve iç kısımlarında kısıtlı bir alanda yoğunlaşmış oldukları görülmektedir.

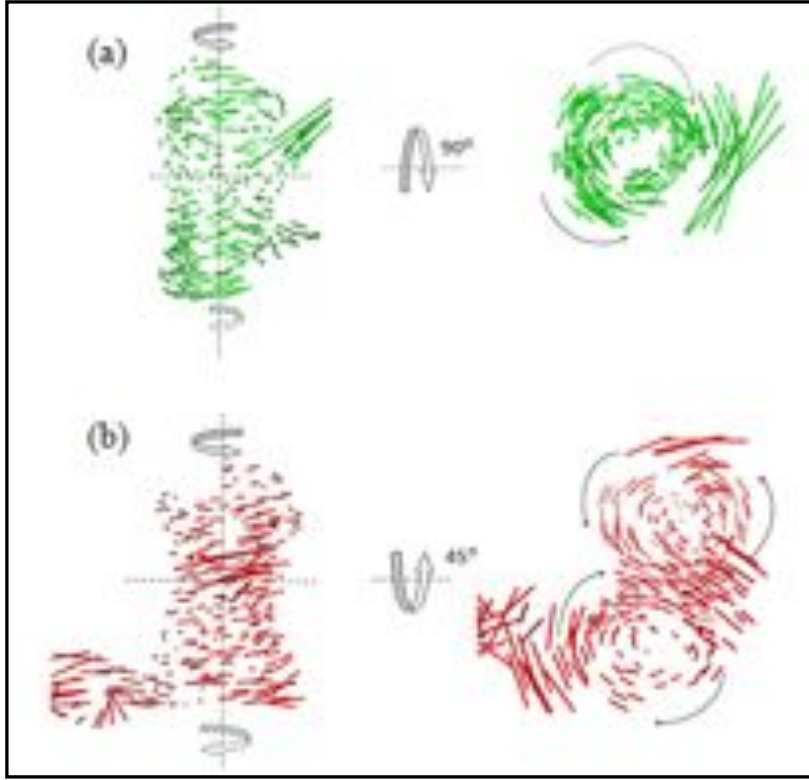
Şekil 20b'de aynı MSF profili üzerinde, dört rezidü gösterilmiştir. Bu rezidüler, β_2 AR için **LKTLGIIMGTFTL** motifini oluşturmuş olup, glikoforin A proteini için öne sürülen **LIXXGVXXGVVXT** dimerizasyon motifinden yola çıkılarak belirlenmiştir. Glikoforin A için bu motifin proteinin dimerizasyonu sırasında monomerler arası etkileşimi sağladığı ve evrimsel açıdan korunmuş olduğu düşünülmektedir. Bir deneysel çalışmada (Hebert, 1996) β_2 AR için ortaya çıkartılan benzer motifin de aynı korunmuş özelliğe sahip olabileceği düşünülerek bu motifi içinde barındıran bir peptid sentezlenmiştir. Sonuçta, peptidin bu bölgeyi bloke edilerek reseptörün dimerizasyonunu engellendiği görülmüştür. Dolayısıyla, β_2 AR'daki bu motifin benzer şekilde dimerizasyonda önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Beklenildiği üzere, ANM modeli, bu dört rezidünün hepsini MSF'in yüksek olduğu bölgelerde tahmin edebilmiştir.

4.2.1. Örtüşüm Matrisi (Overlap Matrix):

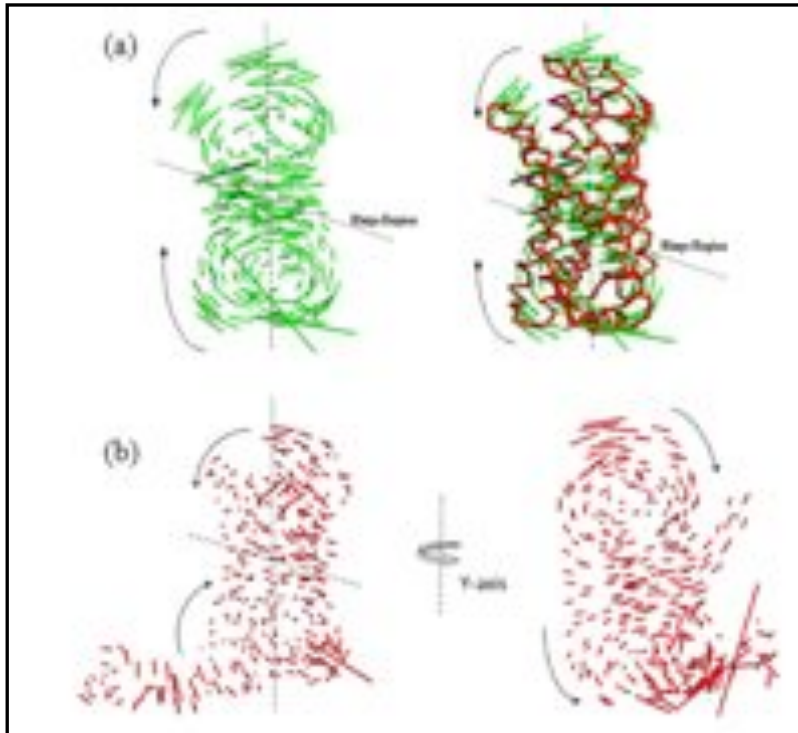
İki modun benzerlik derecesini ortaya çıkartmak amaçlı hesaplanmaktadır ve iki mod'a ait özvektörlerin nokta çarpımlarından elde edilir ($u_i \cdot u_j$). Bu değer 1'e eşit olması, iki vektörün aynı yönde, 0 olması ise ters yönlerde olduğunu gösterir. Şekil 21'deki grafiklerde [0-1] aralığı, beyaz ve siyah arasındaki gri tonları ile belirtilmiş olup, "düğüm" ve "kırpık" modeller için belirlenen düşük frekanslı modlar arasındaki benzerliği göstermektedir. Buna göre, "düğüm" (looped) modelin ilk dört modu, "kırpık" modelin hiç bir modu ile benzeşme göstermezken, benzerlikler beşinci mod'dan sonra ortaya çıkmaktadır. Örneğin "düğüm" modelin beşinci ve sekizinci modları, sırasıyla "kırpık" modelin birinci ve üçüncü modlarıyla örtüşmektedir. Bu mod'lardaki hareketler Şekil 22 ve 23'de yönleri ve büyüklükleriyle gösterilmiştir. Bunun dışında, "düğüm" modelin "kırpık" modelde benzeri olmayan ilk dört modu için yön ve büyüklükler Şekil 24'de verilmiştir.



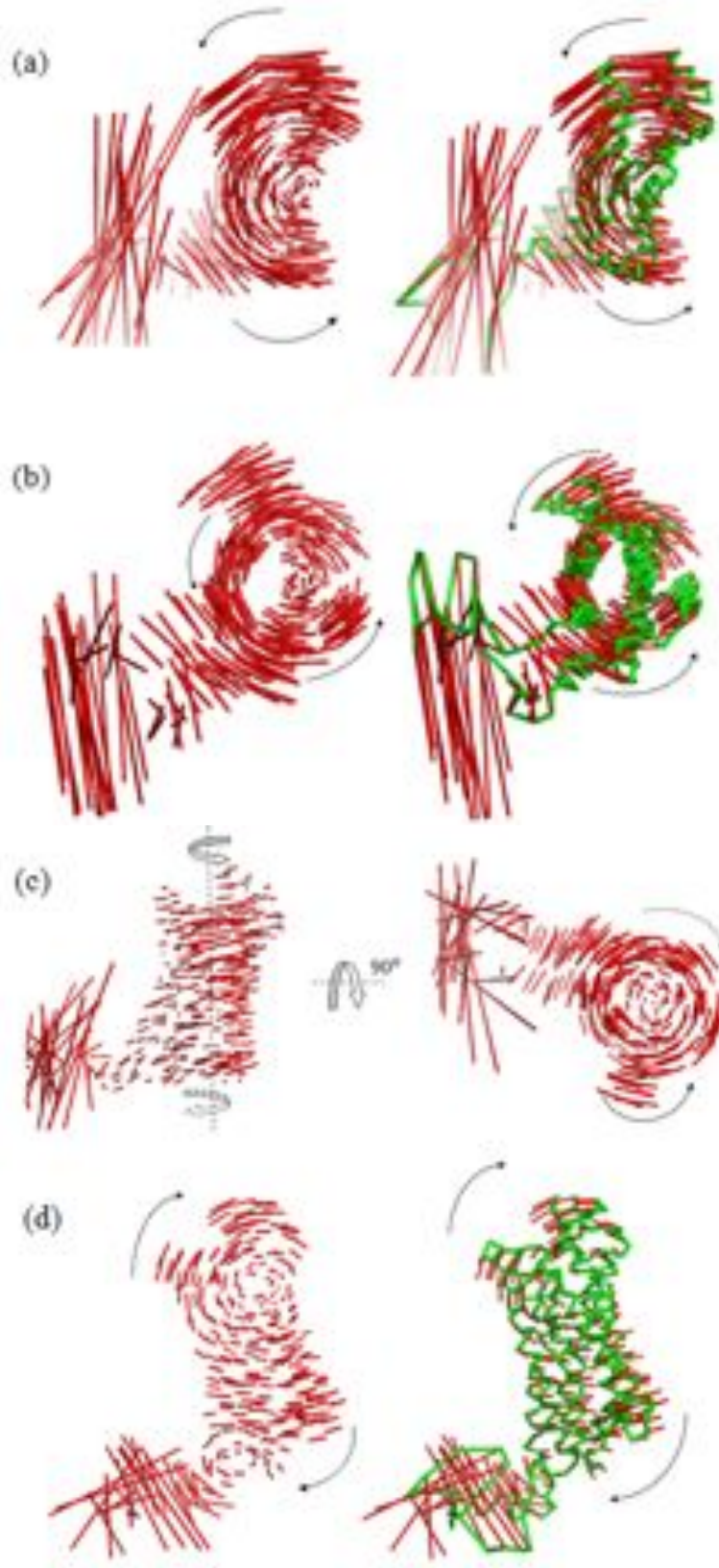
Şekil 21. "Kırpık" (Clipped) ve "Düğüm" (Looped) modellerin yavaş modları arasındaki örtüşme matrisi. 0-1 değerleri, beyazdan siyaha doğru değişen ara gri tonlarıyla gösterilmiştir.



Şekil 22. Her iki model için farklı modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 1. yavaş mod (b) “Düğüm” model 5. yavaş mod



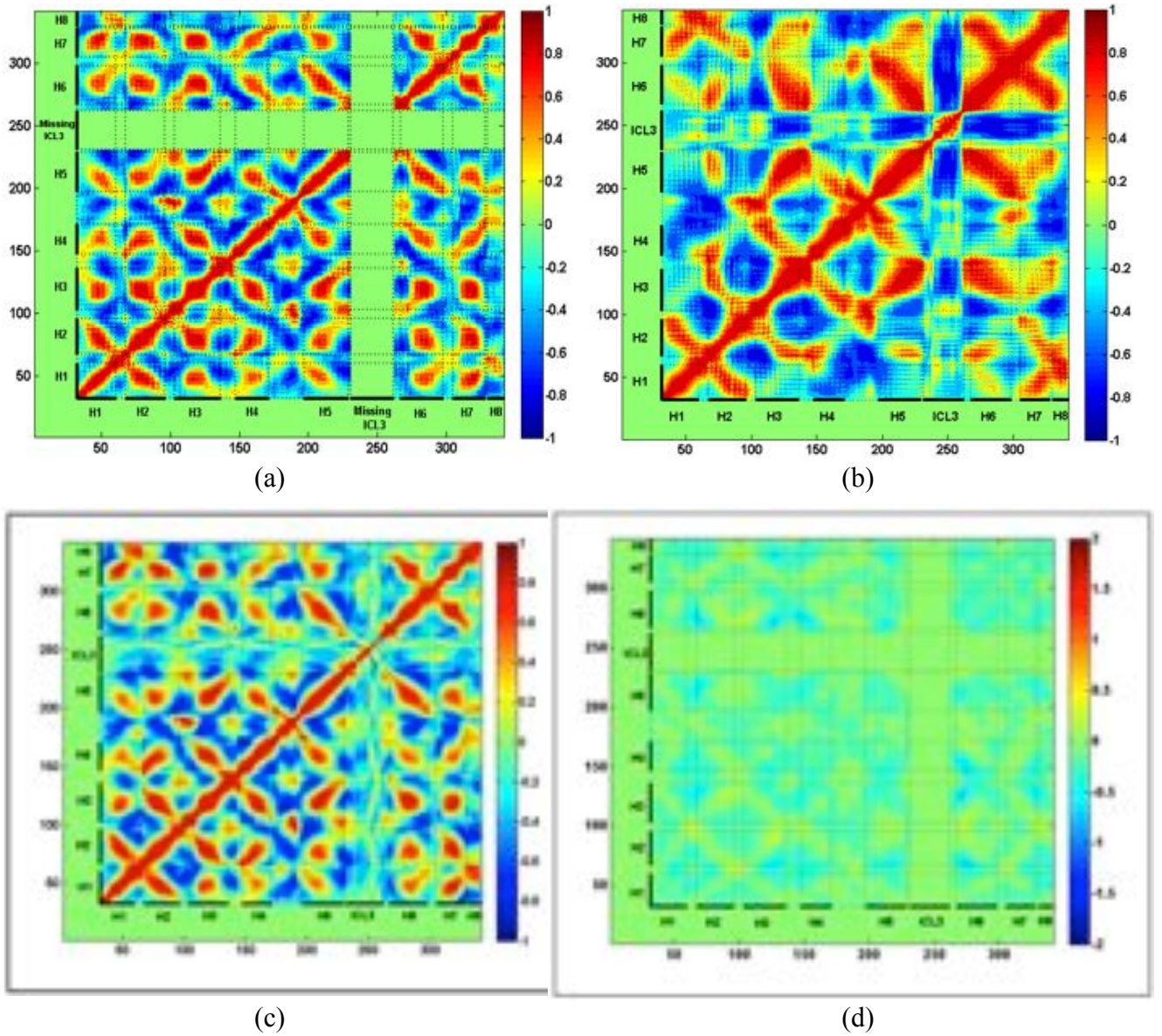
Şekil 23. Her iki model için farklı modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 3. yavaş mod (b) “Düğüm” model 8. yavaş mod



Şekil 24. “Düğüm” modelde olup “kırık” modelde benzeri olmayan ilk 4 yavaş mod

4.2.2. Yönelimsel Çapraz Korelasyon Haritaları (Orientational Cross-Correlation Maps):

ANM normal mod analizinden çıkan modlar için i ve j rezidülerine ait MSF değerlerindeki dalgalanma değerlerinin birbirleriyle olan ilişkisi, $C(i,j)$, -1'den 1'e değişen değerlerdedir. Korelasyonun olmadığı durum 0, en yüksek korelasyon 1 ve en yüksek anti korelasyon -1 değerini almaktadır. Şekil 25a'da "kırpık" modelin ilk on modu için korelasyon haritası çıkarılmıştır. Buna göre sarmalların birbiriyle bağlantılı hareket ettiği görülmektedir. Şekil 25b'de "düğüm" model için korelasyon haritasına bakıldığında korelasyonun sadece belirli sarmallarda yoğunlaşmış olduğu görülmektedir. Bunlar sırasıyla, H3-H5, H3-H6, H5-H6, H6-H7 ve H6-H8 sarmal çiftleridir. "Kırpık" modeldeki gibi homojen bir görüntü sergilememektedir.



Şekil 25. Toplam on mod için korelasyon haritası. (a) "Kırpık" model için ilk on mod, (b) "düğüm" model için ilk on mod (c) "Düğüm" model için 5-14 arası (d) Şekil 25a ve Şekil 25c'deki korelasyon haritaları arasındaki fark.

Ancak düğüm” model için ilk on mod toplamının içinde “düğüm” bölgeye özgü ilk dört mod bulunmamaktadır. Bu durum, toplam korelasyonu sarmal bölgelerin bazıları için zayıflatmış bazıları için de kuvvetlendirmiştir. İki modelin korelasyon haritalarını birebir karşılaştırabilmek için, her iki modelde uyuşan on modu almak gerekmektedir. Bu yüzden aynı harita, “düğüm” model için 5-14 arası mod’lar alınarak tekrar oluşturulmuştur. Şekil 25a ve 25c’deki benzerlik, her iki modelin sarmal bölgelerinin toplam on mod için olan kümülatif hareketlerinin korelasyonunun aynı derecede ve benzer bölgelerde yoğunlaştığını göstermektedir.

Dolayısıyla, sinyal aktarımını sağlayan sarmal hareketlerin “düğüm” bölgesinden önemli ölçüde etkilenmediği gösterilmiştir. Şekil 25d’de gösterilen korelasyon haritaları arasındaki fark bunu açıkça ortaya koymaktadır. Diğer bir deyişle, sinyal aktarımını gerçekleştiren sarmal yapıya özgü ve sarmallar arası korelasyonun yoğun olduğu bir hareketten bahsetmek mümkündür. Ayrıca bu hareket, proteinin sitoplazmaya bakan ve G protein gibi proteinlerle etkileşimini sağlayan “düğüm” bölgeden bağımsız bir şekilde gerçekleşmektedir.

Reseptörü, ANM normal mod analizi ile elde edilen farklı mod’lar yönünde belirli bir miktar hareket ettirerek farklı konformasyonların elde edilmesi düşünülmüş, ancak bu işlemin hücre zarı ortamı hesaplarda dikkate alınmadığından çok kesin sonuçlar vermeyeceğine karar verilmiştir. Bunun yerine onuncu iş paketi olarak sunulan “rezidü-tabanlı kaba taneli” (Residue-Based Coarse Grained) Moleküler Dinamik simülasyonu ve analizi gerçekleştirilmiş ve reseptörün farklı konformasyonları başarıyla elde edilmiştir.

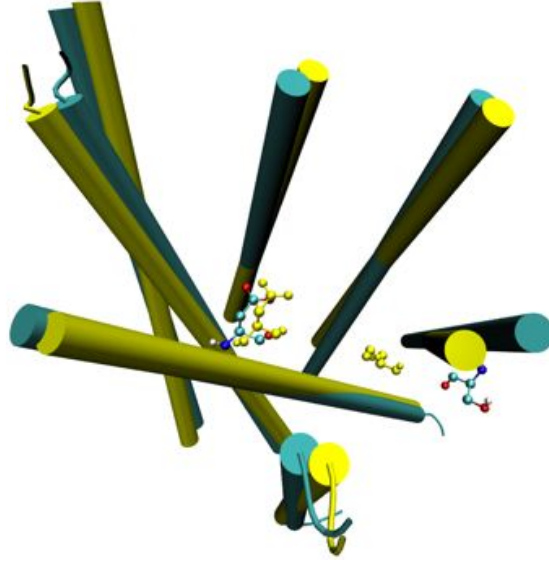
4.3. Yedinci iş paketine ait çalışma: Docking sonuçlarının analizi

Toplam 10 ligand molekül (üç antagonist, 6 agonist ve 1 partial agonist), reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiştir. Bu yapılardan üçü kristal yapısı bilinen üç inaktif (3NY8, 3NY9, 3NYA) ve bir tanesi biline aktif (3SN6) halini temsil etmektedir. Diğer ikisi ise, dördüncü iş paketinde gerçekleştirilen MD simülasyon gidişinden elde edilen bir olası inaktif ve bir olası aktif yapıdır. Bu yapıların seçimi için bağlanma bölgesindeki iki rezidü Ser207-Asp113 arası uzaklık değerinden faydalanılmıştır. Buna göre, uzaklık değerinin en düşük (8.31 Å) olduğu yapı olası aktif hal (“closed”) ve en yüksek (18.63 Å) olduğu olası inaktif hal (“open”)olarak iki konformasyon seçilmiştir. Deneysel çalışmalar (Simpson, 2011), aktif haldeki reseptörde Ser207-Asp113 uzaklık değerinin 8-10 Å arası değişebildiğini, inaktif haldeki reseptörde ise bu değer 11 Å civarında kaldığını göstermektedir. Buna göre docking için seçilen konformasyonların bağlanma bölgesi birinde aktif hali, diğerinde ise “ultra” inaktif” hali temsil etmektedir (Şekil 26). Her bir reseptör yapısı için elde edilen docking sonuçları aşağıdaki gibi verilmiştir.

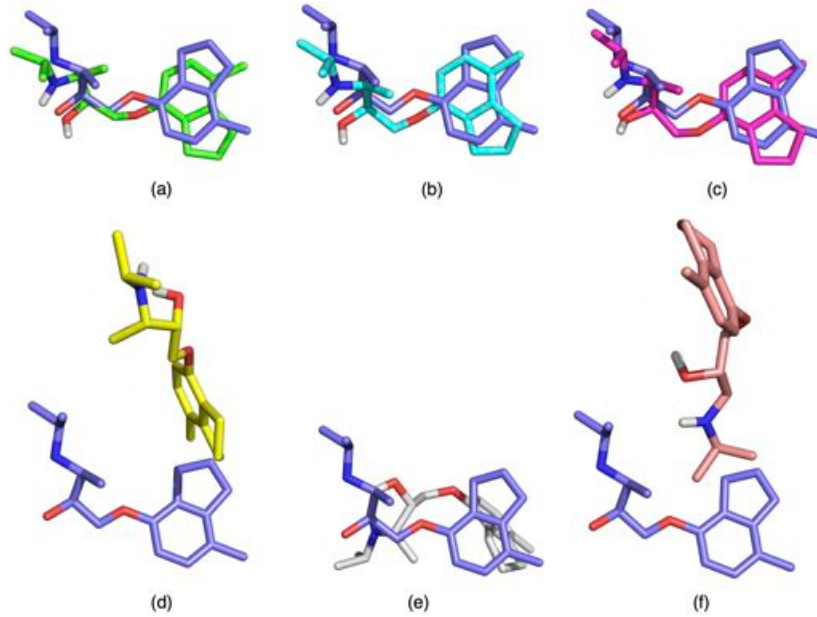
4.3.1. Antagonist’ler için docking sonuçları:

Antagonist’lerden ICI, bilinen inaktif hallere (3NY8, 3NY9, 3NYA) Şekil 26a-c’de gösterildiği gibi başarıyla dock etmiştir. Her bir docking konformasyonu, aynı zamanda ICI molekülünün 3NY8’teki bilinen yapısıyla (mavi renkte) birarada gösterilmiştir. ICI bilinen aktif hale başarısız bir şekilde dock etmiştir, docking bölgesinde yanlış rezidülerle etkileşim içindedir. MD simülasyondan elde edilen olası inaktif yapı (open) için elde edilen sonuç bilinen inaktif haller için elde edilenlerle benzerlik göstermektedir. ICI, bağlanma bölgesinde

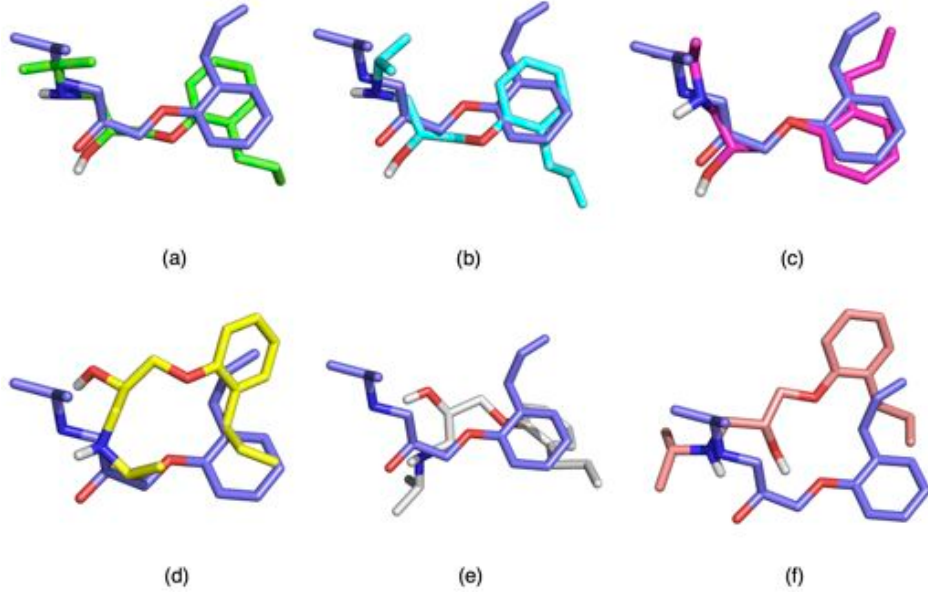
doğru bir şekilde konumlanmıştır (şekil 27e). Daha kısıtlı olan olası aktif hal dediğimiz “closed” konformasyona dock edildiğinde şekil 26f’de görüldüğü gibi yanlış bir konformasyon elde edilmiştir. Bu da 3SN6 gibi aktif hallerin kısıtlı bağlanma bölgelerinden dolayı büyük antagonist moleküller için elverişli olmadıklarını göstermektedir. Benzer bir sonuç, antagonist’lerden alprenolol ve JSZ için elde edilmiştir. şekil 28, alprenolol için elde edilen konformasyonları göstermektedir.



şekil 26. Docking uygulanan reseptörün açık (mavi) ve kapalı (sarı) konformasyonları. Sağdaki Ser207 ve soldaki Asp113 rezidüleri bilya-sopa (ball and stick) şeklinde gösterilmiştir



şekil 27. Antagonist molekül ICI için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. Her şekilde gösterilen mavi renkteki ICI molekülü 3NY8’teki bilinen doğal hali. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal “open” (gri) (f) olası aktif hal “closed” (pembe)

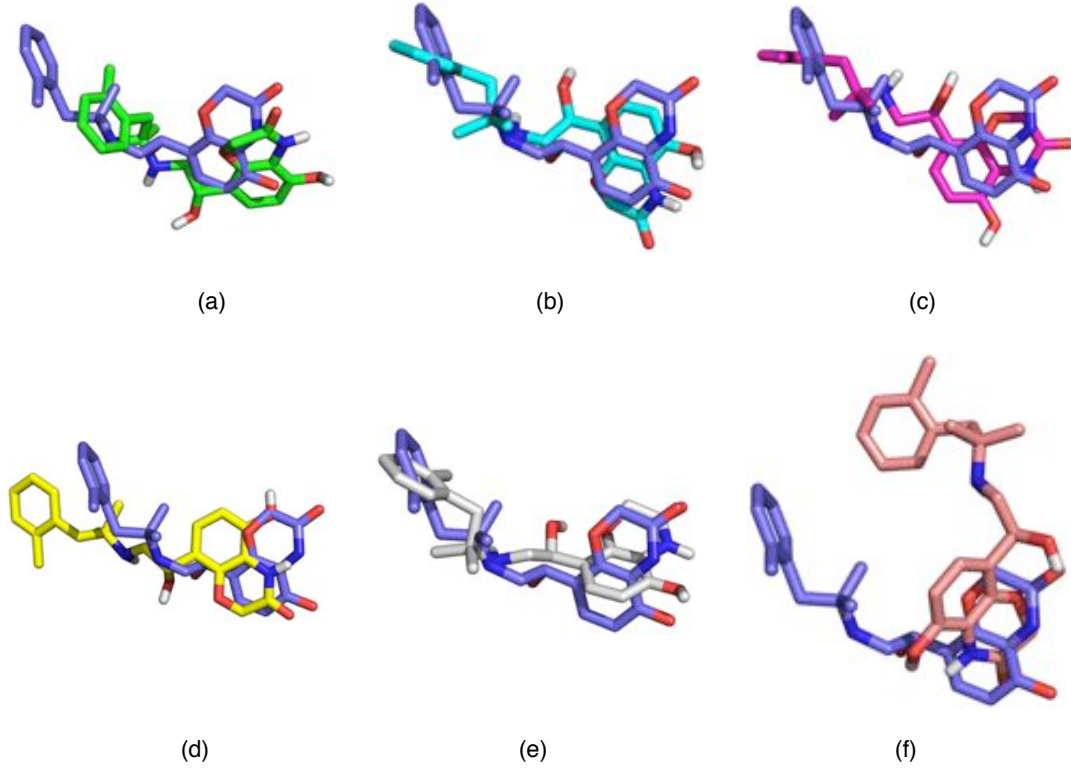


Şekil 28. Antagonist molekül alprenolol için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. Her şekilde gösterilen mavi renkteki ICI molekülü 3NY8'teki bilinen doğal hali. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)

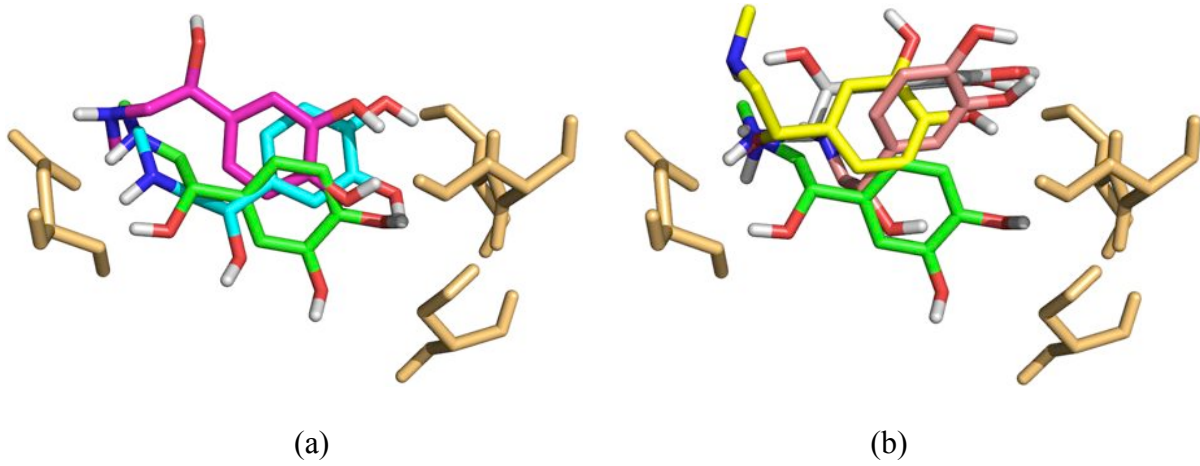
4.3.2. Agonist'ler için docking sonuçları:

POG, Şekil 3'te de gösterildiği gibi bir agonist olmasına rağmen boyut olarak antagonist'lere benzemektedir. Docking sonuçlarına bakılacak olursa, tüm bilinen aktif ve inaktif kristal yapılar ve olası inaktif (open) yapıya başarıyla dock etmiş, sadece olası aktif (closed) yapıda yanlış bir yönde konumlanmıştır (Şekil 29). Bir agonist molekülün hem aktif hem de inaktif bir yapıya başarıyla dock etmesi, bu yapıların bağlanma bölgelerindeki benzerlikle yakından ilgilidir. Ancak, antagonist bir molekül için veritabanı taraması yapılıyorsa ve inaktif kristal yapılardan biri kullanılıyorsa, agonist bir molekülü false positif olarak seçme olasılığını göz önünde bulundurmak gerekir. Bu hatayı ortadan kaldırmanın yollarından biri docking öncesi bir farmakofor model taraması yapmaktır. Zira, POG antagonist bir molekül kadar büyük olsa da, farmakofor modeli bir antagonist'inkine uyum göstermediğinden elenecektir.

Benzer şekilde ufak bir molekül olan epinephrine, "open" hal dışında tüm altı yapıya başarıyla dock etmiştir (Şekil 30). Bu sonuç, agonist molekül için veritabanı taraması yapılacaksa, kullanılması gereken reseptör yapısının dikkatli seçilmesi gerektiğini işaret etmektedir. Zira, bilinen kristal inaktif yapılar da bir aktif yapı kadar başarılı bir şekilde bir agonist molekülü bağlanma bölgesinde barındırabilmektedir. Bu da bilinen kristal inaktif hallerin tam bir inaktif hal olmadıkları, ama aktifle inaktif hal arasında bir geçiş halini temsil etme olasılıklarını ortaya çıkartır.



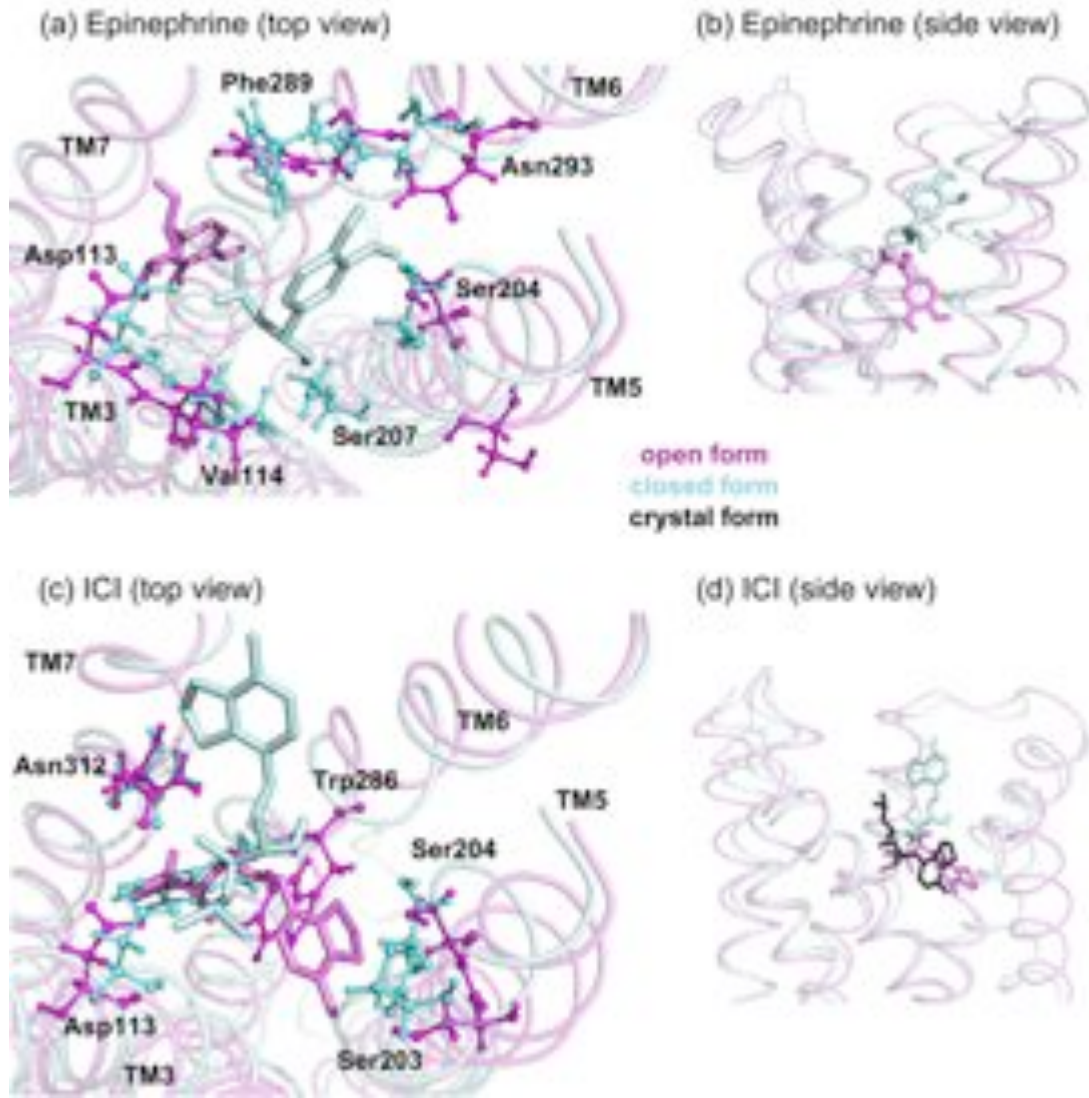
Şekil 29. Agonist molekül POG için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. Her şekilde gösterilen mavi renkteki ICI molekülü 3NY8'teki bilinen doğal hali. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)



Şekil 30. Agonist molekül epinephrine için reseptörün altı farklı konformasyonuna dock edilmiş halleri. (a) 3NY8 (yeşil) (b) 3NY9 (açık mavi) (c) 3NYA (macenta) (d) 3SN6 (sarı) (e) olası inaktif hal "open" (gri) (f) olası aktif hal "closed" (pembe)

MD simülasyonundan elde edilen olası aktif hal ("closed"), dar bağlanma bölgesinden dolayı büyük antagonist molekülleri barındıramamaktadır. Dolayısıyla, bir veritabanı taramasında nispeten büyük olan antagonist molekülleri bu olası aktif yapıyı kullanarak elemek daha olası

gözükmektedir. Benzer şekilde olası inaktif hal (“open”), geniş bağlanma bölgesinden dolayı, küçük agonist molekülleri elemek için kullanılmalıdır. Şekil 31’de agonist epinephrine ve antagonist ICI moleküllerinin bu iki farklı yapıya dock edilmiş görüntüleri verilmiştir. Epinephrine, küçük bir molekül olduğundan geniş bağlanma bölgesi olan inaktif hale dock edildiğinde, bağlanma çukurunun diplerine doğru ilerlemiştir. ICI ise, dar bağlanma bölgesine sahip aktif hale dock edildiğinde bağlanma çukuruna sığamadığından, çukurun ağzında kalmıştır.



Şekil 31. (a,b) Epinephrine ve (c,d) ICI moleküllerinin olası aktif ve inaktif hallerde dock edilmiş konumlarının hücre dışından ve yandan görüntüleri verilmiştir.

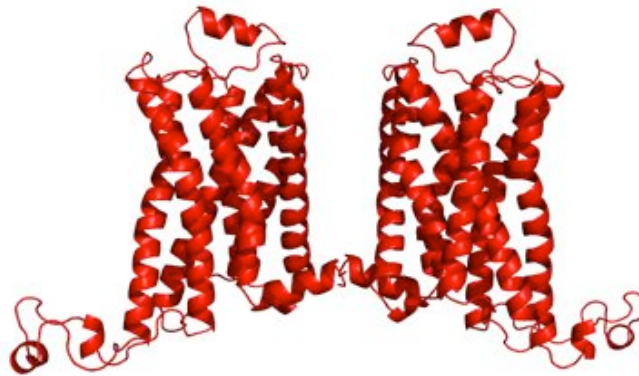
4.4. Sekizinci iş paketine ait çalışma: Reseptörün dimerik yapısının oluşturulması ve benzer yöntemlerin uygulanması

4.4.1. Kristalografik homodimerik yapıya uygulanan ANM analizi:

β_2 AR dahil olmak üzere birçok GPCR ailesine ait proteinin dimerik hatta oligomerik yapıda bulunduğu deneysel olarak gözlemlenmiştir (Angers, 2000; Goerge, 2002). Monomerlerin birbirlerine göre olan konumu, diğer bir deyişle iki monomerin etkileşim bölgesinin doğadaki hali henüz bilinmemektedir. Kristalografik çalışmalardan elde edilen dimerik yapı düzgün kristal bir yapıdan elde edilmiştir ve doğadaki halini yansıtmamaktadır. PDB veri bankasında monomer yapı için koordinatların yanı sıra, ikinci monomeri oluşturmak için gereken simetri operasyonu z ekseninde 180° olarak verilmiştir. İkinci monomerin konumu y ekseninde yer değiştirerek elde edilmiştir. Buna göre birinci ve yedinci sarmallar interfaz bölgesinde bulunmaktadır. Ancak interfaz bölgesinin doğadaki bir β_2 AR dimerik yapıda nasıl olduğu henüz bilinmemektedir. Burada yapılan çalışmanın amacı, her iki model (“düğüm” ve “kırpık”) için Şekil 32’deki gibi oluşturulan dimerik yapıların dinamikleri arasındaki farkını, buradan yola çıkarak ICL3 bölgesinin dimerik yapıda ne gibi değişikliklere sebep olduğunu ortaya çıkartmaktır.



(a)

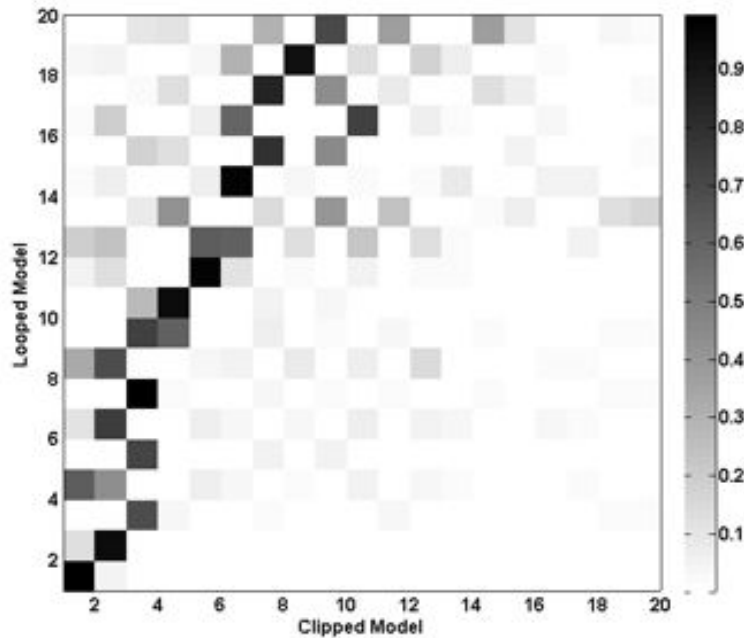


(b)

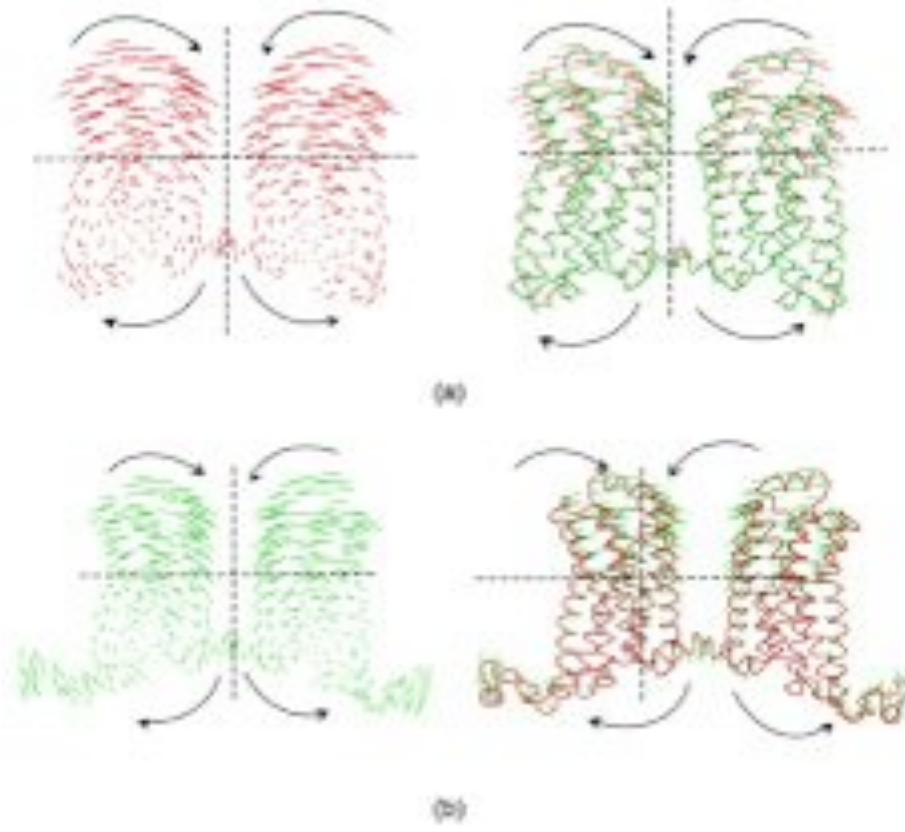
Şekil 32. β_2 AR reseptörünün kristalografik çalışmalardan elde edilen dimerik yapısı (a) “kırpık” ve (b) “düğüm” model için verilmiştir.

5. iş paketinde monomer yapıya uygulanan ANM analizi, yukarıda oluşturulan dimerik yapılar için de gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda belirlenen mod'lar *örtüşme matrisi* aracılığıyla karşılaştırılmıştır. İki modun benzerlik derecesini ortaya çıkartmak amaçlı kullanılan *örtüşme değeri*, iki mod'a ait özvektörlerin nokta çarpımlarından elde edilir ($u_i \cdot u_j$). Bu değer 1'e eşit olması, iki vektörün aynı yönde olduğunu, 0 olması ise ters yönlere baktığını gösterir. Şekil 33'teki grafiklerde [0:1] aralığı, beyaz ve siyah arasındaki gri tonları ile belirtilmiş olup, "düğüm" ve "kırık" modeller için belirlenen düşük frekanslı modlar arasındaki benzerliği göstermektedir. Buna göre, "kırık" (clipped) modelin 1. ve 2. ve 3. modları, sırasıyla "düğüm" (looped) modelin 1. 2. ve 7. modlarıyla örtüşmektedir. Bu mod'lardaki hareketler Şekil 34-36'da yönleri ve büyüklükleriyle gösterilmiştir.

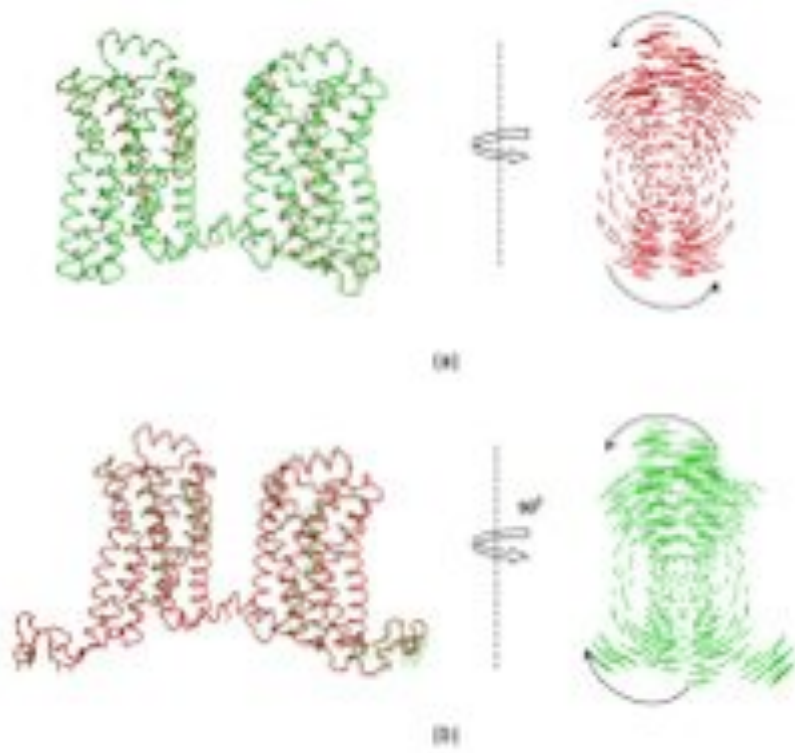
Dimerik yapılarda, monomer yapıdaki gibi "düğüm" modelde olup ta "kırık" modelde olmayan ICL3 hareketini açıklayan ilk dört mod ortaya çıkmamıştır. Her iki modele ait ilk mod'lar birbirleriyle örtüşmektedir. Özellikle "kırık" modelin ilk dört modu, "düğüm" modelin ilk on moduyla az ya da çok örtüşmektedir. Bu sonuç, ICL3 bölgesinin monomer yapıda olduğu gibi dimerik yapıda baskın olmadığını gösterir. Diğer bir deyişle, dimerik yapının dinamiği, ICL3 dışında kalan bölgeler tarafından belirlenmektedir.



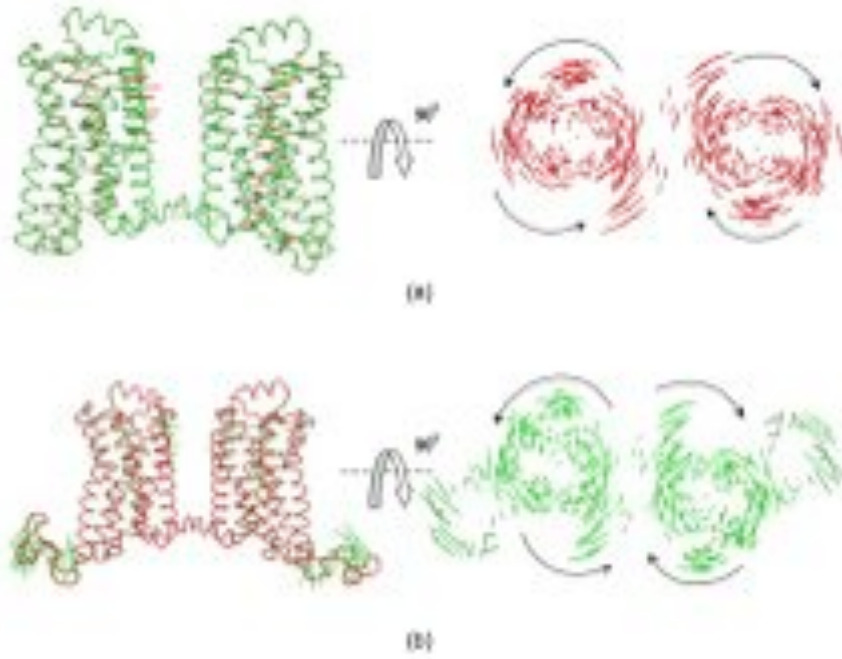
Şekil 33. "Düğüm" ve "kırık" model dimer yapılar için yavaş modlar arasındaki örtüşme matrisi. 0-1 değerleri, beyazdan siyaha doğru değişen ara gri tonlarıyla gösterilmiştir.



Şekil 34. Her iki model için belirli modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 1. yavaş mod (b) “Düğüm” model 1. yavaş mod

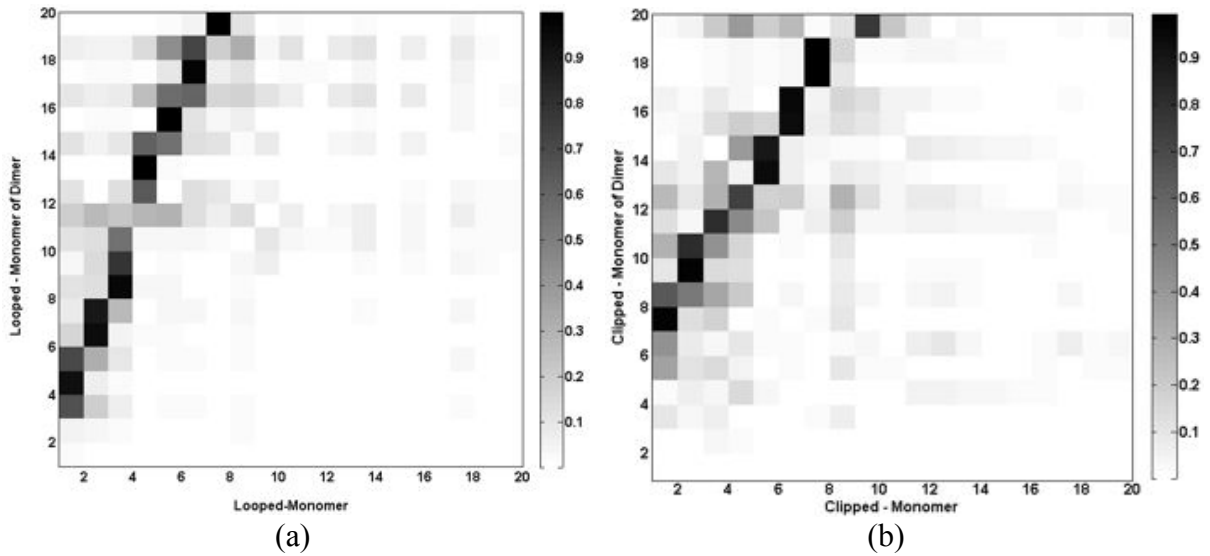


Şekil 35. Her iki model için belirli modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 2. yavaş mod (b) “Düğüm” model 2. yavaş mod



Şekil 36. Her iki model için belirli modlara ait özvektörlerin yön ve büyüklüklerinin protein üzerindeki durumu (a) “Kırpık model, 3. yavaş mod (b) “Düğüm” model 7. yavaş mod

Dimerik yapının reseptörün dinamiğine olan etkisini anlayabilmek için, dimerik yapı içinde ve tek başına hareket eden iki monomerin ilk 20 mod’u karşılaştırılmıştır. Bu her iki model için de yapılmıştır. “Düğüm” model için Şekil 37a’da verilmiş örtüşme matrisine göre, dimer ile hareket eden monomer’deki ilk iki yavaş mod, tek başına hareket eden monomerde görülmemektedir. Bu da ilk iki modun dimere özgü hareketleri temsil ettiğini gösterir (Şekil 34b, 35b). “Kırpık” model için örtüşme matrisi Şekil 37b’deki gibidir. Buna göre, dimer ile hareket eden monomerdeki ilk dört yavaş mod dimer yapıya özgüdür, zira tek başına hareket eden monomerde görülmemektedir. “Kırpık” modelde daha çok modun dimer yapıya özgü çıkması, ICL3’ün monomer yapının dinamiğine olan etkisinden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 37. (a) Düğüm ve (b) Kırpık model için dimerik yapıdaki monomer ile serbest haldeki monomerin ilk20 yavaş mod’u arasındaki örtüşme değerleri.

4.4.2. β_2 AR dimerik yapı tahmini:

ANM analizi yapılan bu homodimerik model, doğada bilinen bir yapı değildir. Deneysel çalışmalar dimerik yapının interfaz bölgesinin altıncı sarmal (TM6) olabileceğini işaret etmektedir. Hebert ve grubunun 1996 yılında yaptığı deneysel peptit çalışmaları (Hebert, 1996) ve bunu izleyen diğer mutasyon çalışmaları (Salahpour, 2004), β_2 AR'daki altıncı sarmalın homodimerizasyonda önemli bir rolü olduğunu ortaya çıkartmıştır. 2005'te Nemoto ve grubu tarafından yapılan teorik çalışmalarda TM6'nın interfaz bölgesinde ortaya çıkmış olması deneysel çalışmaları destekler niteliktedir (Nemoto, 2005).

Hücre zarı proteinleri için dimerizasyon motifi olarak adlandırılan amino asit dizilimi *LIXXGVXXGVXXT* ilk olarak glikoforin proteini için öne sürülmüştür (Senes, 2001). Ardından Hebert ve grubu β_2 AR için *LKTLGIIMGTFTL* motifini öne sürmüştür. Her dört amino asitte bir tekrar eden *Leu* ya da *Gly* rezidülerinin dimerizasyonda kritik rol oynadığı düşünülmektedir. Bu veriler ışığında, Hebert ve grubunun sentezlediği ve dimerizasyonu inhibe ettiği düşünülen TM6'a ait 276-296 arasında bulunan NH₂-GIIMGTFTLCWLPFFIVNIVH-COOH peptidin bilgisayar ortamında atomistik bir modeli oluşturulmuş ve hemen ardından β_2 AR'a dock edilmiştir. Docking için uygulanan prosedür "GEREÇ ve YÖNTEM" kısmında anlatılmıştır.

4.4.2.1. TMVI'dan modellenen kısa peptit docking sonuçları:

Tablo 5'te docking sonuçları bir büyük ve dört küçük grid kutuları için verilmiştir. Grid kutularının reseptör ile olan görüntüleri "GEREÇ ve YÖNTEM" kısmında Şekil 4'te gösterilmiştir. En yüksek skorlu birinci kümedeki konformasyon ve en kalabalık kümedeki (eğer birinci kümeden farklıysa) konformasyon için AutoDock ve DSX skor puanları, 5 Å yakınındaki transmembran (TM) bölgesi ve ayrıca her kümede bulunan eleman sayısı verilmiştir. Her docking deneyinde toplam 200 birbirinden bağımsız docking koşumu sonucunda elde edilen 200 dock edilmiş konformasyon 2 Å RMSD değerine göre kümelenebilir. Diğer bir deyişle, RMSD değeri birbirinden 2 Å veya daha az olan konformasyonlar aynı küme altında toplanmaktadır. En yüksek skorlu konformasyonu barındıran küme "birinci küme", en kalabalık konformasyon sayısına sahip küme ise "En kalabalık küme" olarak adlandırılmıştır.

Tablo 5. TM6'dan modellenen (276-296 arası rezidüler) kısa peptit için docking sonuçları.

Docking deneyi	Kutu No	Birinci küme				En kalabalık küme			
		Boyut ¹	TM Konumu ²	AD ³ Skor	DSX ⁴ Skor	Boyut ¹	TM Konumu ²	AD ³ Skor	DSX ⁴ Skor
Blind (bir büyük grid kutusu)	-	66	5,6	-10.47	-80.81	84	1,5,6,7	-10.20	-74.88
Dört küçük grid kutusu	1	38	2,3,4	-10.61	-71.25	109	3,4,5	-9.14	-34.47
	2	199	5,6	-10.61	-85.05	-	-	-	-
	3	197	6,7	-10.35	-69.87	-	-	-	-
	4	43	3,4	-10.60	-77.12	73	2,3	-10.60	-52.95

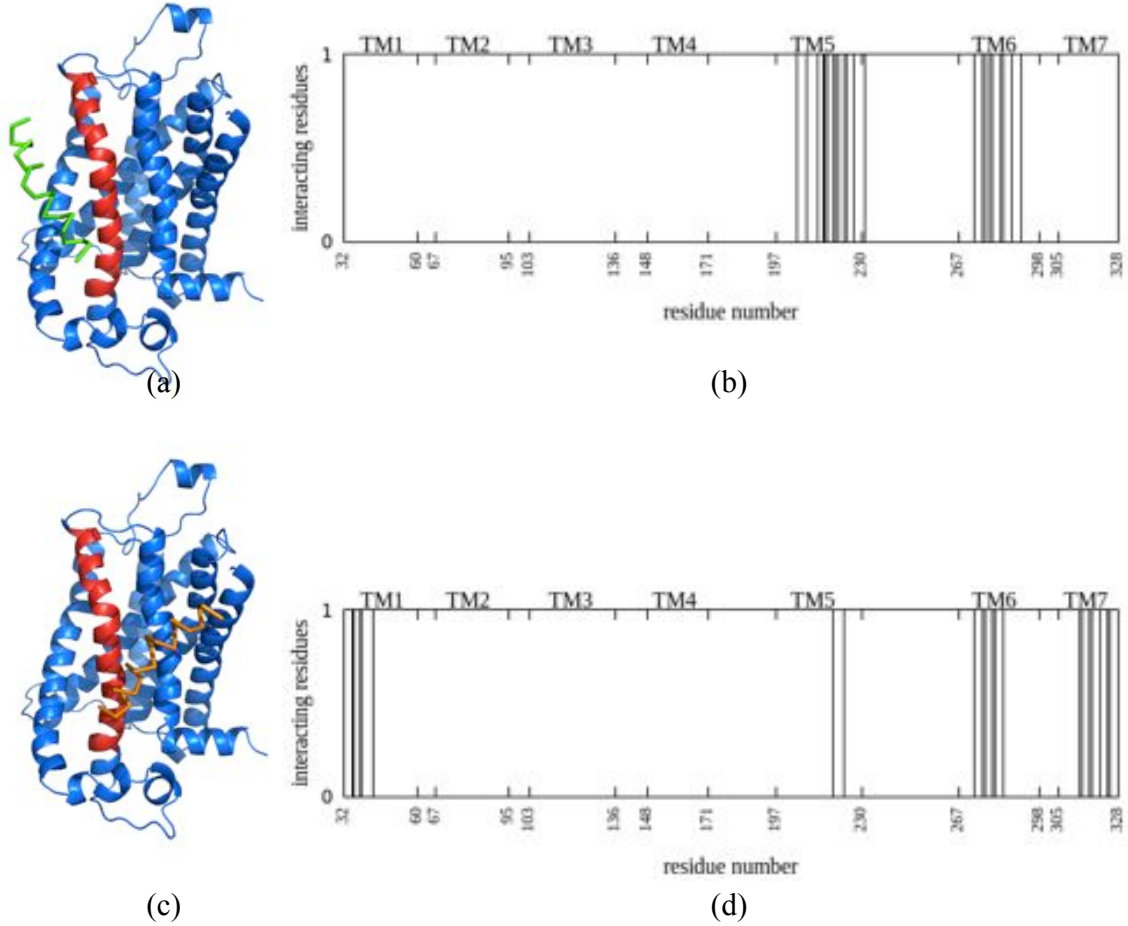
¹ kümedeki dock edilmiş konformasyon sayısı

² Dock edilmiş konformasyonun 5 Å yakınındaki transmembran (TM) bölgesi.

³ AutoDock skor (kcal/mol)

⁴ DSX skor (birimsiz)

“Blind” docking sonuçlarına bakılacak olursa, -10.47 kcal/mol ile en düşük bağlanma enerjisine (en yüksek skor) sahip konformasyonun monomer üzerinde en fazla tercih ettiği bölgenin TM5 ve TM6 olduğu görülmektedir. En kalabalık kümedeki konformasyonun enerji değeri -10.20 kcal/mol olup, tercih ettiği bölge yine TM5-TM6 civarındadır, ve ayrıca TM1 ve TM7 ile de etkileşim içindedir. Bu iki konformasyonun reseptör üzerindeki konumu ve kaçınıcı rezidüleriyle etkileştiği Şekil 38’de gösterilmiştir.



Şekil 38. (a,b) birinci ve (c,d) en kalabalık kümeden seçilen konformasyonların (sırasıyla, yeşil ve turuncu renkte) reseptör üzerindeki konumları ve etkileştikleri rezidüleri. TM6 kırmızı renkte gösterilmiştir.

Yukarıda bulunan konformasyonlara daha yakından bakıldığında, peptidin TM6’daki rezidü dizilimine göre ters yönde (N-ucu hücre içine doğru) konumlandığı görülmektedir. Bu tarz bir antiparalel dizilim, iki monomerin dimerik yapıda benzer bir antiparalel dizilimde olabilecekleri ihtimalini doğurmaktadır. Öyle ki, timolol ve kolesterol molekülleri ile ortaya çıkartılan kristal yapıda da, buna benzer bir antiparalel dizilim gözlemlenmiştir (Hanson, 2008).

Reseptörün dört farklı bölgeye bölünmesiyle ortaya çıkan dört farklı docking çalışmasının sonuçlarına bakıldığında (Tablo 5), TM6’nın en fazla tercih edilen bölge olduğu

görülmektedir. Docking bölgesi içinde TM6'nın olduğu iki farklı deney sonucunun (Tablo 5'te ikinci ve üçüncü grid kutuları) her ikisinde de TM6 bölgesi tercih edilen bölgeler arasında çıkmıştır. Bunun yanı sıra, bağlanma değerleri ikinci ve üçüncü deneyler için sırasıyla -10.61 ve -10.35 kcal/mol gibi yüksek skor değerlerdir ve buldukları kümedeki eleman sayısı 199 ve 197 (200 üzerinden) olarak en kalabalık kümelerdir. Ayrıca ikinci kutu ile yapılan deneyin sonucuna ait DSX skor değeri -85.05 ile Tablo 5'te görülen en yüksek DSX skor değeridir.

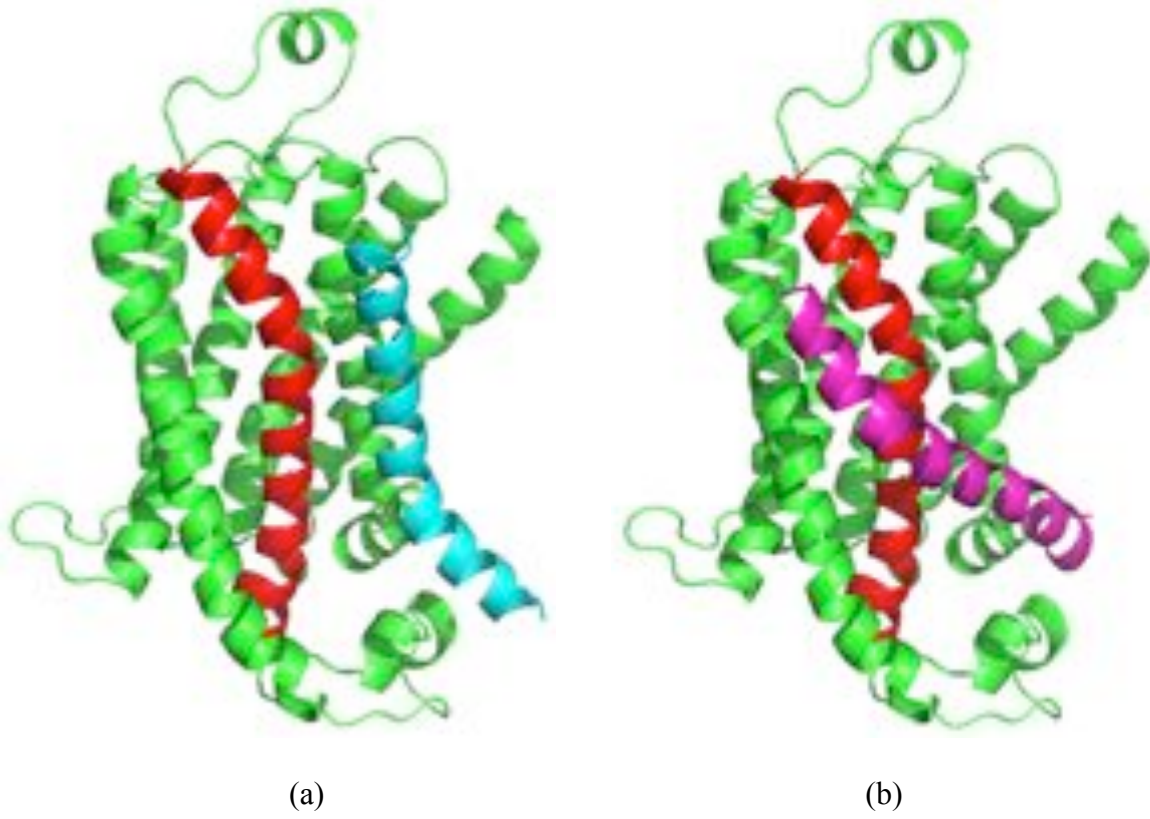
Bunun yanı sıra, TM6'nın grid kutusu içinde olmadığı durumlar söz konusu olduğunda (Tablo 5'te kutu no 1 ve 4), tercih edilen bölge TM2, TM3 ve TM4 olarak bulunmuştur. Ancak burada birinci kümedeki konformasyon sayısı 50'nin altında çıkmıştır ve en kalabalık kümedeki konformasyona bakıldığında DSX skorun oldukça düşük olduğu görülür. Tüm bu peptit docking sonuçları, peptitin TM6'a yakın bölgeleri en fazla tercih ettiğini işaret etmektedir.

4.4.2.2. Her bir TM bölgesinden modellenen uzun peptit sonuçları:

Her bir TM bölgesi bir peptit olarak yeniden modellenmiş ve reseptöre "blind" bir şekilde dock edilmiştir. Tablo 6'da dock edilen her bir peptite ait ilk ve en kalabalık kümeler için eleman sayısı, AutoDock ve DSX skor değerleri ve her bir kümeyi temsil eden konformasyonun 5 Å yakınındaki transmembran (TM) bölgesi verilmiştir. Buna göre, tüm docking deneylerinden çıkan en yüksek skorlu (ve en kalabalık kümeye ait olan) konformasyonların her seferinde TM6 bölgesinin yakınında olması dikkat çekicidir. Bunun yanı sıra, TM6 peptiti dock edildiğinde -67.24 gibi bir DSX skoru elde edilmiştir. Bu -71.97'den sonraki en yüksek ikinci değerdir. En yüksek değer, TM7'nin docking sonucunda görülen en kalabalık küme için elde edilmiştir. TM6 dışında docking sonuçlarının hepsinde olmasa da çoğunda tercih edilen iki diğer bölge TM5 ve TM7 olarak görülmektedir. Şekil 39'da, TM6'dan elde edilen peptitin dock edilmiş en yüksek skorlu ve en kalabalık kümeden elde edilen konformasyonların reseptördeki kırmızı renkli TM6'a göre konumları gösterilmiştir.

Tablo 6. Transmembran bölgelerden modellenen uzun peptitler için docking sonuçları

Docked Peptide	First cluster				Highest-populated cluster			
	Size ¹	TM Position	AD Score	DSX Score	Size ¹	TM Position	AD Score	DSX Score
TM1	104	5,6	-9.52	-49.92	-	-	-	-
TM2	178	5,6,7	-9.78	-33.11	-	-	-	-
TM3	136	5,6,7	-10.66	-20.09	-	-	-	-
TM4	162	5,6,7	-9.79	-18.65	-	-	-	-
TM5	14	1,5,6,7	-8.34	-31.80	52	5,6,7	-7.95	-61.32
TM6	62	6,7	-9.14	-67.24	73	5,6,7	-8.81	-55.74
TM7	9	6,7	-9.22	-49.23	58	5,6,7	-8.80	-71.97



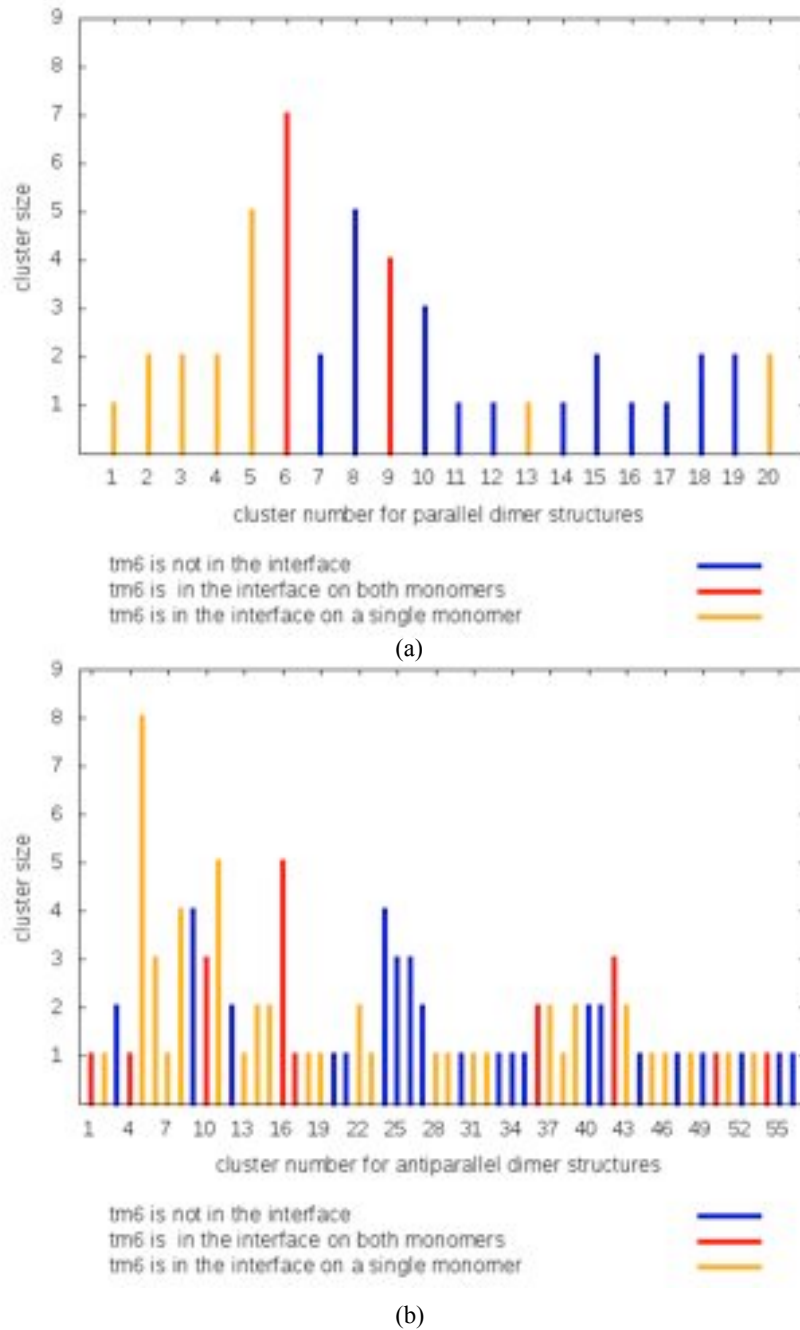
Şekil 39. TM6'dan elde edilen peptitin (a) en yüksek skorlu (mavi) ve (b) en kalabalık kümeden (magenta) elde edilen konformasyonları. Reseptördeki TM6 kırmızı renkte gösterilmiştir.

4.4.2.3. ZDOCK ile protein-protein docking sonuçları:

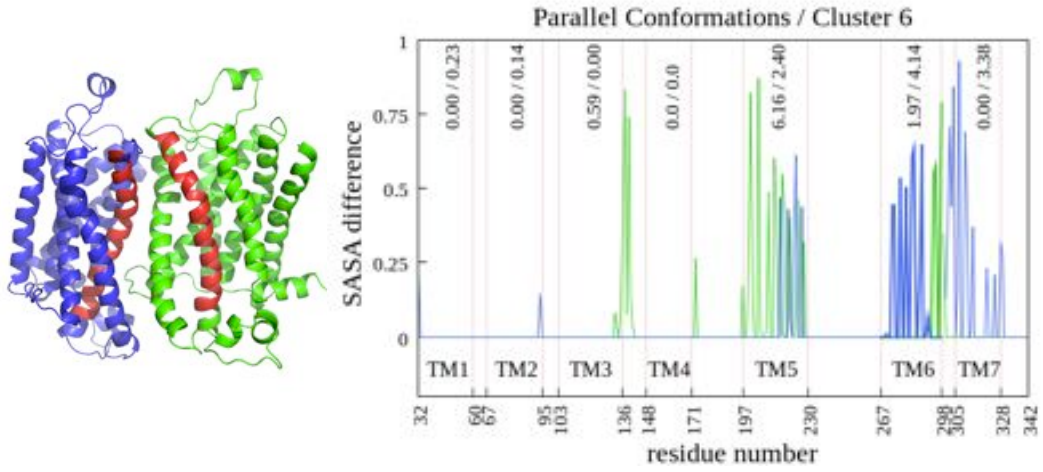
ZDOCK aracılığıyla elde edilen 16.000 homodimerik yapıdan 149 tanesi hücre zarı topoloji filtresinden (Bakınız “Gereç ve Yöntemler”) geçmiştir. Bu yapılara daha yakından bakıldığında 47 tanesinde monomer'ler aynı yönde (paralel), 102 tanesinde ters yönde (antiparalel) konumlanmışlardır. 147 adet kompleks yapı paralel ve antiparalel olmak üzere iki gruba ayrılmış ve her grup kendi içinde 6 Å RMSD değerine göre kümelenmiştir. Paralel grup için 20, antiparalel grup için 56 farklı küme elde edilmiştir. Şekil 40'taki gibi gösterilen kümelerde, paralel yönde olanlar için en kalabalık kümedeki eleman sayısı 7'dir ve her iki monomerin TM6'sı interfaz bölgesinde bulunmaktadır. Her iki monomerin TM6'sının interfaz bölgesinde olduğu durumda o kümeyle ait dikey çizgi kırmızı renkte gösterilmiştir. Antiparalel yönde olanlara ait en kalabalık kümede ise 8 adet konformasyon bulunmuştur ve interfaz bölgesinde monomerlerden sadece birinin TM6'sı interfazda bulunmaktadır. Böyle bir durumda o kümeyle ait dikey çizgi turuncu renk ile gösterilmiştir. İnterfaz bölgesinde TM6'nın bulunmadığı kompleks yapılara ait küme çizgisi ise mavi renk ile gösterilmiştir.

117 kompleks yapıda interfaz bölgesinin reseptörün hangi sarmalına denk düştüğünü kantitatif bir yolla belirlemek amacıyla, her 76 kümeden temsili bir yapı seçilerek, $dSASA_i$ değerleri hesaplanmıştır. Paralel ve antiparalel yapılardan elde edilen en kalabalık kümelerden birer temsili yapı seçilerek, Şekil 41'teki gibi $dSASA_i$ profilleri ve monomerlerin birbirlerine göre olan konumları gösterilmiştir. $dSASA_i$ değeri 0'dan büyük olan bölgelerin

interfaz bölgesinde olduğu göz önüne alınırsa, paralel yönde olan dimerik yapıda, monomerlerden birinde TM5 ve TM6 interfazda iken, ikinci monomerde TM5, TM6 ve TM7 interfaz bölgesinde yer almaktadır. Benzer şekilde, antiparalel yönde olan dimerik yapıda (Şekil 41b), monomerlerden birinde TM3 ve TM4, diğesinde ise TM5, TM6 ve TM7 interfaz bölgede bulunmaktadır.

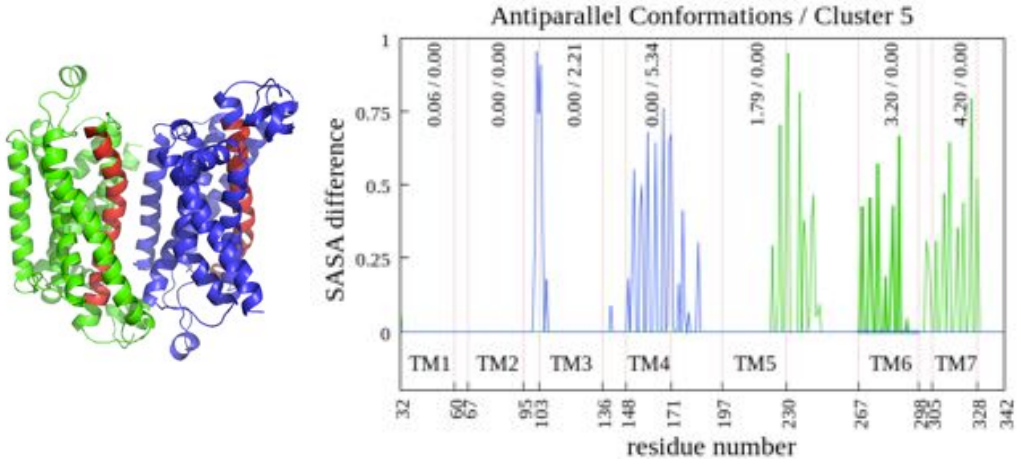


Şekil 40. (a) paralel ve (b) antiparalel yöndeki monomerlerden oluşan dimerik yapılar için küme profilleri. İnterfaz bölgesinde TM6'nın olup olmasına göre renklendirilmiştir. Kırmızı: her iki monomerin TM6'sı interfazda, turuncu: tek monomerin TM6'sı interfazda, mavi: hiç bir monomerin TM6'sı interfazda olmadığı durum.



(a)

(b)



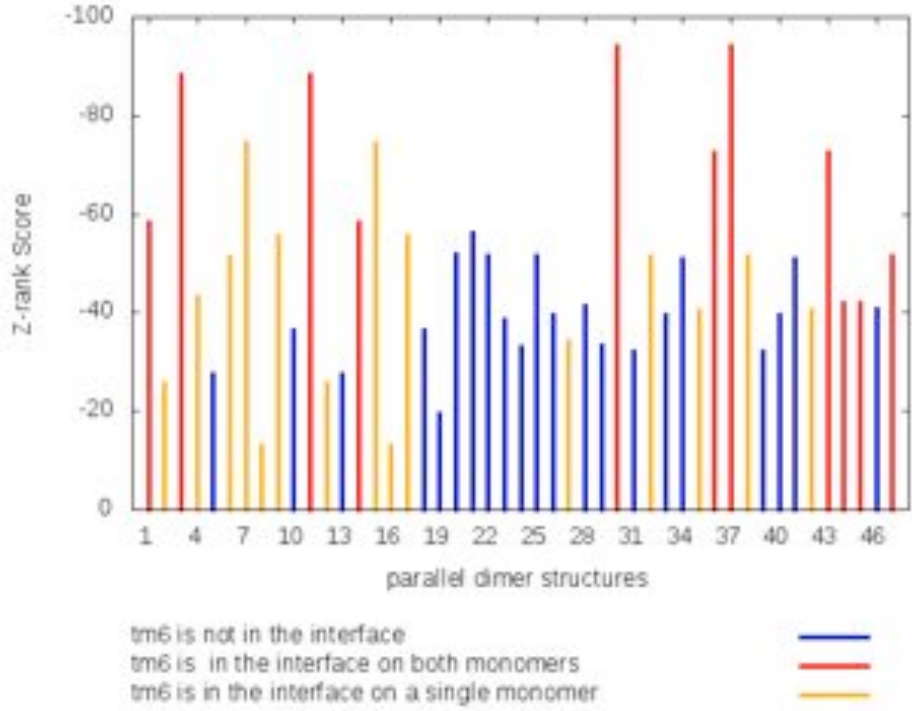
(c)

(d)

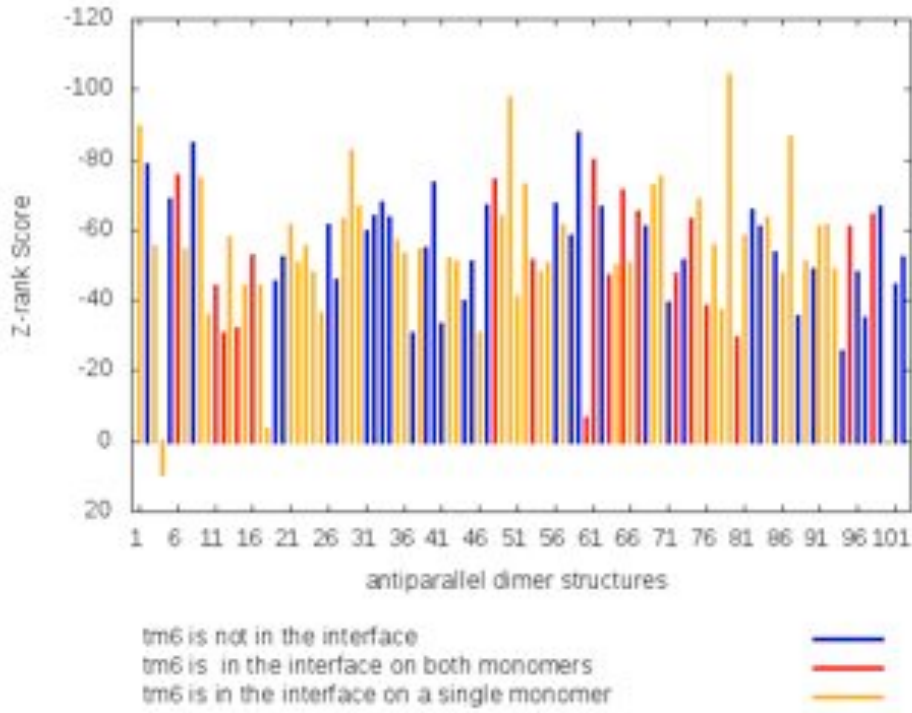
Şekil 41. En kalabalık kümelerden seçilen paralel ve antiparalel dimer yapıların (a,c) konumları ve (b,d) her bir rezidü için $dSASA_i$ değerleri. TM6 kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Son olarak, her bir 149 dimerik yapı için Z-rank skor değeri hesaplanarak, bu yapılar içinde en yüksek Z-rank skoruna sahip yapılar en yüksek olasılıkla görülmesi beklenen dimerik bir oluşum olarak önerilmiştir. Z-rank skor değeri eksi yönde arttıkça o yapının görülme olasılığı yüksek olacaktır, diğer bir deyişle en düşük negatif değer önerilecek doğru sonucu işaret edecektir. Şekil 42'de paralel ve antiparalel yapılar için hesaplanan Z-rank skor değerleri verilmiştir. Buna göre paralel dimerik yapılar için en düşük Z-rank skor değerlerinin olduğu [-100:-80] aralığında dört dimerik yapı bulunmaktadır ve bunların hepsinde her iki monomere ait TM6 interfaz bölgesinde bulunmaktadır. İkinci en düşük Z-rank skor aralığına [-80:-60] bakılacak olursa yine dört yapı görülmektedir. Bunların ikisinde her iki monomere ait TM6 interfaz bölgesindedir, diğer ikisinde ise bir monomerin TM6'sı interfaz bölgesinde bulunmaktadır. En düşük skor değeri -104.2 olarak hesaplanmıştır ve Şekil 42b'de gösterildiği gibi antiparalel bir dimer yapıya aittir. Bu en olası dimerik oluşum aynı zamanda bir önceki

adımda yapılan 6 Å RMSD değerine göre kümeleme analizi sonucunda en kalabalık kümenin bir elemanı olarak ortaya çıkmıştır, dolayısıyla üç boyutlu hali Şekil 41c'de gösterilen konformasyona benzemektedir (RMSD < 6 Å)



(a)

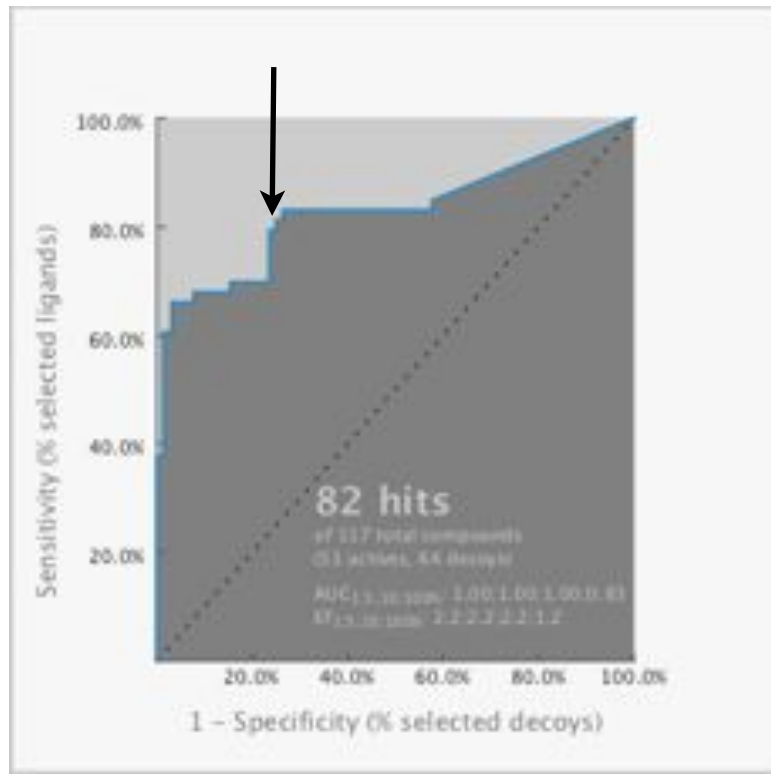


(b)

Şekil 42. 47 adet paralel ve 102 adet antiparalel dimer yapı için Z-rank skor değerleri.

4.5. Dokuzuncu iş paketine ait çalışma: sanal tarama ve analiz

“Gereç ve Yöntem” kısmında bahsedilen farmakofor modeli, GLIDA veribankasından elde edilen 117 molekülden oluşan küçük veribankası taramasında kullanılmıştır. Sonuç olarak, 53 agonist’ten 36’si, 64 antagonist’ten ise 46’sı geçebilmiştir. Kullanılan farmakofor modelin güvenilirliği ise Şekil 43’te gösterilen ROC eğrisi ile doğrulanmıştır. Bu egride ok işareti ile belirtilen nokta, fit skor değerinin 0.64 olduğu noktadır ve bu tarama çalışmalarında eşik değeri olarak seçilmiştir. Diğer bir deyişle taramada farmakofor modeli geçmiş olsa bile, skor değeri 0.64’ün altında ise taramada elenecektir. Zira, ROC eğrisi bu eşik değeri için, “true positive” %83 “false positive” yüzdesini ise %27 olarak vermektedir. Bu eşik değerinin üstüne çıktığında, “true positive” yüzdesi artarken, bir yanda da “false positive” yüzdesi artacaktır. Dolayısıyla, true positive/false positive oranını kabul edilebilir sınırlar içinde optimum bir değerde tutmak gerekir.



Şekil 43. Seçilen farmakofor modeli ile yapılan tarama sonucunda elde edilen ROC eğrisi. 117 molekülden 82’si hit olarak geri dönmüştür.

Farmakofor taramasını geçen 82 molekül, daha sonra GOLD programı ve ChemPLP skor fonksiyonu yardımıyla bilinen inaktif yapı 2RH1’a dock edilmiştir. Her molekül için en yüksek skora sahip konformasyon seçilmiş ve bağlanma bölgesinde kritik rezidülerden Ser203, Ser204, Ser207, Asp113, Val114 ve Asn312 ile etkileşim içinde olup olmadıklarına bakılmıştır. Ser203, Ser204, Ser207 grubundan en az biriyle ve Asp113, Val114 ve Asn312 grubundan en az biriyle etkileşim içinde olan 32 agonist ve 42 antagonist testi geçmiş, geriye kalan 4 agonist ve 4 antagonist elenmiştir.

Tablo 7’de bağlanma farmakofor testinin yanı sıra bağlanma kriterleri testini geçen moleküller

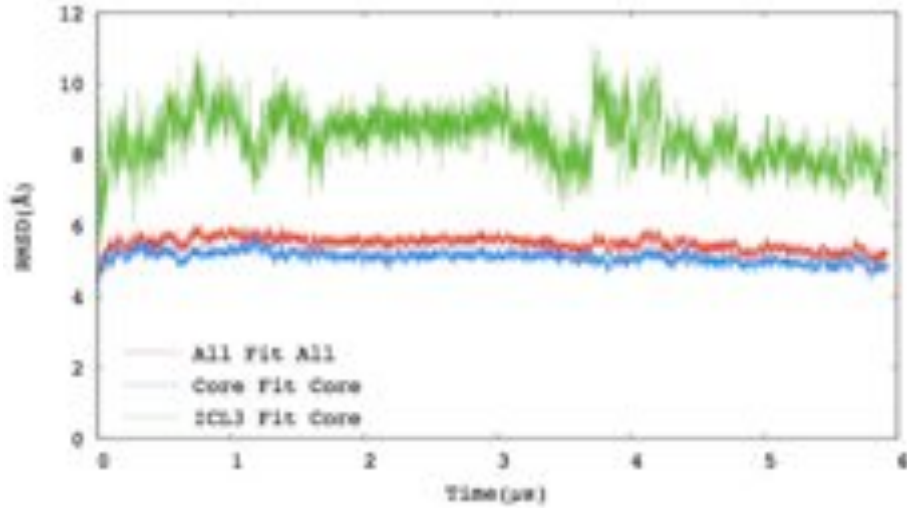
ChemPLP skor değerlerine göre sıraya sokulmuştur. Agonist ve antagonistlerin birbirlerinden ayırt edilebilmesi için sırasıyla kırmızı ve mavi renklerle gösterilmiştir. En yüksek ChemPLP skor değeri 127.9 olup bir antagonist'e aittir. Skor değeri 88'in üstünde olanlara bakıldığında 14'ü antagonist ve 7'si agonist olacak şekilde toplam 21 molekül bulunmaktadır. Bu durumda EF değeri, $EF = (14/42)/(21/74) = 1.17$ olarak hesaplanır. Bu değer 1'den büyük olması, 88 skor değerinin tarama için bir eşik değeri olarak güvenle kullanılabilirliğini işaret eder. Dolayısıyla, toplam 9.928.465 molekülden 727.983 adeti farmakofor modeli geçmiştir ve bu moleküllere ChemPLP ile docking yaptığımızda skor değeri 88 ve üstü olanlar kabul edilecek, altında kalanlar ise elenecektir.

Tablo 7. Farmakofor taramasını ve bağlanma kriterlerini geçen 32 agonist (kırmızı) ve 42 antagonist (mavi)

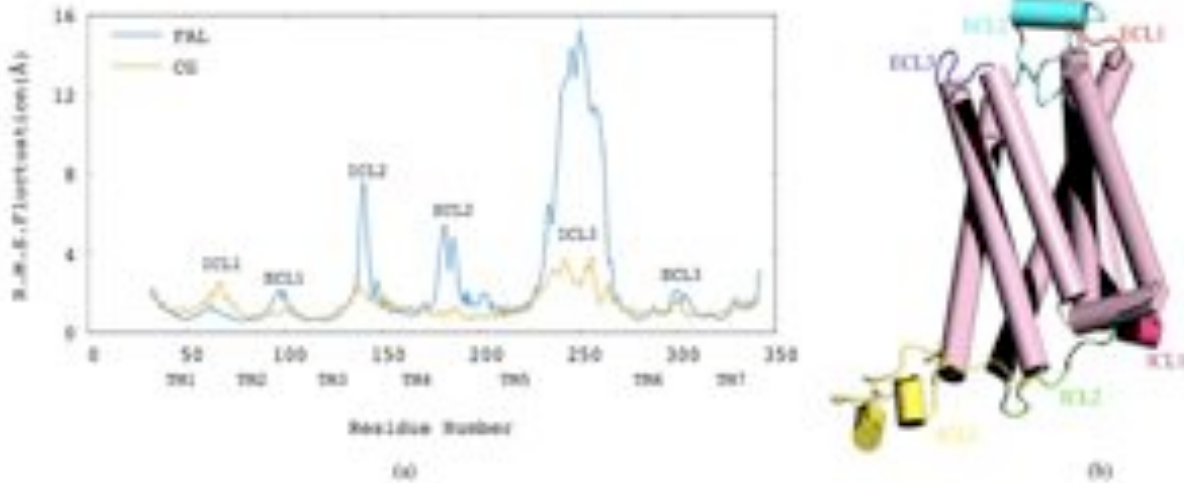
Ligand Name	ChemPLP Score	Ligand Name	ChemPLP Score	Ligand Name	ChemPLP Score
'C37H42CIN5O5'	127.90	'C23H25NO2'	82.57	'C19H29NO5'	71.06
'C28H30F4N2O4'	115.20	'C22H24N2O4'	81.73	'C16H24N2O2'	70.59
'C28H32N4O5'	112.58	'C16H22N4O3'	81.24	'C18H27Cl2N5O2'	69.90
'C38H44CIN3O7'	105.32	'C19H21N5O'	80.25	'C22H31NO4'	69.56
'C29H38N2O3'	103.41	'C20H27N3O6'	79.96	'C20H26N4O'	68.78
'C29H33N3O5'	101.84	'C24H28N2O3'	78.63	'C18H29N3O5'	67.95
'C27H33NO4'	101.78	'C19H23NO5'	78.63	'C14H22N2O3'	67.87
'C28H34N2O6'	99.43	'C20H28N4O4'	78.45	'C16H26O5S'	67.72
'C24H26N2O4'	98.73	'C18H31N3O3'	77.74	'C18H22N2'	64.14
'C30H46N2O9'	98.50	'C18H22N4O'	77.63	'C14H21N3O3'	63.41
'C24H27Cl2N3O2'	98.01	'C19H24N2O3'	77.29	'C17H18Br2FN3O3S'	63.18
'C23H25F3N4O5'	97.86	'C18H29NO3'	76.93	'C15H20IN3O2'	62.58
'C26H33N5O4'	97.54	'C16H25N3O9'	76.82	'C13H21NO3'	61.20
'C25H32N4O6'	97.42	'C20H20N2O3'	76.35	'C14H22CINO2'	61.10
'C29H33N5O8'	97.29	'C20H24N2O4'	75.63	'C14H23NO4'	60.81
'C23H29F2N3OS'	95.52	'C19H22CINO5'	75.07	'C10H12N2O3S'	60.28
'C25H31BrCIN3O5'	92.99	'C17H31N3O4'	74.97	'C13H24N4O3S'	60.05
'C22H28ClF3N2O2'	89.94	'C14H20N2O2'	74.42	'C12H7Cl2NO3'	58.58
'C20H23CIN4O6S2'	88.77	'C21H27NO2'	74.22	'C12H24N2O2S'	58.19
'C25H30CIN5O3'	88.30	'C18H29NO4'	73.76	'C11H17NO3'	57.06
'C22H25F2NO4'	88.02	'C17H27NO4'	73.53	'C10H11IN2O4'	56.74
'C21H24N2O4S'	87.64	'C15H22N2O6'	73.11	'C11H23NO3'	54.04
'C19H24FNO4'	86.19	'C17H26FNO3'	72.92	'C9H13NO3'	51.18
'C25H28N2O2'	84.39	'C15H23NO2'	72.20	'C10H15NO'	49.13
'C18H20N2O3S'	82.68	'C21H23NO5'	72.15		

4.6. Onuncu iş paketine ait çalışma: Reseptörün “Rezidü Tabanlı Kaba Taneli” (Residue-Based Coarse Grained) Moleküler Dinamik simülasyonu ve analizi

Coarse-grained (CG-MD) simülasyondaki denge ve üretim safhaları RMSD profiline bakılarak Şekil 44’teki gibi gösterilmiştir. Üç farklı RMSD değeri, reseptörün üç farklı bölgesine göre hesaplanmıştır. Bunlar sırasıyla, tüm reseptör yapısı (All), ICL3 bölgesi dışında kalan yapı (Core) ve ICL3 bölgesidir. ICL3 dışında kalan bölge simülasyon çok erken evrelerinde dengeye ulaşırken, ICL3 8-10 Å aralığında dalgalanmaktadır.



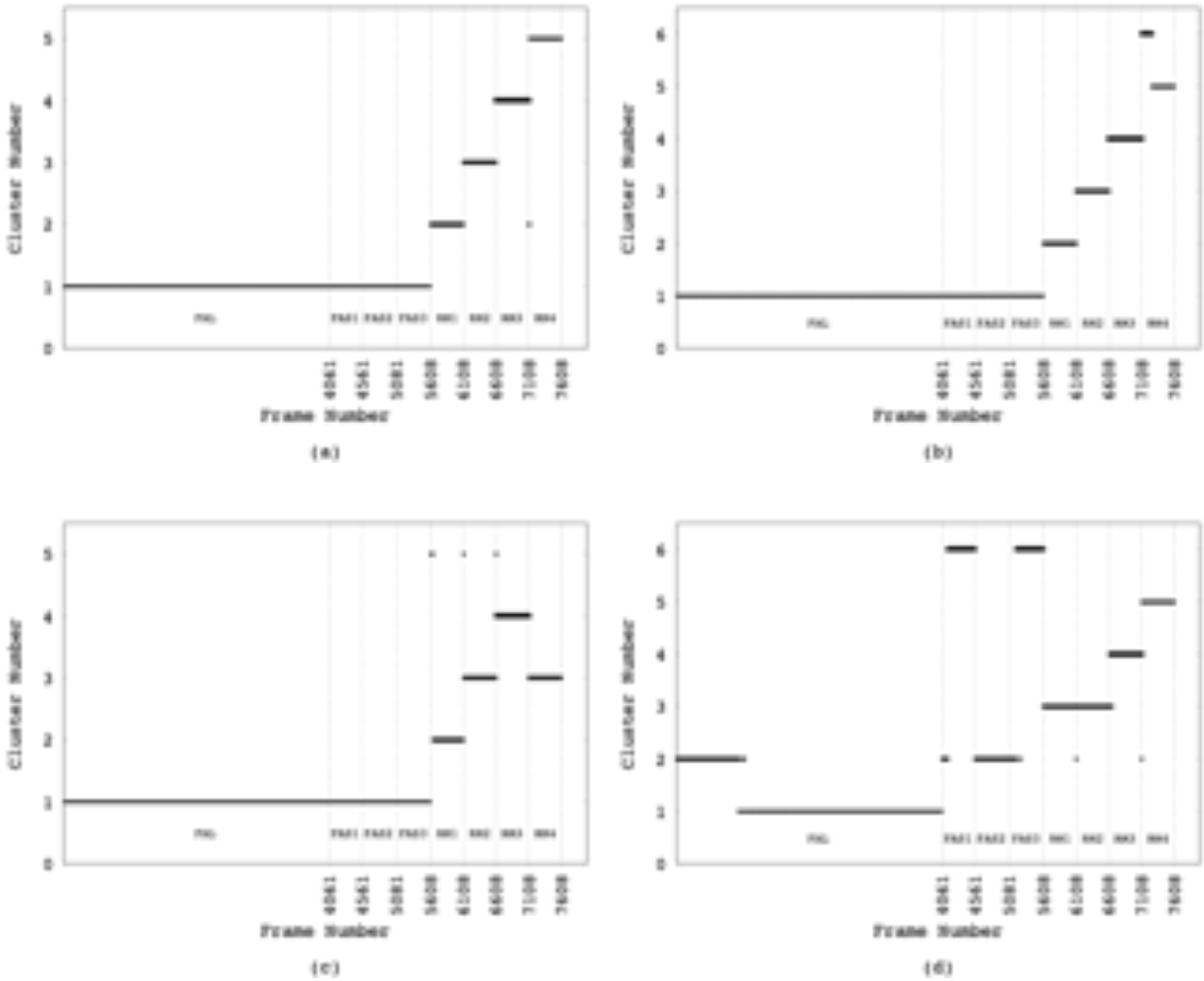
Şekil 44. CG-MD simülasyonu boyunca başlangıç konformasyonuna göre üç farklı bölge için hesaplanan RMSD profilleri. (All: tüm yapı, Core: ICL3 dışında kalan ve ICL3)



Şekil 45. (a) CG ve Atomistik (FAL) simülasyonlara ait RMSF profilleri (b) RMSF profilindeki tepe noktalarının üç boyutlu yapı üzerindeki konumları

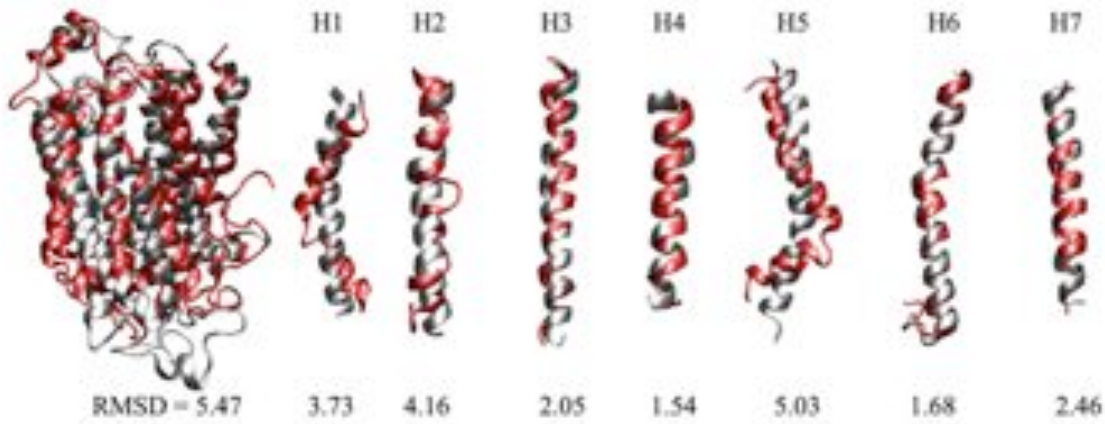
CG modelin 6 μ s'lik simülasyon boyunca hareketliliği ise Şekil 45'teki RMSF profili ile gösterilmiş ve 1 μ s'lik atomistik simülasyona (5. iş paketinde) ait RMSF profili ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, 16 Å gibi yüksek değerlere erişerek en fazla hareketliliği gösteren ICL3 bölgesi CG modelde 4 Å gibi ortalama bir değerde kalmaktadır. ICL2 ve ECL2 düğüm bölgeleri de benzer şekilde CG modelde atomistik modele göre daha hareketsiz kalmışlardır. Buna rağmen her iki modelin transmembran bölgelerindeki durağanlık benzeşmektedir (Şekil 45'te çukur bölgeler).

CG-MD gidişinden reseptörün dört farklı konformasyonu seçilmiş ve tersine-gönderim (reverse-mapping, RM) yöntemi ile atomistik modeli elde edilmiştir. Dört RM ve daha önceki atomistik (FA) simülasyonlarından elde edilen yapılar reseptörün 'core', ICL3, transmembran ve bağlanma bölgelerinin RMSD değerlerine göre kümelendirilmiştir. Şekil 46 dört farklı küme profilini göstermektedir. Burada en dikkat çekici sonuç, RM yöntemi ile geri kazanılmış atomistik modellerin yapısal olarak diğer atomistik modellerden ayrıldığıdır. Bu tüm bölgeler için geçerlidir.

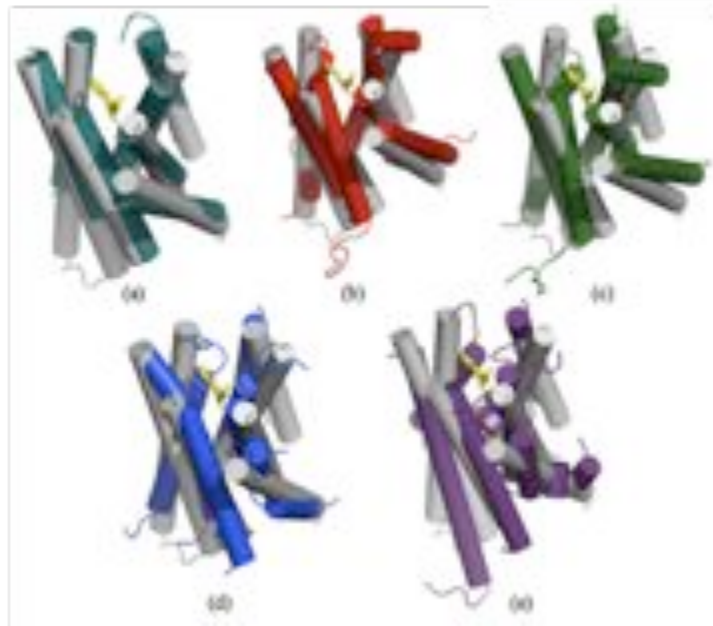


Şekil 46. Atomistik (FAL, FAS1, FAS2, FAS3) ve tersine gönderimli atomistik konformasyonların (RM1, RM2, RM3, RM4), farklı reseptör bölgelerine göre kümelendiği. (a) ICL3 dışında kalan 'core' (b) transmembran (c) bağlanma ve (d) ICL3 bölgeleri.

Yapısal olarak bir karşılaştırma yapmak amacıyla bilinen inaktif kristal yapı 2RH1 ile RM sonucu elde edilen atomistik yapılardan biri üstüste çakıştırılmıştır. Şekil 47’de gösterildiği gibi, tüm yapı için RMSD değeri 5.47 Å olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda her heliks bölgesi 2RH1’deki heliks bölgesi ile çakıştırılmış ve RMSD değerleri belirlenmiştir. Buna göre, birinci, ikinci ve beçinci heliksler hariç diğler dört heliks Kristal yapıdaki haliyle uyumludur. TMI, TMII ve TMV sekonder yapıları simülasyon işlemleri sırasında bozulmuştur. Ancak bu bozulma bağlanma bölgesindeki yapıyı bozacak kadar ciddi değildir. Şekil 48’de beş farklı konformasyona ait hücre dışından bağlanma bölgesinin görüntüleri verilmiştir. Her bir konformasyon 2RH1 ile üstüste gelecek şekilde ve carazolol molekülü ile birlikte gösterilmiştir. Simülasyon boyunca her bir yapının enerji değerleri sabitlenmiş, dolayısıyla kararlı yapıları temsil etmektedir. Üç ayrı helikste sekonder yapıların bozulması simülasyonda kullanılan enerji denklemindeki parametrelerin sekonder yapıyı kararlı yapacak nitelikte olmadığı, bu yüzden yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini işaret eder.



Şekil 47. 2RH1 (gri) ile tersine gönderimli atomistik konformasyonlardan birinin (RM4, kırmızı) üstüste çakıştırılmış görüntüsü, RMSD değerleri ile birlikte verilmiştir.



Şekil 48. 2RH1 (gri) ile üstüste görüntüleri verilmiş beş farklı atomistik konformasyon.

5. TARTIŞMA/SONUÇ:

β_2 AR hücre zarı reseptörünün iki farklı modeli ile yapılan 1'er mikrosaniyelik uzun simülasyonların sonucunda reseptörün daha önce açıklanmamış "ultra inaktif" bir yapısı ortaya çıkmıştır. Simülasyonun ikinci yarısında, ICL3 bölgesi reseptörün iç kısmına doğru kapanarak G proteine bağlanma bölgesini kapatmıştır. Bunun sonucunda, ICL3 ün bitişiğinde duran TM6 sarmalın alt kısmı da reseptörün iç kısmına doğru yaklaşmıştır. TM6'daki bu konformasyonel değişim, aktivasyon sırasında meydana gelen, reseptörden uzağa, hücre zarına doğru olan hareketinin tam tersi yöndedir.

Bir diğer önemli bulgu, reseptörün üst kısmında kalan bağlanma bölgesi ile alt kısımdaki G proteine bağlanma bölgesinin yüksek bir korelasyon ile hareket etmesidir. ICL3 bölgesinin G protein bağlanma kavitesini kapattığı anlarda reseptörün üst kısmındaki bağlanma bölgesi genişlemiştir. Bu genişleme agonist/antagonist bağlanmasında önemli rol oynayan iki kritik rezidü Ser207 ve Asp113 arasındaki uzaklık değerine bakılarak ölçülmüştür. Bu "ultra inaktif" yapıya geçiş evresi simülasyonun ortalarında başlamış ve 100 ns gibi bir sürede tamamlanmıştır. Son 300 ns'lik evresinde ise, simülasyonun başından beri en fazla hareketli bölge olarak görülen ICL3, bu kapalı konumunu korumuştur. 1 μ s'lik MD gidişine uygulanan temel bileşen analizi sonucunda, ilk temel mod'un reseptörün tüm hareketinin %69'unu açıkladığı ve "ultra inaktif" yapıya geçişin bu ilk mod'da gerçekleştiği ortaya çıkmıştır.

Buna karşılık, ICL3 bölgesinin eksik olduğu "kırpık" modelde buna benzer bir konformasyonel değişim gözlemlenmemiştir. Bir sonraki çalışma "düğüm" modele odaklı gerçekleştirilecektir. Burada amaç, reseptörün üst kısmında bağlanma bölgesindeki iki kritik rezidü Ser207 ve Asp113 arasındaki mesafeyi aktif halde bilinen 8-10 Å arasında bir değerde sabit tutarak, reseptörün alt kısmındaki konformasyonel değişimi moleküler dinamik simülasyonu yardımıyla gözlemlemek olacaktır. Beklenen değişim ICL3 bölgesinin kapalı halden, simülasyonun başındaki açık ve serbest haline geri dönüşüdür.

Anizotropik Ağ Modeli (ANM) ile yapılan çalışmaların sonucunda, ICL3 bölgesinin hareketi, "düğüm" modelde ilk dört mod ile açıklanmıştır. Diğer bir deyişle ICL3 dinamiği reseptörün en dominant hareketi olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki modeldeki ICL3 dışında kalan bölgelerin dinamik yapısı birbiriyle oldukça benzeşmektedir. β faktörü tüm mod'ların ortalaması alınarak hesaplanmış ve deneysel β factor değeriyle karşılaştırılmıştır. Buna göre, kullanılan teorik modelin deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Yüksek frekanslı mod'lardan tespit edilen ve proteinde en kısıtlı ve evrimsel açıdan en korunmuş "sıcak bölge" rezidüleri çoğunlukla ikinci, üçüncü, altıncı ve yedinci sarmallar üzerinde bulunmuştur. Özellikle üçüncü ve altıncı sarmallar, hem sinyal moleküllerle etkileşim içinde olan, hem de sinyal aktarımının yolu üzerinde olan kritik rezidüleri barındırmaktadır. Son olarak, sinyal aktarımı için son derece önemli olan sarmal yapıya özgü ve sarmallar arası korelasyonun yoğun olduğu bir hareketten bahsetmek mümkündür. Ayrıca bu hareket, proteinin ICL3 bölgesinden bağımsız bir şekilde gerçekleşmektedir.

Docking çalışmalarından çıkan en çarpıcı sonuç, bilinen aktif ve inaktif hallere ait bağlanma bölgelerinin ciddi bir farklılık göstermediğidir. Antagonist moleküller için yapılacak bir veritabanı taramasında nispeten büyük olan agonist'leri antagonist'lerden ayırt etmede başarısız oldukları görülmüştür. Benzer şekilde, küçük agonist'ler, inaktif hale de aktif haldeki kadar doğru konumlarda dock edebilmektedir. Moleküler Dinamik simülasyon

çalışmasının sonucunda elde edilen biri aktif, diğeri “ultra” inaktif yapıların, kristal yapıların tersine ayırt edici özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir. Bağlanma bölgesi dar olan aktif yapı, büyük antagonist molekülleri barındırmakta başarısız olup, ufak molekülleri seçmede daha başarılıdır. Ancak böyle bir yapı, POG gibi nispeten büyük olan agonist molekülleri veritabanından çekip çıkartmada başarısız olacaktır. Bağlanma bölgesi geniş olan inaktif yapı, küçük agonist moleküller için uygun değildir, ancak büyük antagonist’lerin yanı sıra büyük agonist yapıları da true positif olarak seçme olasılığı vardır. Bu yüzden docking taraması öncesi bir farmakofor taraması bu tür hatalı sonuçları azaltmak için her zaman gereklidir.

β_2 AR monomer yapıya uygulanan Anizotropik Ağ Modeli (ANM) ile yapılan analiz çalışmalarının benzeri β_2 AR dimerik yapısı için gerçekleştirilmiştir. Reseptörün doğadaki dimerik yapısı henüz bilinmemekte olup, bu çalışma için kullanılan dimerik yapı, kristalografik deneylerde oluşturulan kristal paketlenme şeklinden alınmıştır. Her iki model için de oluşturulan dimerik yapılarda ilk mod’lar birbirleriyle örtüşmektedir. Monomer yapıdaki gibi “düğüm” modele özgü modlar ortaya çıkmamıştır. Bu sonuç, ICL3 bölgesinin monomer yapıda olduğu gibi dimerik yapıda baskın olmadığını gösterir. Diğer bir deyişle, dimerik yapının dinamiğini belirleyen ICL3 dışında kalan bölgelerdir.

DeneySEL çalışmalar doğrultusunda interfaz bölgesinde olduğu tahmin edilen TM6 bölgesi, peptit docking ve protein-protein docking çalışmaları ile desteklenmiştir. Peptitin en fazla tercih ettiği bölge TM6 olmuştur. Protein-protein docking çalışmalarında ise en yüksek skorlu dimerik yapıda TM6’nın interfazda olduğu görülmüştür.

Reseptörün “Rezidü Tabanlı Kaba Taneli” (Residue-Based Coarse Grained) Moleküler Dinamik simülasyonu ve analizi sonucu, farklı konformasyonlar ve bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Bu konformasyonlar enerjik açıdan kararludur ve üç boyutlu yapı simülasyon boyunca korunmuştur. Ancak, helikslerden bazılarının sekonder yapılarında bozulmalar görülmüştür. Bu yapısal bozulmalar, bağlanma bölgesini etkileyecek kadar ciddi olmamıştır. Sonuç olarak, bu yöntemle daha kısa bir sürede, reseptör için daha geniş bir konformasyonel tarama gerçekleştirilebilmiş ve farklı konformasyonlar elde edilebilmiştir.

6. REFERANSLAR:

- AMADEI, A., Linsen, A.B.M., Berendsen, H.J.C., *Proteins*, 17, 412-425, (1993)
- ANGERS, S., Salahpour, A., Joley, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., Bouvier, M., *PNAS*, 97, 3684-3689, (2000)
- BAHAR, I. and Rader, A.J., *Curr. Opin. Str. Biol.*, 15(5), 586, (2005)
- BAHAR, I., Atilgan, A.R., Demirel, M.C., *Phys Rev Lett*, 80(12), 2733-2736, (1998)
- BOKOCH *et al.*, *Nature*, 463(7277), 108-112, (2010)
- CHE, S., Lin, F., Xu, M., Riek, R.P., Novotny, J., Graham, R.M., *Biochemistry*, 41, 6045-6053, (2002)
- 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., and Stevens, R.C., *Science*, 318, 1258-1265, (2007).
- DANIEL, R.M., Dunn, R.V., Finney, J.L., Smith, J.C. *Ann Rev of Biophys Biomol Struct* 32, 69-92, (2003)
- DROR, R.O., Arlow, D.H., Borhani, D.W., Jensen, M.O., Piana, S., Shaw, D.E., *PNAS*, 106, 4689-4694, (2009)
- EISENMESSER, E.Z., Millet, O, Labeikovsky, W, Korzhnev, D.M., Wolf-Watz, M., Bosco, D.A., Skalicky, J.J., Kay, L.E., Kern, D. *Nature*, 438, 117-121, (2005)
- FEIG, M. J., Karanicolas, J., Brooks, C. L., *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 22, 377-395, (2004).
- FETLER, L., Kantrowitz EZ, Vachette P., *Proc Natl Acad Sci*, 104, 495-500, (2007)
- FUNG, J.J., Xavier, D., Pardo, L., Yao, X.J., Velez-Ruiz, G.A., DeVree, B.T., Sunahara, R.K. and Kobilka, B.K., *EMBO J*, 28, 3315–3328, (2009)
- GEORGE, S.R., O’Dowd, B.F., Lee, S.P., *Nature Rev Drug Discov*, 1, 808-820, (2002)
- GOHLKE, H., Hendlich, M., Klebe, G., *J. Mol. Biol.*, 295, 337-356, (2000)
- GOODFORD, P.J., *J Med Chem*, 28, 849-857, (1985).
- HANSON, M.A, Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.P., Chien, E.Y., Velasquez, J., Kuhn, P., Stevens, R.C., *Structure*, 16(6), 897-905, (2008)
- HEBERT, T.E., Moffett, S., Morello, J.P., Loisel, T.P., Bichet, D.G., Barret, C., Bouvier, M., *J Biol Chem*, 271(72), 16384-16392, (1996)
- HETENYI, C., van der Spoel, D., *Protein Science*, 11(7), 1729-1737, (2002)

- HUMPHREY, Q., Dalke, A., Schulten, K., *J Mol Graph*, 14,: 33-38, (1996)
- IRWIN, Shoichet, *J. Chem. Inf. Model.*, 45(1), 177-82, (2005)
- LOMIZE, M.A., Lomize, A.L., Pogozheva, I.D., Mosberg, H.I., *Bioinformatics*, 22 (5), 623-625, (2006)
- ISIN, B., Estiu, G., Wiest, O., and Oltvai, Z. N., *PLoS One*, 7(12):e50186, (2012)
- KOHLAND, DE. *Proc Natl Acad Sci*, 44, 98-104 (1958)
- LIGGETT, S. B., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Hnatowich, M., *J. Biol. Chem.* 266, 4816-4821, (1991)
- MA, J., *Structure*, 13, 373, (2005)
- MARRINK, S.J., de Vries, A.H., Mark, A.E., *J. Phys. Chem. B*, 108, 750-760, (2004)
- MARRINK, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., Tieleman, D.P., de Vries, A.H., *J. Phys. Chem. B*, 111, 7812-7824, (2007)
- MORRIS, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., *J Comp Chem*, 19,1639-1662, (1998).
- NEMOTO, W., Toh, H., *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 58, 644-660, (2005)
- O'DOWD, B. F., Hnatowich, M., Regan, J. W., Leader, W. M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., *J. Biol. Chem.* 263, 15985-15992, (1988)
- OKUNO, Y., Yang, J., Taneishi, K., Yabuuchi, H., Tsujimoto, G., *Nucleic Acids Res.*, 34(Database Issue), D673-D677, (2006)
- PALCZEWSKI, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le, T.I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. *Science*, 289, 739, (2000)
- PHILLIPS, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, .E, Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K.J., *J Comput Chem*, 26, 1781-1802, (2005)
- PIEPER, U., Eswar, N., Webb, B.M., Eramian, D., Kelly, L., Barkan, D.T., Carter, H., Mankoo, P., Karchin, R., Marti-Renom, M.A., Davis, F.P., Sali, A., *Nucleic Acids Res*, 37, No: Database issue, (2009)
- PIERCE, B., WENG, Z., *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 67, 1078-1086, (2007)
- RASMUSSEN, S.G.F., et al., *Nature*, 477, 549-555, (2011)
- RASMUSSEN, S.G.F., Jensen, A.D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J.A., Gether, U., *Mol Pharmacol*, 56, 175-184, (1999)

ROSENBAUM, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C., and Kobilka, B. K. *Science*, 318, 1266-1273, (2007)

ROSENBAUM, D.M., Zhang, C., Lyons, J.A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Devree, B.T., Sunahara, R.K.; et al. *Nature*, 469, 236, (2011)

SALAHPOUR et al., *J. Biol Chem*, 279(32), 33390-33397, (2004)

SENES et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 9056-9061, (2001)

SHIH, A.Y., Arkhipov, A., Freddolino, P.L., Schulten, K., *J Phys Chem B*, 110, 3674-3684, (2006).

SIMPSON et al., *Proteins*, 79, 1441-1457, (2011)

SWETS, John A., *Signal detection theory and ROC analysis in psychology and diagnostics : collected papers*, Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, NJ, (1996)

TOBI, D., and Bahar, I., *Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.*, 102, 18908, (2005)

WOLBER, G., Langer, T., *J. Chem. Inf. Model*, 45(1), 160-169, (2005)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109M281
Proje Başlığı: Beta-2 Adrenerjik Reseptör Proteinin Dinamik Yapısının Araştırılması ve Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımındaki Önemi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yürütücü: Ebru Demet Akdoğan Araştırmacı: Prof. Dr. Pemra Doruker
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Kadir Has Üniversitesi Kadir Has Caddesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Cibali 34083, Fatih / İstanbul
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15/10/2009 – 15/10/2012
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu projede β_2-adrenerjik reseptörün (β_2-AR) dinamik yapısı 1 mikrosaniyelik bir Moleküler Dinamik simülasyonuna tabii tutulmuş ve şimdiye kadar deneysel yöntemlerle kristalize edilmiş yapılarda gözlemlenmemiş oldukça farklı bir konformasyonu ortaya çıkartılmıştır. Bu yapı reseptörün “çok inaktif” diye adlandırdığımız G proteine bağlandığı hücre içine bakan bölgesinin tamamen kapalı olduğu bir konformasyondur. Bir diğer bulgu da, şimdiye kadar herhangi bir yöntemle etkisi araştırılmamış reseptördeki ICL3 düğüm bölgesinin reseptörün dinamiğine olan etkisidir. Bu bölgenin etkisini göstermek amacıyla, reseptörün ICL3 bölgesi kesilerek doğada olmayan bir modeli oluşturulmuş ve benzer şekilde 1 mikrosaniyelik Moleküler Dinamik simülasyonuna tabii tutulmuştur. Bunun sonucunda ICL3’siz model ICL3’li modelden oldukça farklı bir dinamik yapı sergilemiştir.</p> <p>Bu farklı dinamik yapı, anizotropik elastik ağ modeli (ANM) ile analiz edilmiş ve ICL3’nin reseptöre farklı bir kolektif hareket kazandırdığı gösterilmiştir. Bu kolektif harekette, reseptörün hücre içine bakan kısmındaki ICL3 ile reseptörün hücre dışına bakan ve sinyal moleküllerin bağlandığı bağlanma kavitesinin birbiriyle bağlantılı hareket ettiği ortaya çıkmıştır.</p> <p>Simülasyon boyunca elde edilen farklı konformasyonlar reseptörün bilinen inaktif yapısının dışına çıkıp aktif bir yapı sergileyememiştir. Ayrıca bu konformasyonların hem agonist’lere hem de antagonist’lere benzer şekilde bağlandıkları, diğer bir deyişle seçici olmadıkları docking çalışmaları ile gösterilmiştir.</p> <p>β_2-adrenerjik reseptörleri doğada homodimer, ve hatta oligomer yapılar içinde buldukları deneysel yöntemlerle gösterilmiş, ancak bir araya geldiklerinde hangi bölgeleriyle etkileşim içine girdikleri hakkında kesin bir sonuç elde edilememiştir. Bu çalışmada, iki β_2-AR monomer yapı birbirlerine dock edilmiş ve monomerlerin altıncı heliks bölgelerinden birbirlerine bağlanmayı diğer bölgelere tercih ettikleri gösterilmiştir. Bu sonuç daha önce yapılmış deneysel bir çalışma ile de örtüşmektedir.</p>
Anahtar Kelimeler: Docking, Moleküler Dinamik, ICL3, β_2 -adrenerjik reseptörü

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet Gerekli Değil

Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

1. Kongrede poster sunumu: Koroğlu A, Akten E.D., "*Prediction of the Monomer-Monomer Interface Region of the Beta-2 Adrenergic Receptor via Docking Experiments*", 56th Biophysical Society Meeting, San Diego, CA, U.S.A., Feb 25-29, 2012.
2. Kongrede poster sunumu: Çakan S, Akten ED, "*Exploring distinct conformers of adrenergic receptor via coarse-grained molecular dynamics*", The International Congress on Bioinformatics and Biomics, Kuşadası, Aydın, May 18-22, 2011. Received the 2nd best poster award.
3. Kongrede poster sunumu: Özcan Ö, Uyar A, Doruker P, Akten D, "*Exploring the Intrinsic Dynamics of Human Beta-2 Adrenergic Receptor and its Potential Use in Computational Drug Design Studies*", The 9th Chemical Physics Congress, İzmir, Çeşme, October 14-16, 2010
4. Çalıştay katılımı: Çakan, S. Uygulamalı Hesaplamalı Biyofizik Çalıştayı, Bremen/Almanya, October 17-21, 2011
5. Yüksek Lisans Tezi, Özer Özcan, "Exploring the Intrinsic Dynamics of Human Beta-2 Adrenergic Receptor and its Potential Use in Computational Drug Design Studies", Boğaziçi Üniversitesi, Aralık 2011
6. Yüksek Lisans Tezi, Sibel Çakan, "Exploring Distinct Conformers of Beta2-Adrenergic Receptors via Coarse-Grained Molecular Dynamics", Mayıs 2012
7. Çakan, S., Akdoğan (Akten), E.D., "Exploring distinct binding site regions of β_2 adrenergic receptor", submitted to Turkish Journal of Chemistry on Aug 2012, assigned to an editor.
8. Özcan, Ö., Uyar, A., Doruker, P., Akten, E.D., "Effect of Intracellular Loop 3 on Human β_2 -Adrenergic Receptor Dynamics: Another Inactive State Observed in Simulations", submitted to PLOS Computational Biology.

Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.