T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Ekrem YAŞAR

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

ANJİYOTENSİN 1-7 PEPTİDİNİN ANJİYOTENSİN TİP2 RESEPTÖR VE PROTO-ONKOGEN MAS RESEPTÖRÜYLE ETKİLEŞİMLERİNİN IN-SILICO YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Ekrem YAŞAR

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

ANJİYOTENSİN 1-7 PEPTİDİNİN ANJİYOTENSİN TİP2 RESEPTÖR VE PROTO-ONKOGEN MAS RESEPTÖRÜYLE ETKİLEŞİMLERİNİN IN-SILICO YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Ekrem YAŞAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nazmi YARAŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-5449 proje numarası ile desteklenmiştir.

"Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir"

2023-ANTALYA

TEŞEKKÜR

"*Hayatta en hakiki mürşit ilimdir, fendir. İlim ve fenden başka yol gösterici aramak gaflettir, dalalettir, cehalettir.*" sözüyle bilginin, ilim ve aklın en değerli hazine olduğunu vurgulayan Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e açtığı yolda ve gösterdiği hedefe durmadan yürüme fırsatını biz Türk gençlerine sunduğu için çok teşekkür ediyor, sonsuz saygılarımı sunuyorum.

Doktora çalışmalarım boyunca danışmanlığımı üstlenen, bu zorlu süreçte her koşulda yardımlarını esirgemeyen, fikirlerimi destekleyen ve onları hayata geçirmek için imkân sunan, yeniliğe açık, aydın ve çağdaş yönüyle hayatımda kendisini örnek aldığım kıymetli danışmanım Prof. Dr. Nazmi YARAŞ'a akademik bilgi ve becerilerime katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Doktora çalışmalarım süresince gece gündüz demeden her koşulda araştırmalarıma katkı sunan, her karşılaştığım sorunla ilgili mutlaka bir çözüm üreterek yardımlarını benden esirgemeyen, neşesiyle ve enerjisiyle bu zorlu süreçte güçlü kalmamı sağlayan kıymetli hocam Prof. Dr. Erol EROĞLU'na katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Doktoraya başlarken birlikte yola çıktığımız ve bu yolda birlikte mücadele ettiğimiz değerli dostlarım Dr. Enis HİDİŞOĞLU'na, Araş. Gör. Orhan ERKAN'a ve Araş. Gör. Mustafa MUNZUROĞLU'na desteklerinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim süresince birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve nice anılar biriktirdiğim Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı ailesinin kıymetli üyelerine, Helsinki Üniversitesi'nden Dr. Samuli Ollila'ya ve New York Üniversitesi'nden Prof. Nathaniel J. Traaseth'e akademik kariyer yolculuğumdaki katkılarından dolayı çok teşekkür ediyorum.

Doğru, adil, ilkeli ve ahlaklı bir yaşamın hayattaki en büyük kazanım olduğunu öğretme çabası içerisinde beni yetiştiren ve başarılarımın gizli kahramanları olan sevgili Anneme ve Babama, bu öz değerleri paylaştığım kardeşlerime ve benimle bu yolda sonsuza dek yürüyeceğine samimiyetle inandığım hem meslektaşım hem de yoldaşım olan sevgili eşim Dr. Segün DOĞRU YAŞAR'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)'nde Ang 1-7 peptidinin AT2R ve proto-onkogen MAS reseptörüyle ligand-reseptör etkileşimlerinin, ligand bağlanmasına dayalı reseptör dinamiklerindeki değişimlerin ve GPCR aktivasyon mekanizmalarının belirlenmesiyle RAS'ın koruyucu koldaki moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Ang 1-7 ve Ang II peptitlerinin AT2R ve MAS reseptörleriyle moleküler kenetlemeleri yapılmış, elde edilen ilk bağlanma pozları kullanılarak reseptörlerin inaktif ve aktif benzeri yapılarına ligandların bağlı olduğu ve olmadığı durumlar için kompleks yapılar elde edilmiştir. Bu yapılar membrana yerleştirildikten sonra simülasyon dosyaları hazırlanmış ve 1μs süreli MD simülasyonlar yürütülmüştür. Simülasyonlardan elde edilen yörünge dosyaları ile birçok in-silico program kullanılarak analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Ang 1-7 ve Ang II ligandları AT2R'nin, Ang 1-7 ligandı da MAS reseptörünün inaktif ve aktif benzeri yapılarına 1μs MD simülasyon boyunca kararlı bir bağlanma göstermiştir. Ang 1-7 ve Ang II ligand bağlanmaları AT2R'nin yapısal dinamiklerinde bir etkiye sahip olsa da reseptör aktivasyonunu etkilemediği yönünde bulgulara ulaşılmıştır. Ang 1-7 ligand bağlanmasının ise MAS reseptörünün hem yapısal dinamiklerini etkileyebildiği hem de reseptör aktivasyonunda etkili bir rol alabileceği yönünde bulgulara erişilmiştir.

Sonuç: Ang 1-7'nin MAS ile etkileşiminin AT2R'ye kıyasla RAS'ta daha etkili olabileceği düşünülmüştür. Ang II bağlanmasının AT2R'nin aktif yapıda kalma süresini uzatmaya ve hücre içi G-protein bağlanma ihtimalini artırmaya çalıştığı düşünülmüştür. Reseptörlerin moleküler mekanizmalarını anlamak için oligomerleşmeleri ve G-protein bağlanmalarının da incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: RAS, Ang 1-7, AT2R, MAS, MD Simülasyon

ABSTRACT

Objective: It is aimed to elucidate the molecular mechanisms in a protective arm of the Renin-Angiotensin System (RAS) by determining the ligand-receptor interactions of Ang 1-7 peptide with AT2R and proto-oncogene MAS receptor, changes in receptor dynamics with ligand binding, and GPCR activation mechanisms in the RAS.

Method: Molecular docking of Ang 1-7 and Ang II peptides with AT2R and MAS receptors was performed. By using the first binding poses, complex structures were obtained for the inactive and active-like structures of the receptors, with and without ligands. After these structures were placed on the membrane, input files were prepared and MD simulations with 1μs duration were carried out. The trajectory files obtained from the simulations were analyzed using many in-silico programs.

Results: Ang 1-7 and Ang II ligands showed stable binding to the inactive and active-like structures of AT2R and Ang 1-7 ligand to the inactive and active-like structures of MAS receptor throughout 1 μs MD simulation. Although Ang 1-7 and Ang II ligand binding had an effect on the structural dynamics of AT2R, but they did not affect receptor activation. It was found that Ang 1-7 ligand binding may affect both the structural dynamics of the MAS receptor and play an effective role in receptor activation.

Conclusion: It was thought that the interaction of Ang 1-7 with MAS may be more effective in the RAS compared to AT2R. Besides, It has led to the suggestion that Ang II binding may help to prolong the stable time of AT2R in the active state and increase the probability of intracellular G-protein binding. It is thought that oligomerization and G-protein binding should also be examined to understand the molecular mechanisms of receptors.

Key words: RAS, Ang 1-7, AT2R, MAS, MD Simulation

İÇİNDEKİLER

ÖZET		i
ABSTRACT		ii
İÇİNDEKİLER		iii
TABLOLAR DİZİNİ		iv
ŞEKİLLER DİZİNİ		
SİMGELER ve KISALTMALAR		
1. GİRİŞ		1
2. GENEL BİLGİLER		3
2.1.	Renin-Anjiyotensin Sistemi	3
2.1.1.	Renin-Anjiyotensin Sistem Bileşenleri	4
2.1.2.	Renin-Anjiyotensin Sistemin Fonksiyonel Mekanizması	7
2.2.	G-protein Bağlı Reseptörler	15
2.2.1.	GPCR'lerin Sınıflandırılması	16
2.2.2.	GPCR Aktivasyon Mekanizması	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM		21
3.1.	Reseptör ve Ligand Yapılarının Hazırlanması	21
3.2.	Moleküler Kenetleme	23
3.3.	Moleküler Dinamik Simülasyonlar	23
3.4.	Yörünge Analizleri	25
3.4.1.	RMSD ve RMSF Analizleri	25
3.4.2.	Mesafe Analizleri	26
3.5.	Ligand-Protein Etkileşim Analizleri	26
3.6.	Dihedral Açıların Analizleri	28
3.7.	Yapısal Dinamik ve Sinyal İletim Analizleri	28
3.7.1.	İletişim Eğilimi Analizleri	29
3.7.2.	Dinamik Çapraz Korelasyon Analizleri	29
3.7.3.	Dinamik Rezidü Etkileşim Ağı Analizleri	30
3.7.4.	Temel Bileşen Analizleri	31

4. BULGULAR 33
4.1. Ligand-Protein Etkileşimleri 33
4.1.1. Moleküler Kenetleme ve Ligand Etkileşimleri 33
4.1.2. Hidrojen Bağları 43
4.1.3. Tuz Köprüleri 48
4.1.4. Hidrofobik Etkileşimler 51
4.2. Yapısal Dinamik Değişimler 53
4.2.1. RMSD ve RMSF Analizleri 54
4.2.2. CP Analizleri 59
4.2.3. DCC Analizleri 61
4.2.4. DRIN Analizleri 63
4.2.5. PCA Bulguları 69
4.3. Aktivasyon Mekanizması 73
4.3.1. Hidrofobik-Kilit Analizleri 73
4.3.2. Mikro-Anahtar Motifler ve Dihedral Açıların Analizleri 80

5. TARTIŞMA 92
5.1. Reseptör-Ligand Etkileşimleri 93
5.2. Reseptörlerin Yapısal Dinamikleri 96
5.3. Reseptörlerin Aktivasyon Mekanizmaları 100

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 103

KAYNAKLAR 105

ÖZGEÇMİŞ 116

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	MD simülasyonlar için hazırlanan kompleks yapıların listesi.	24
Tablo 4.1.	AT2R ve MAS reseptörlerinin ligand kenetlemelerine ait bağlanma skorları.	34
Tablo 4.2.	İnaktif benzeri durumda AT2R'nin Ang 1-7 ve Ang II ligandları ile MD simülasyon boyunca etkileşimleri sırasındaki hidrojen bağları.	44
Tablo 4.3.	Aktif benzeri durumda AT2R'nin Ang 1-7 ve Ang II ligandları ile MD simülasyon boyunca etkileşimleri sırasındaki hidrojen bağları.	44
Tablo 4.4.	İnaktif ve aktif benzeri durumlarda MAS reseptörünün Ang 1-7 ligandı ile MD simülasyonlar boyunca etkileşimleri sırasındaki hidrojen bağları.	47
Tablo 4.5.	Ang 1-7 bağlanma durumunda hem artan hem de azalan BC ve ortalama L için AT2R rezidülerinin listesi.	65
Tablo 4.6.	Ang II bağlanma durumunda hem artan hem de azalan BC ve ortalama L için AT2R rezidülerinin listesi.	66
Tablo 4.7.	Ang 1-7 bağlanma durumunda hem artan hem de azalan BC ve ortalama L için MAS rezidülerinin listesi.	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Renin-anjiyotensin sistemi (RAS)'nin genel mekanizması.	4
Şekil 2.2.	Renin-anjiyotensin sistemi (RAS)'nin bileşenleri.	6
Şekil 2.3.	RAS bileşenlerinin fizyolojik etkileşim yolakları	12
Şekil 2.4.	G-protein bağlı reseptörlerin yapısı.	16
Şekil 2.5.	G-protein bağlı reseptör türleri ve sınıflandırması.	18
Şekil 2.6.	A sınıfı G-protein bağlı reseptörlerin genel aktivasyon mekanizması.	19
Şekil 3.1.	Anjiyotensin ligandlarının 3D yapıları ve kimyasal formülleri.	21
Şekil 3.2.	RAS'ın koruyucu koldaki reseptör bileşenleri.	22
Şekil 4.1.	AT2R'nin Ang II ile en iyi kenetleme skorlarına sahip 2D ligand etkileşimleri.	35
Şekil 4.2.	AT2R'nin Ang 1-7 ile en iyi kenetleme skorlarına sahip 2D ligand etkileşimleri.	36
Şekil 4.3.	MAS reseptörünün Ang 1-7 ile en iyi kenetleme skorlarına sahip 2D ligand etkileşimleri.	37
Şekil 4.3.	AT2R'nin en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri.	36
Şekil 4.4.	İnaktif benzeri AT2R'nin en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri.	39
Şekil 4.5.	Aktif benzeri AT2R'nin en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri.	40
Şekil 4.6.	MAS reseptörünün en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri.	41
Şekil 4.7.	AT2R'ye bağlanan ligandların RMSD ve mesafe analizleri.	42

Şekil 4.8. AT2R için ligand-protein arasındaki hidrojen bağları. 43

Şekil 4.9. MAS reseptörü için ligand-protein arasındaki hidrojen bağları. 46

Şekil 4.10. AT2R için ligand-protein arasındaki tuz köprüleri. 48

Şekil 4.11. MAS reseptörü için ligand-protein arasındaki tuz köprüleri. 50

Şekil 4.12. AT2R için ligand-protein arasındaki hidrofobik etkileşimler. 52

Şekil 4.13. MAS reseptörü için ligand-protein arasındaki hidrofobik etkileşimler. 53

Şekil 4.14. AT2R için RMSD ve RMSF analizleri. 54

Şekil 4.15. AT2R'nin TM sarmal yapılarına ait RMSD analizleri. 55

Şekil 4.16. MAS reseptörü için RMSD ve RMSF analizleri. 57

Şekil 4.17. MAS reseptörünün TM sarmal yapılarına ait RMSD analizleri. 58

Şekil 4.18. AT2R için CP analizleri. 59

Şekil 4.19. MAS reseptörü için CP analizleri. 60

Şekil 4.20. AT2R için DCC analizleri. 61

Şekil 4.21. MAS reseptörü için DCC analizleri. 63

Şekil 4.22. İnaktif durumda AT2R için DRIN analizleri. 64

Şekil 4.23. Aktif durumda AT2R için DRIN analizleri 64

Şekil 4.24. MAS reseptörü için DRIN analizleri. 67

Şekil 4.25. AT2R için PCA analizleri. 71

Şekil 4.26. MAS reseptörü için PCA analizleri. 72

Şekil 4.27. İnaktif benzeri AT2R için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. 74

Şekil 4.28. Aktif benzeri AT2R için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. 75

Şekil 4.29. İnaktif benzeri MAS reseptörü için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. 77

Şekil 4.30. Aktif benzeri MAS reseptörü için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. 78

Şekil 4.31. AT2R için mikro-anahtar motiflerin yapıları. 82

Şekil 4.32. AT2R için mikro-anahtar PIF motifinin dihedral açıları. 83

Şekil 4.33. AT2R için mikro-anahtar DRY motifinin dihedral açıları. 84

Şekil 4.34. AT2R için mikro-anahtar CWxP motifinin dihedral açıları. 85

Şekil 4.35. AT2R için mikro-anahtar NPxxY motifinin dihedral açıları. 87

Şekil 4.36. MAS reseptörü için mikro-anahtar NPxxY motifi. 88

Şekil 4.37. MAS reseptörü için mikro-anahtar NPxxY motifinin dihedral açıları. 91

SİMGELER ve KISALTMALAR

RAS : Renin Anjiyotensin Sistem

ANG : Anjiyotensin

AGT : Anjiyotensinojen

ACE : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim

GPCR : G-Protein Bağlı Reseptör

AT1R : Anjiyotensin II Tip 1 Reseptör

AT2R : Anjiyotensin II Tip 2 Reseptör

MAS : Proto-Onkogen MAS Reseptör

PDB : Protein Veri Bankası

NMR :Nükleer Manyetik Rezonans

TM : Transmembran

ECL : Hücre Dışı Bağlayıcı Kalıntı

ICL : Hücre İçi Bağlayıcı Kalıntı

GRK : GPCR Kinaz

GDP : Guanozin Difosfat

GTP : Guanozin Trifosfat

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

IP3 : İnozitol Trifosfat

DAG : Diaçilgliserol

ITScorePeP : İstatistiksel Potansiyel Tabanlı Puanlama Fonksiyonu

MD : Moleküler Dinamik

OPM : Proteinlerin ve Membranların Yönelimleri

PPM : Proteinlerin Membran İçinde Konumlandırılması

PME : Ewald Parçaçık Ağı

NPT : Sabit Sayıya, Basınca ve Sıcaklığa Dayalı Sistem Simülasyonu

NVT : Sabit Sayıya, Hacme ve Sıcaklığa Dayalı Sistem Simülasyonu

CP : İletişim Eğilimi

DCC : Dinamik Çapraz Korelasyon

DRIN : Dinamik Rezidü Etkileşim Ağı

BC : Arasındalık Merkeziliği

PCA : Temel Bileşen Analizi

RMSD : Kök Ortalama Kare Sapma

RMSF : Kök Ortalama Kare Dalgalanma

COM : Kütle Merkezi

VMD : Görsel Moleküler Dinamik

POPC : 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin

POPE : 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin

CHL : Kolesterol

1. GİRİŞ

Renin-Anjiyotensin Sistemi (RAS), vücuttaki kardiyovasküler fonksiyonların ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir hormon sistemidir. Bu sistemin başta hipertansiyon olmak üzere kalp yetmezliği, böbrek hastalıkları gibi bir dizi patolojik durumda etkili olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, son yıllarda yapılan araştırmalar, RAS bileşenlerinin kanser gelişimi ve ilerlemesi üzerinde de etkili olabileceğini göstermektedir. Birçok patolojik durumda etkisi bilinen bu sistemin moleküler mekanizmalarını anlamak ve bileşenlerinin fonksiyonlarını belirlemek oldukça önemlidir ve bu konuda yapılan çalışmalar henüz yeterli olmasa da artarak devam etmektedir.

RAS mekanizması dolaşım ve yerel doku bileşenlerini içeren ikili bir dengeleyici sistemden oluşmakta, ayrıca RAS bileşenlerinin yıkıcı ve yapıcı etkileri olduğu bilinmektedir. RAS'ta koruyucu kol (protective arm) olarak bilinen ACE2/Ang 1-7/MAS ekseni ile ilgili araştırmalar patolojik durumlarda düzenleyici bir görev üstlendiğini ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra RAS'ın, Anjiyotensin ligandları, enzimleri ve reseptörleri gibi birçok bileşeninin bulunması ve kompleks bir yapıya sahip olması nedeniyle bu bileşenlerinin fonksiyonlarının belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

RAS'taki Anjiyotensin reseptörleri A sınıfı G-protein bağlı reseptör (GPCR) ailesinin üyeleridir. Bu reseptörler hücre dışı ligand bağlanmasıyla aktive olan ve hücre içerisinde farklı tipleri bulunan G-proteinleri ve β-arrestin proteinlerine bağlanarak hücre içi sinyal iletiminde önemli bir rol oynayan membran proteinleridir. RAS'taki moleküler mekanizmaları anlamak ve Anjiyotensin ligandlarının bu reseptörler üzerinden hücre içi etkileşim mekanizmalarını belirlemek için deneysel ve hesaplamalı çalışmalar sürdürülmektedir. GPCR'lerin ligand bağlanmasına dayalı yapısal değişimleri ve aktivasyon mekanizmaları hücre içi sinyal iletim mekanizmalarını belirlemek için oldukça önemlidir ve farklı sınıflara ait GPCR aileleri için birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle GPCR'lerin aktivasyon mekanizmaları henüz tam olarak belirlenmemiş olup bu konuda da çalışmalar devam etmektedir.

RAS'ın koruyucu koldaki moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmanın başta kardiyovasküler patolojiler olmak üzere hastalıkların tedavisinde önemli olduğu düşünülmektedir. Bu koruyucu koldaki mekanizmadan sorumlu olduğu düşünülen reseptörlerin başta -sartan grubu ilaçlar olmak üzere belirli blokörler tarafından inhibe edilmesiyle özellikle hipertansiyon tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmesine rağmen bu geçici çözümlerin ötesine geçilememiştir. Bu nedenle Anjiyotensin ligandlarının bağlanmalarına dayalı reseptör aktivasyonlarına ait fonksiyonel mekanizmaların aydınlatılması patolojik durumların kalıcı olarak çözülmesi için önemlidir.

Çalışmamızda özellikle RAS'ın koruyucu koldaki moleküler mekanizmalarını belirlemek için RAS bileşenlerinden AT2R ve MAS reseptörlerinin Ang 1-7 ligandıyla olan etkileşimleri, bu etkileşimlere dayalı reseptörlerin yapısal dinamik değişimlerinin ve aktivasyon mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmalarımız sonucunda Ang 1-7 ligandının RAS'ın koruyucu kolunda AT2R'ye kıyasla MAS reseptörü aracılı bir etkiye sahip olabileceği ve MAS reseptörünün aktivasyonuna aracılık edebileceğine yönelik bulgular elde edilmiştir. Ayrıca Ang II ligandının AT2R'ye bağlanması durumunda yaklaşık 500 ns boyunca reseptörün aktif benzeri yapıda kalmasına aracılık ederek G-protein bağlanma olasılığını artırabileceği düşünülmüştür.

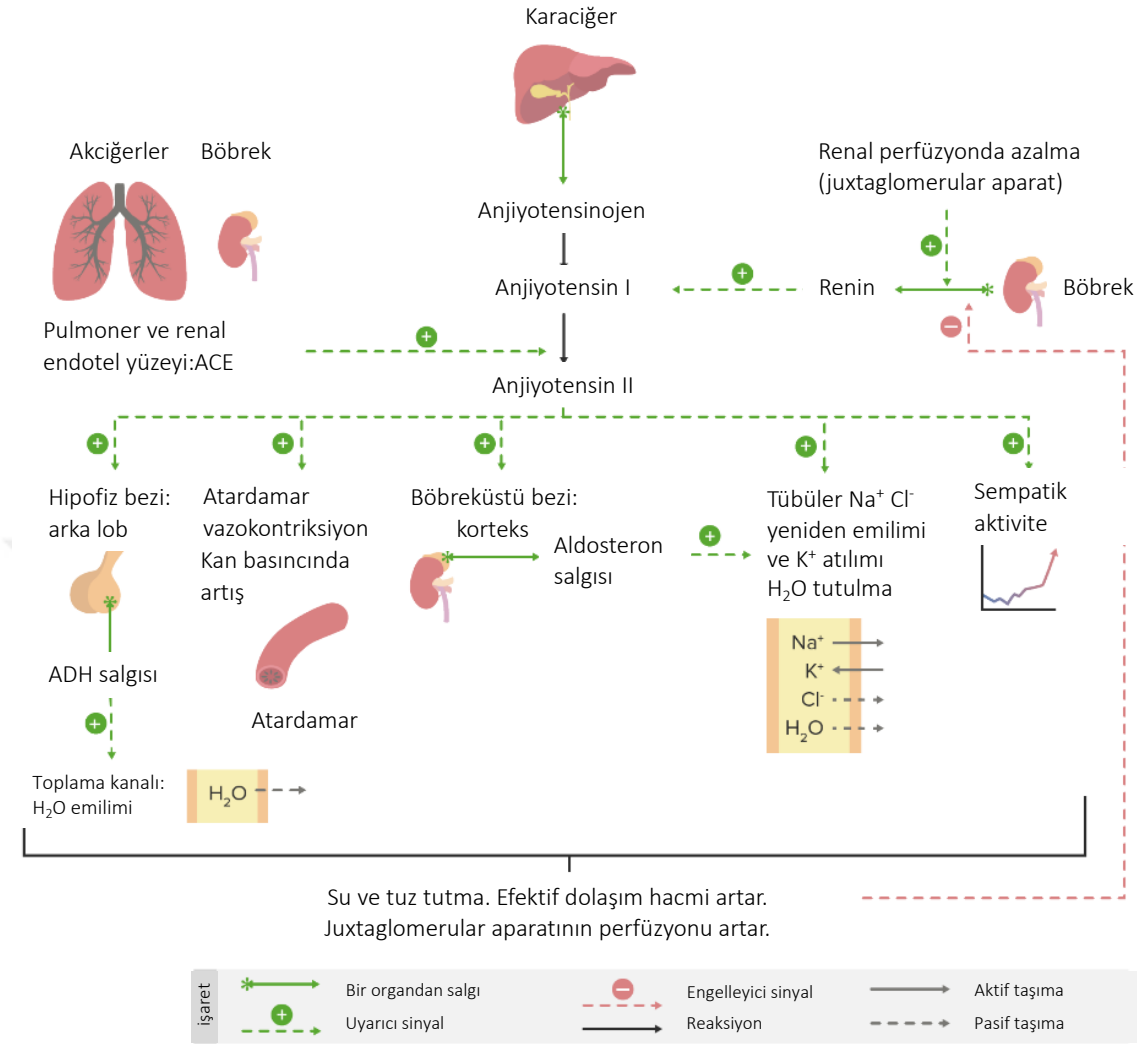
Sonuç olarak çalışmamızda GPCR ailesinin birer üyesi olan AT2R ve MAS reseptörlerinin aktivasyon mekanizmalarını belirlemek için elde ettiğimiz bulgular ile GPCR'lerin genel aktivasyon mekanizması için önerilen hipotezi desteklediği görülmüş, RAS'ın koruyucu koldaki etkin mekanizmasının Ang 1-7 bağlanmasına dayalı MAS reseptörü aracılığıyla gerçekleşebileceğine dair kanıtlar elde edilmiş ve belirlenen ligand-reseptör etkileşimleri ile yeni ilaç tasarımlarına katkıda bulunulacağı düşünülmüştür. Ang 1-7 ligandının farklı iki reseptöre bağlanmasına dayalı bulgular RAS'ın koruyucu koldaki moleküler mekanizmalarını aydınlatmada bu reseptörlerin oligemer yapılarının da araştırılması gerektiği düşüncesini doğurmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Renin-Anjiyotensin Sistemi

Renin-anjiotensin sistemi (RAS), vücuttaki kan basıncını ve sıvı dengesini düzenleyici role sahip olan bir hormon sistemi olarak değerlendirilir (Vallotton, 1987; Ferrario, 1990; Carey ve ark., 2003; Nehme ve ark., 2019). RAS'ın ana işlevi, kan basıncını kontrol etmek ve vücuttaki sıvı dengesini düzenlemektir (Unger Thomas, 2002; Paul ve ark., 2006; Kobori ve ark., 2007). Düşük kan basıncı veya düşük sodyum seviyelerinde böbreklerdeki özelleşmiş jukstaglomerular hücreler tarafından renin enzimi salgılanır (Sparks ve ark., 2014). Renin, karaciğer tarafından kana salgılanan bir protein olan Anjiyotensinojeni (AGT) Anjiyotensin I'e (Ang I) dönüştürür (Carey, 2015). Anjiyotensin I ise daha sonra Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) ile Anjiyotensin II (Ang II)'ye dönüştürülür. Ang II, kan damarlarını daraltarak kan basıncını yükseltir ve aynı zamanda adrenal bezlerde aldosteron salınımını uyarır. Aldosteron, böbreklerde su ve tuzun geri emilimini artırır, böylece sıvı dengesini ve kan basıncını düzenler (Hall J., 1986; Hall J. E. ve ark., 1996). Kan dolaşımı boyunca yer alan bileşenlerin etkileşimleriyle vücudun genel dolaşım sistemine yayılan, kan basıncı ve sıvı dengesinin düzenlenmesinde genel bir etkiye sahip olan bu mekanizma sistemik RAS mekanizmasıdır. Bununla birlikte böbrekler, kalp, beyin, akciğerler, karaciğer, bağırsaklar, kaslar, deri ve pankreas gibi belirli dokularda bulunan ve lokal düzeyde etkili olan bir RAS mekanizması da bulunmaktadır (Paul ve ark., 2006; Leung Po Sing, 2010). Lokal RAS; kalp kası hücrelerinde büyüme ve doku onarımında, böbreklerde sodyum ve su dengesini düzenlemede ve ayrıca inflamasyon süreçlerinde rol oynamaktadır (Fyhrquist ve ark., 2008). Bu nedenle, genel RAS'tan bağımsız olarak lokal RAS etkinliği değişebilir ve farklı dokular arasında farklılık gösterebilir.

RAS, vücutta bir denge mekanizması olarak önemlidir, ancak bazı durumlarda sorunlara da yol açabilir. RAS'ın aşırı aktive olması durumunda, yüksek kan basıncı (hipertansiyon) ve böbrek hastalıkları gibi sorunlara neden olabilir (Ibrahim, 2006; Barri, 2008; Capelli ve ark., 2020). Bu nedenle, bu hastalıkların tedavisinde RAS'ın etkilerini düzenlemeye yönelik ilaçlar kullanılmaktadır.



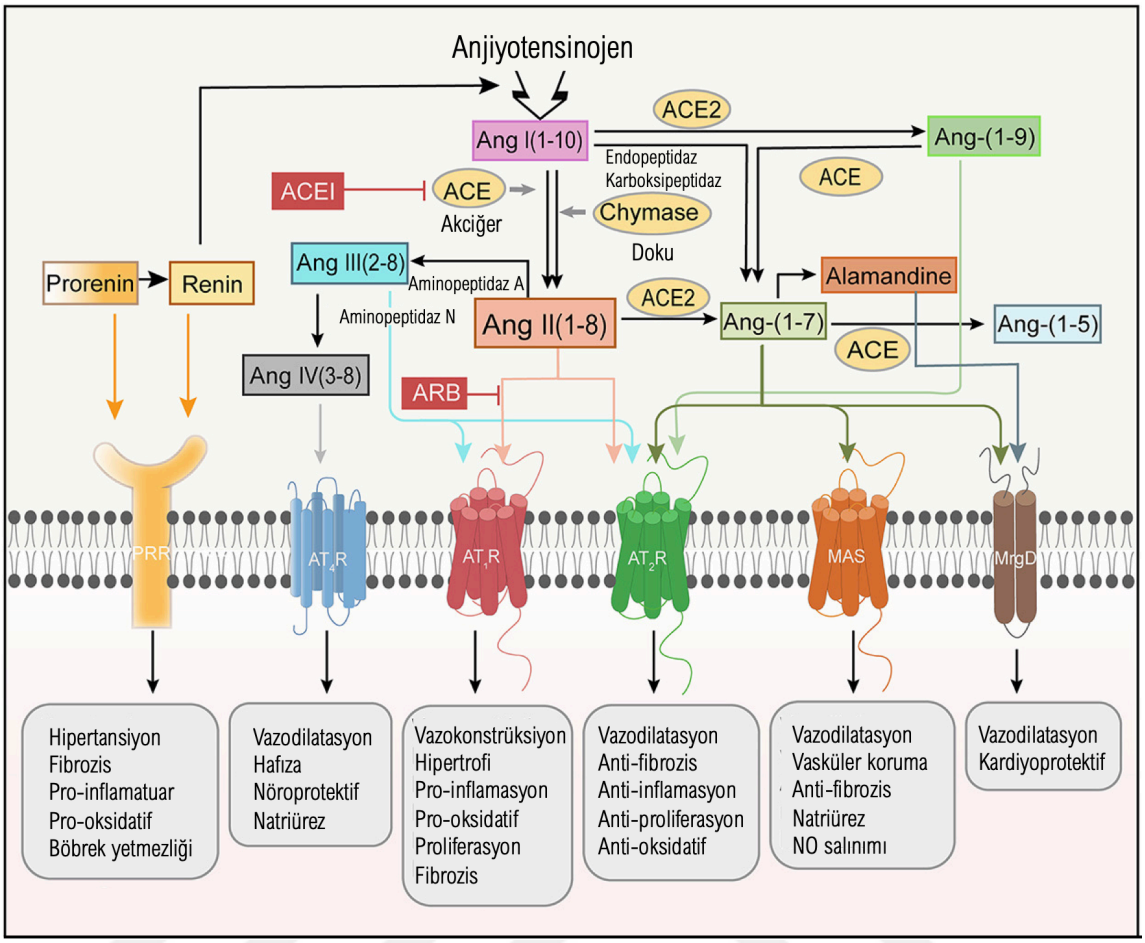
Şekil 2.1. Renin-anjiyotensin sistemi (RAS)'nin genel mekanizması. (Lisans: CC BY-NC-SA 4.0)

2.1.1. Renin-Anjiyotensin Sistem Bileşenleri

RAS'ın peptitler, reseptörler ve enzimlerden oluşan bazı temel bileşenleri bulunmaktadır. Bu bileşenlerden Renin, böbreklerde jukstaglomerüler hücreler tarafından salgılanan bir enzimdir ve düşük kan basıncını veya düşük sodyum seviyelerini algılandığında salınır (Schnermann, 1998; Yamaguchi ve ark., 2023). Karaciğerde üretilen ve kan dolaşımında bulunan bir protein olan AGT'nin renin tarafından etkilenmesiyle Ang I oluşur. Ang I toplam 10 amino asitten oluşan polipeptit bir yapıya sahiptir. Ang I özellikle akciğerlerde ve bazı diğer dokularda bulunan ACE adı verilen bir enzim tarafından Ang II'ye dönüştürülür (Ng ve ark., 1967; Wong, 2021). ACE tarafından inaktif formdaki Ang I'in

son iki amino asidi kesilerek oluşan Ang II, toplam 8 amino asitten (DRVYIHPF/Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7-Phe8) oluşan polipeptit yapıya sahiptir ve aktif formda bulunmaktadır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 1046.2 Dalton (Da) olup kimyasal formülü $C_{50}H_{71}N_{13}O_{12}$ şeklindedir. Ang II, kan damarlarının daralmasına neden olarak kan basıncının artmasını sağlayan güçlü bir vazokonstriktif peptittir. Ayrıca Ang II'nin aldosteron hormonunun adrenal korteksten salgılanmasını uyarmak gibi farklı görevleri de tanımlanmıştır (Leung Po S, 2004; Cheng ve ark., 2005). Ang II'nin aldosteron başta olmak üzere kan basıncının düzenlenmesi, su-elektrolit dengesi, vazokonstriksiyon, katekolamin salınımı, Na^+ ve su emilimi, hücre büyümesi ve kardiyak hipertrofisi gibi fizyolojik etkileri RAS'taki reseptörler aracılığıyla sağlanmaktadır. Ang II'nin yanı sıra, RAS'ta Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2) ve aminopeptidazlar ile Ang II'nin bazı ilk ve son amino asitlerinin kesilmesiyle Ang III [Ang (2-8)], Ang IV [Ang (3-8)], Alamandin ve Ang 1-7 gibi farklı anjiyotensin peptidleri de oluşmaktadır (Mendoza-Torres ve ark., 2015). Bu peptitlerden Ang 1-7, ACE2 tarafından Ang II'nin son amino asidi olan fenilalanin (Phe)'in koparılmasıyla oluşur ve toplamda 7 amino asitten (DRVYIHP/Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7) oluşan bir polipeptittir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 899.0 Da olup kimyasal formülü $C_{41}H_{62}N_{12}O_{11}$ şeklindedir. Ang 1-7, Ang II'nin aksine vazodilatatör etkiye sahip olan bir RAS bileşenidir. Ang 1-7'nin, kan damarlarının genişlemesine katkıda bulunduğu ve böylece kan basıncını düşürebildiği, ayrıca anti-inflamatuar ve anti-fibrotik etkilere de sahip olduğu düşünülmektedir (Freeman ve ark., 1996; Santos R. A. ve ark., 2000; Ferreira A. J. ve ark., 2001; Benter ve ark., 2007).

RAS'ın düzenlenmesinde ve dengelenmesinde önemli bir rol oynayan, RAS'ın fizyolojik etkilerine Ang II veya Ang 1-7 gibi ligandlarla etkileşime girerek aracılık eden reseptör bileşenleri de bulunmaktadır. Bu reseptörler A sınıfı G-protein bağlı reseptör (GPCR) ailesine ait Anjiyotensin II Tip 1 Reseptör (AT1R), Anjiyotensin II Tip 2 Reseptör (AT2R), Proto-onkogen MAS reseptörü ve MAS ile ilişkili G proteinine bağlı reseptör ailesinin bir üyesi olan MrgD reseptörüdür (Unger Th ve ark., 1996; Stroth ve ark., 1999; Dinh ve ark., 2001).



Şekil 2.2. Renin-anjiyotensin sistemi (RAS)'nin bileşenleri (Yi ve ark., 2022).

Bu reseptör bileşenlerinden AT1R, bir G-protein bağlantılı reseptör olarak çalışır ve Ang peptitleri aracılığıyla vazokonstriksiyonu sağlayarak kan basıncını artırır. Ayrıca aldosteron salınımını ve böbrekte su ve tuzun geri emilimini artıran etkileri de bulunmaktadır. AT1R, birçok dokuda bulunur, özellikle kan damarlarında, böbreklerde, kalpte ve beyinde yoğun olarak ifade edilmektedir (Thomas ve ark., 2003; Singh Khuraijam D ve ark., 2020). AT2R, genellikle vazodilatatör etkilere sahiptir, yani kan damarlarının genişlemesine yardımcı olabilir. Ayrıca anti-inflamatuar ve anti-proliferatif (hücre çoğalmasını önleyici) etkilerinin de olduğu gösterilmektedir. Ayrıca AT2R, gelişim süreçlerinde ve doku onarımında da rol oynamaktadır (Carey ve ark., 2000; Savoia ve ark., 2007; Chow ve ark., 2016). MAS reseptörünün özellikle kalp, böbrekler, beyin ve çeşitli dokularda ekspresyonu yüksektir ve Ang 1-7'nin öncelikli reseptörü olarak bilinmektedir. RAS'ta Ang 1-7'nin, genellikle Ang II'ye karşı zıt etkilere sahip olduğu

düşüncesi nedeniyle MAS reseptörü vazodilatasyon ve anti-proliferatif etkilerle ilişkilendirilmektedir. Ayrıca anti-inflamatuar, anti-fibrotik ve anti-oksidatif etkilere sahip olabileceği yönünde bulgular da mevcuttur (Gironacci ve ark., 2011; Rodrigues Prestes ve ark., 2017; Bader ve ark., 2018).

2.1.2. Renin-Anjiyotensin Sistemin Fonksiyonel Mekanizması

Hipertansiyon, kardiyak hipertrofi, fibröz ve beyin gelişimi ile ilgili birçok patolojik durumun bu RAS sistemi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, Şekil 2.3'te fizyolojik etkileşim yolakları gösterilen RAS'ın nasıl işlediğinin ve ayrıntılarıyla bilinmesinin bu hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir (Murray ve ark., 2020; Saavedra, 2020).

RAS, indirgenmiş ya da oksitlenmiş bir durumda bulunabilen AGT ifadesiyle başlamaktadır (Zhou A. ve ark., 2010). Renin enzimi, (pro)renin reseptörüne (Jan Danser ve ark., 2007) bağlanmasıyla veya pro bölgesinin enzimatik olarak bölünmesiyle aktive edilen bir pro-formda (enzimatik olmayan) (Morales ve ark., 2012) eksprese edilmektedir. Renal kan akımı azaldığında, böbreklerdeki jukstaglomerular hücrelerden kanda bulunan öncül (pro)renin, renin haline dönüştürülmekte ve sonrasında renin doğrudan dolaşım içine salgılanmaktadır. Plazma renin daha sonra karaciğer tarafından salınan AGT'den 9-10 amino asitlik bir peptid koparark Ang I dönüşümünü gerçekleştirmektedir (Prokop ve ark., 2013). Bu peptidin ayrılması ACE ile Ang II'nin meydana gelmesini sağlamaktadır. ACE2 ise Ang II peptidinin karboksil ucundaki 2 amino asidin koparılması ile Ang 1-7'nin oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca aminopeptidazlarla Ang III ve Ang IV peptidleri elde edilmektedir (Santos R. A. ve ark., 2008a). Yakın zamanda Ang 1-7/MAS ve Alamandin/MAS ile ilişkili MrgD (Tetzner ve ark., 2016) içeren yeni sinyal kaskadları tanımlanmış ve RAS'ta daha önce eksik olan yeni bir parçayı temsil etmişlerdir. RAS'taki bu yolla birlikte mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, biyolojik ve patofizyolojik önemi nedeniyle bu sinyal basamaklarının RAS'ın karmaşıklığını anlamak açısından yeni adımlar olacağı düşünülmektedir.

RAS bileşenlerinin özelliklerini ve etki mekanizmalarını anlamak için yapılan çalışmalar sistemdeki Ang peptidleri, bu peptidlerin bağlandığı GPCR'ler ve reseptör blokörleri hakkında önemli bilgiler elde edilmesini sağlamıştır. RAS'taki Ang peptidlerinden Ang I,

genellikle akciğer endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan ACE tarafından Ang II'ye dönüştürülmektedir (Santos R. A. ve ark., 2006). Bir oktapeptid hormonu olduğu bilinen Ang II, RAS fonksiyonlarının en önemli elemanıdır. Ang II üretiminin ve etkisinin farmakolojik inhibisyonu, Ang II'nin hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıklarda oynadığı kritik rol nedeniyle ilaç geliştirme için ana hedeflerden biri olduğu ifade edilmektedir (Dasgupta ve ark., 2011). Ang II, kan damarlarının daralmasına neden olarak kan basıncının artmasını sağlayan güçlü bir vazokonstriktif peptidtir. Ang II ayrıca aldosteron hormonunun adrenal korteksten salgılanmasını uyarmaktadır (Gaidarov ve ark., 2018). Aldosteron elektrolit dengesini korumak için renal tübüllerden Na^+ ve suyun kana emilimini artırarak potasyum (K^+) atılımını sağlayan, ayrıca kan basıncı homeostazisine katkısı olan bir hormondur. Ang II'nin aldosteron başta olmak üzere kan basıncının düzenlenmesi, su-elektrolit dengesi, vazokonstriksiyon, katekolamin salınımı, Na^+ ve su emilimi, hücre büyümesi ve kardiyak hipertrofisi gibi pek çok yaşamsal fizyolojik etkileri reseptörleri aracılığıyla sağlanmaktadır (Gheblawi ve ark., 2020). Ang II, RAS'ın aktif aracısıdır ve vasküler kasılma, aldosteron salgılanması, katekolamin salınımı, glikojenoliz, azalmış renal filtrasyon ile kalp ve damar dokusunda miyoproliferasyon dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik etkileri olduğu bilinmektedir (Bouley ve ark., 1998).

İnsanlarda ve diğer memelilerde Ang II eylemlerinin aracıları RAS'taki hücre zarı yüzeyinde bulunan AT1R ve AT2R reseptörleridir. Son yıllarda Ang II ve aktif türevlerinin kardiyovasküler sistemdeki karmaşık etkilerine dört reseptörün daha aracılık ettiği sıkça bildirilmektedir (Regitz-Zagrosek ve ark., 1996; Singh Khuraijam Dhanachandra ve ark., 2016; Wang J. ve ark., 2018; Wu C.-H. ve ark., 2018; Nehme ve ark., 2019). Yakın zamana kadar, AT1R ve AT2R birincil aracılar olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte MAS ve Ang reseptör tip-4 (AT4R) reseptörleri RAS'taki peptidlerin etkilerini aydınlatmak için katkı sunmaktadırlar (Musial ve ark., 2018). Ang II'ye atfedilen fizyolojik etkilerin çoğuna AT1R aracılık etmektedir. Bunun yanı sıra AT2R'nin apoptozise aracılık ettiği düşünülmektedir (Miura ve ark., 1999). Her iki reseptörün de membranın iki tarafındaki üç ilmek ile birbirine bağlanmış, bir dizi potansiyel Serine (Ser)/Threonine (Thr) fosforilasyon bölgesi içeren hücre dışı bir glikozile edilmiş amino terminali ve hücre içi bir karboksil kuyruğu ile bağlanmış α-heliksel yedi transmembran

(TM) segment içerdiği tahmin edilen integral membran gliko-proteinleri olduğu bilinmektedir (Miura ve ark., 1999). Bu reseptörler için önerilen yapısal motif, her iki Ang II reseptör sınıfının heterotrimerik G-proteinlerine eşlenmiş olduğunu göstermektedir (Dasgupta ve ark., 2011; Balakumar ve ark., 2014). Her iki reseptörün de lokal sıvı homeostazı, hücre proliferasyonu, fibroz ve vazodilatasyonun düzenlenmesinde oldukça önemli fakat zıt rollere sahip oldukları bilinmektedir. Yapılan bir AT2R knock-out gen çalışmasında, AT2R'nin baskılanması ile kan basıncında artış olduğu gösterilmiş ancak AT2R'nin agonistleriyle yapılan diğer bir çalışmada kan basıncında belirgin bir düşüş olmadığı görülmüştür (Li ve ark., 2012; Faria-Costa ve ark., 2014; Sumners ve ark., 2015). Ang II, AT1R'ye bağlandığında bir kan basıncı artışı (Ito ve ark., 1995) / proanjiyojenik / proliferatif etki (Schorb ve ark., 1993) gösterirken AT2R'ye bağlandığında, kan basıncında bir düşüş (Ichiki ve ark., 1995) / antianjiyojenik / antiproliferatif bir etki göstermektedir. İnsan myometriumunda eksprese edilen baskın Ang II reseptörü, AT2R'dir ve miyometriyum membranlarında mevcut olan AT2R'nin yüksek bir afiniteye (pKd = 9.18) sahip olduğu ve nispeten bir protein (53-253 fmol/mg protein) bolluğu sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca AT2R'nin insan miyometriyumdan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-gel electrophoresis) ile biyokimyasal karakterizasyonu 66-70 kilodalton (kDa) civarında görünür bir moleküler kütleye sahip glikoprotein özelliği göstermektedir (Lazard ve ark., 1994; Servant ve ark., 1994). AT2R peptid hormonunun C-terminal pozisyonu için AT1R'de gözlemlenen duruma benzer bir yapı-aktivite ilişkisi gösterdiği ancak, AT1R ve AT2R arasında temelde farklılık olduğunu göstermektedir (Bouley ve ark., 1998) ve AT2R'nin fizyolojik rolleri hala tartışma konusudur.

AT1R ve AT2R'ye ek olarak, farklı bir Ang reseptör tipi olan MAS reseptörü tanımlanmıştır (Young ve ark., 1986; Bader ve ark., 2018). Endojen bir heptapeptit olan MAS'ın, Ang 1-7 ile aktive olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca MAS reseptör etkilerinin çoğunlukla AT1R'nin etkileriyle zıt olduğu belirtilmektedir. Ang 1-7'nin proto-onkogen MAS reseptörünü aktive ettiği ve Ang II tarafından aktive edilen AT2R ile benzer yolları uyardığı gösterilmiştir (Jackson ve ark., 1988; Santos R. A. ve ark., 2003). Bununla birlikte MAS ile ilişkili genin de Ang peptidleri tarafından aktive edildiği öne sürülmüştür (Gembardt ve ark., 2008). MAS, NIH-3T3 hücrelerini transforme etme kabiliyetine bağlı

olarak 30 yıl önce proto-onkogen olarak klonlanmış bir GPCR'dir (Young ve ark., 1988). Yakın zamanlarda ise MAS reseptörü ile ilişkili G-protein bağlantılı reseptör (Mrgpr) ailesini oluşturan çok sayıda reseptör tanımlanmıştır (Dong ve ark., 2001). MAS reseptörünün testis ve beynin birçok bölgesinde yüksek bir ekspresyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca böbrek, kalp, kan damarları, dalak, retina, karaciğer, dil ve akciğer gibi birçok dokuda da eksprese edilmektedir (Bader ve ark., 2014; Solinski ve ark., 2014). MAS reseptörü keşfedilmesinden günümüze kadar kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve fizyolojik işlevini anlamak için birçok yol kullanılmıştır. MAS reseptörünün işlevi hakkındaki bilgilerimizin çoğu, MAS eksikliği olan hayvan çalışmalarından kaynaklanmaktadır. MAS eksikliği, kardiyomiyosit fonksiyonunun bozulmasına, genel kardiyak fonksiyon üzerindeki zararlı etkilere ve profibrotik değişikliklerin eşlik etmesine yol açmaktadır (Santos R. A. ve ark., 2006; Gava ve ark., 2012; Gomes ve ark., 2012). Ayrıca MAS eksikliğinin, endotel disfonksiyonuna, vasküler rezistansa ve yüksek tansiyona da yol açtığı gösterilmiştir (Rabelo ve ark., 2008; Xu P. ve ark., 2008; Wang Y. ve ark., 2017). Buna karşılık MAS eksikliği, tuz kaynaklı hipertansiyondan koruma sağlamıştır (Heringer-Walther ve ark., 2012). Bununla birlikte MAS ablasyonu hem böbrek hem de kalpte iskemi-reperfüzyon hasarına karşı da koruma sağlamaktadır (Zhang T. ve ark., 2012; Alenina ve ark., 2019). MAS eksikliği olan farelerde ayrıca böbrek ve metabolik bozukluklar ile hemostazda, diğer bazı doku ve organlarda ise patolojik değişiklikler görülmüştür (Santos Sérgio Henrique S ve ark., 2008b; Pinheiro ve ark., 2009; Mario ve ark., 2012). Buna karşılık, MAS eksikliğinin tuz kaynaklı hipertansiyondan koruma sağladığı ve MAS işlevini inhibe etmenin hem böbrekte hem de kalpte iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir (Castro ve ark., 2006; Esteban ve ark., 2009). Bu nedenle, MAS reseptörünün birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynadığı ve çoklu hastalıklarda yeni terapötiklerin geliştirilmesi için potansiyel bir hedef olduğu düşünülmektedir (Tirupula ve ark., 2014).

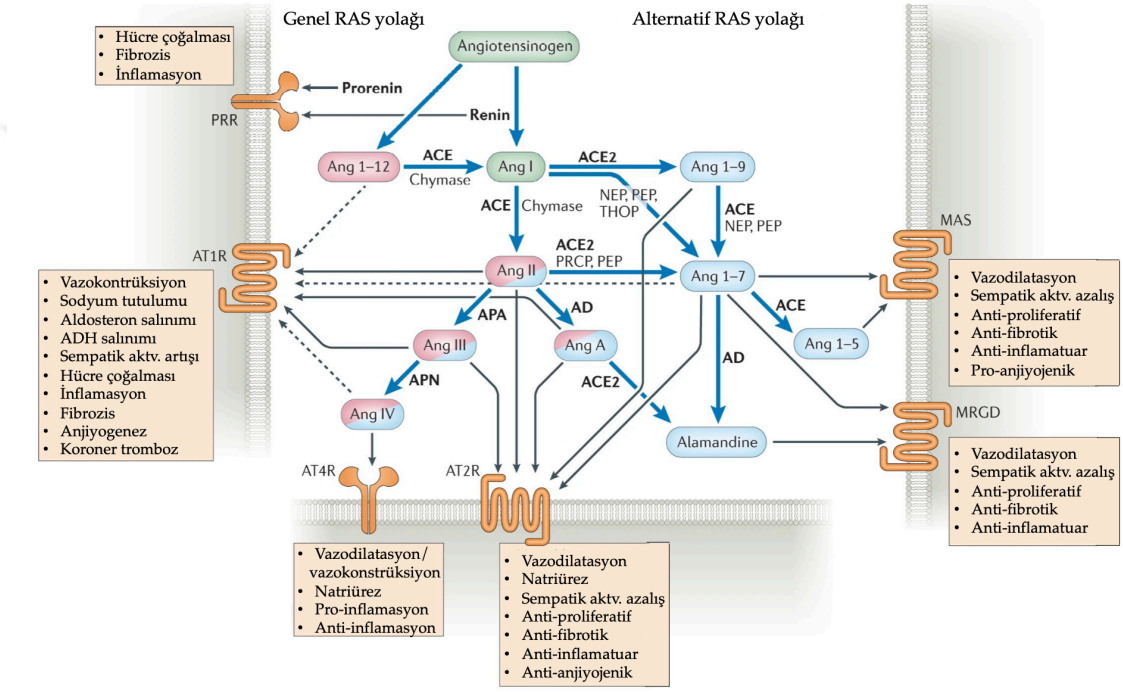
Ang II'nin bir türevi olan Ang 1-7, MAS reseptörü için endojen bir ligand olarak tanımlanmıştır (Santos R. A. ve ark., 2003). Ang 1-7 vazodilatör, kardiyoprotektif, antitrombotik, antidiüretik, antifibrotik etkilerle çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Ferreira A. ve ark., 2005; Simões e Silva ve ark., 2013; Santos Sérgio Henrique Sousa ve ark., 2014; Patel V. B. ve ark., 2016). Bu aktivitelerin birçoğu, MAS eksikliği olan

hayvanlarda veya dokularda kaybolmakta ve bu, Ang 1-7'yi potansiyel bir MAS reseptör ligandı olarak gösteren en zorlayıcı argüman olarak işlev görmektedir (Santos R. A. ve ark., 2003; Bader ve ark., 2014; Sobrino ve ark., 2017). Ang 1-7'nin MAS reseptörü ile doğrudan etkileşimi için var olan kanıtlar oldukça sınırlıdır ve Ang 1-7 bağlanma çalışmaları çoğunlukla eksiktir. Radyoaktif etiketli Ang 1-7'nin sıçan aortik endotel hücre (rat aortic endothelial cell, RAEC) membranlarına spesifik bağlandığı tespit edilmiş, ancak rekombinant MAS reseptörüne bağlanıp bağlanmadığı belirlenememiştir (Gaidarov ve ark., 2018). Ayrıca, birkaç ek raporda ifade edildiği üzere Ang 1-7'nin, rekombinant olarak eksprese edilen MAS yoluyla Gq aracılı sinyallemeyi aktive edemediği gösterilmiştir (Zhang T. ve ark., 2012; Tirupula ve ark., 2014). Bu durum Ang 1-7'nin endojen bir MAS reseptör ligandı olma rolünde önemli bir belirsizlik olduğunu göstermektedir.

Son zamanlarda, Ang 1-7'nin kalpteki faydalı etkilerine MAS reseptörünün aracılık ettiğini gösteren kanıtlar artmaktadır. Bununla birlikte, kardiyomiyositlerde bu etkilere katılan sinyal yolları ise henüz bilinmemektedir. MAS eksikliği olan farelerdeki kardiyomiyositler, vahşi tip kardiyomiyositlerle karşılaştırıldığında düşük ve daha yavaş kalsiyum (Ca^{+2}) geçişleri olduğu gösterilmiştir. Sarkoplazmik retikulum (SR) ekspresyon seviyelerinin düşük Ca^{+2} adenozin trifosfataz (ATPaz)'ı, MAS eksikliği olan kardiyomiyositlerde Ca^{+2}'nin geçici azalmasına eşlik ettiği görülmüştür. Bu nedenle, kronik MAS eksikliği, kardiyomiyositlerde Ca^{+2} kullanımında bozulmaya neden olmakta ve tüm bu gözlemler kardiyomiyosit fonksiyonunun bir modülatörü olarak Ang 1-7/MAS ekseni için kilit bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır (Dias-Peixoto ve ark., 2008). Ang 1-7 son birkaç yıl içinde ilgi çeken bir anjiyotensin haline gelmiştir ve hem kardiyovasküler hem de barorefleks eylemleri Ang II'nin etkileriyle karşılaştırılmaktadır.

MAS reseptörünün genetik delesyonu ile Ang 1-7'nin fare böbreklerine bağlanmasının ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. Buna göre MAS eksikliği olan fareler, akut bir su yükünden sonra Ang 1-7'nin antidiüretik etkisinden tamamen yoksun olduğu görülmüştür. Bu durumda Ang 1-7'nin MAS ile transfekte edilmiş hücrelere bağlandığı ve araşidonik asit salınmasını sağladığı öne sürülmüştür. Ayrıca, MAS eksikliği olan aortların, Ang 1-7 kaynaklı vazodilatasyon tepkilerini yitirdiği, dolayısıyla tüm bu bulguların MAS

reseptörünü Ang 1-7 için fonksiyonel bir reseptör olarak tanımladığı ve biyolojik olarak aktif peptidin fizyolojik etkileri için açık bir moleküler temel sağladığı düşünülmüştür (Santos R. A. ve ark., 2003). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada (Sampaio ve ark., 2007), endotel hücrelerinde Ang 1-7 etkisinin, endotelyal nitrik oksit (NO) sentaz (eNOS) fosforilasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinaz B/(Akt) bağımlı yoldan NO salınımına yol açtığı gösterilmiş ve Ang 1-7'nin MAS yoluyla kardiyomiyositlerin genel büyümesini azalttığı belirtilmiştir (Tallant ve ark., 2005).



Şekil 2.3. RAS bileşenlerinin fizyolojik etkileşim yolakları (Bekassy ve ark., 2022).

RAS bileşenlerinin fizyolojik etki mekanizmalarını belirlemek için yapılan bu çalışmalar dışında yapısal çalışmalar da bulunmaktadır. İlk olarak Ang peptitlerinden Ang II (PDB kodu: 1N9V) ve Ang 1-7 (PDB kodu: 2JP8) peptitlerinin NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi metoduyla 3-boyutlu (3D) yapıları belirlenmiştir (Spyroulias ve ark., 2003; Lula ve ark., 2007). Ang peptitlerinin yanısıra RAS reseptörlerinin yapısal modelleri göz önünde bulundurulduğunda AT1R ve AT2R'nin modellendiği birçok çalışma bulunmaktadır (Bouley ve ark., 1998; Miura ve ark., 1999; Clayton ve ark., 2015; Prokop ve ark., 2015; Zhang H. ve ark., 2021) ve bu çalışmalarda kıyaslama için

Rodopsin'in 3D yapısı kullanılmıştır, ancak MAS reseptör yapısının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar oldukça yetersizdir. Yapılan yapısal modelleme çalışmalarında önerilen modeller kullanılarak, Ang peptidlerinin her bir reseptöre nasıl bağlandığını, bağlanıp bağlanmadığını ve bağlanmanın yapıyı aktif hücre içi yolaklarda nasıl değiştirdiğini belirlemenin mümkün olabileceği düşünülmüştür. Yapısal protein modelleme teknikleri, sekans hizalamaları ve moleküler dinamik (MD) simülasyonlar kullanılarak Ang peptidlerinin moleküler kenetleme tahminleriyle birlikte AT1R, AT2R ve MAS'ın bilinen fonksiyonel verileri de kullanılarak, bu reseptörlerdeki Ang peptidleri için korunmuş herhangi bir bağlanma rolünün belirlenebilmesinin ve potansiyel proteinin ele alınmasının mümkün olduğu düşünülmektedir (Bader ve ark., 2014; Karnik ve ark., 2017; Santos R. A. S. ve ark., 2017).

AT1R, AT2R ve MAS reseptörlerinin Ang peptidleri tarafından aktivasyondaki benzerlik ve farklılıklarını belirlemek için biyokimyasal ve amino asit varyasyon verilerinin çoklu tür sekans dizilimleri, yapısal modeller ve bağlanma bölge tahminleri ile birleştirilerek yapılan bir çalışmada; Ang peptidlerinin reseptörlere nasıl bağlanıp aktive edebileceğinin görselleştirilmesine izin verdiği gösterilmiştir. Ayrıca reseptörlerde korunmuş ve değişken mekanizmaların tanımlanmasına da izin vermiştir. Sonuç olarak MAS'ın Ang II bağlanmasına değil Ang 1-7 lehine AT1R'den farklı olduğu ve AT2R'nin yakın zamanda Ang III'ü tercih ettiği ve bağladığı öne sürülmüştür (Kemp ve ark., 2019). Uzun yıllar boyunca AT1R'ye ait yapısal çalışmalar yalnızca homoloji modellemesiyle birleştirilmiş mutagenez deneylerine dayanmasına rağmen AT1R'nin kristalize edilmiş yapıları ile antagonistlerinin yakın zamanda yayınlanması karşılaştırmalı çalışmalara izin vermektedir. AT2R'nin 3D yapısal modeli, Rodopsin'in TM alanına homoloji modelleme yöntemleri kullanılarak inşa edilmiş, ayrıca AT2R modelinde bir Ang II model peptidinin yerleştirilmesiyle iki olası bağlanma modu tanımlanmıştır. Belirlenen bağlanma modlarının ise literatürde önerilen ligand-reseptör temas noktalarının çoğuyla uyumlu olduğu gösterilmiştir (Sköld ve ark., 2008). AT1R'ler, Ang II'nin neredeyse tüm fizyolojik etkilerine aracılık etmede önemli bir rol oynamaktadır. AT1R'yi etkili bir şekilde bloke edebilen ve hipertansiyonu olan hastalarda kan basıncını düşürebilen birkaç ilaç (-sartan grubu) mevcuttur. Halen, deneysel bir Ang II-AT1R yapısı mevcut değilken yapılan bir çalışmada homoloji modellemesi kullanılarak Ang II-AT1R yapısı modüle edilerek

ardından bağlanma alanlarının tanımlanması ve karakterizasyonu yapılmış, böylece reseptöre bağlanma durumları değerlendirilmiştir (Vyas ve ark., 2015).

Ang peptitlerinin AT1R, AT2R ve MAS reseptörleri ile etkileşimlerini araştıran bir grup tarafından yapılan iki farklı moleküler modelleme çalışmasında (Prokop ve ark., 2013; Prokop ve ark., 2015), I-TASSER sunucusunun yardımıyla ve homoloji modelleme yöntemleri kullanılarak bu reseptörlerin farklı türlere ait 3D yapıları ve bu yapıları içeren bir kütüphane oluşturulmuş, ardından Ang peptitleri ile moleküler kenetleme yapılarak ligand bağlanmasının stabilitesini değerlendirmek için MD simülasyonlar yürütülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen bulgular oldukça değerlidir, ancak simülasyonların kısa süreli olması nedeniyle ligandların reseptör dinamiklerini nasıl etkilediğine dair yeterli kanıt sunamamıştır.

RAS'ta koruyucu kol olarakta bilinen ACE2/Ang 1-7/MAS ekseni üzerindeki Ang 1-7 ile MAS etkileşiminin etkisini araştırmak amacıyla tez çalışmamızın ön bulguları ile yaptığımız çalışmada (Yasar ve ark., 2023), Ang 1-7'nin 300 ns simülasyon periyodu boyunca MAS reseptörüne kararlı bir şekilde bağlandığı, bu bağlanmanın MAS reseptörünün stabilitesini ve iletişimini nasıl etkilediği gösterildi.

RAS reseptörlerinin 3D yapılarını hesaplamalı modelleme yöntemleriyle elde etme çalışmaları RAS etkileşimlerini ve moleküler mekanizmalarını aydınlatmada yetersiz kalmış bu nedenle X-ışını kristalografisi, NMR spektroskopisi ve Kriyo-Elektron Mikroskobu (Kriyo-EM) gibi deneysel yöntemlerle RAS bileşenlerinin kristal yapıları elde edilmeye çalışılmıştır. İlk olarak AT1R'nin Olmesartan bağlı durumda 2.8 Å çözünürlükte kristal yapısı (PDB kodu: 4ZUD) X-ışını kristalografisi yöntemiyle belirlenmiştir (Zhang H. ve ark., 2015). Bu yapısal çalışma ile -sartan grubu bir Ang reseptör blokörü olan Olmesartan'ın AT1R'ye bağlanma alanları tanımlanmış ve RAS'ta yeni ilaç tasarımlarına aracılık etmiştir. GPCR'lerin membrandan izole edilmesini sağlayan tekniklerin gelişmesi reseptörlerin 3D yapılarını belirlemeye yönelik yapılan yapısal çalışmaları hızlandırmıştır. Daha sonra RAS'ta AT2R'nin 2.8 Å çözünürlükte aktif-benzeri kristal yapısı (PDB kodu: 5UNF, 5UNG, 5UNH) (Zhang H. ve ark., 2017) ve AT2R'nin Ang II bağlı durumda 3.2 Å çözünürlükteki kristal yapısı (PDB kodu: 6JOD) X-ışını kristalografisi yöntemiyle belirlenmiştir (Asada ve ark., 2018; Asada ve ark.,

2020). AT2R'nin 3D yapısını belirlemek için yapılan bu çalışmalar ile hem bir diğer RAS reseptörünün yapısı belirlenmiş hem de ilk kez RAS reseptörlerinin Ang peptitleriyle bağlanma durumları hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmalar RAS'taki reseptörler ve Ang türevi peptitlerin etkileşimleriyle RAS reseptörlerinin aktivasyon mekanizmalarına dair yeni öngörüler oluşmasına ve ayrıca RAS'ın moleküler mekanizmalarını anlamaya yönelik katkılar sunmuştur. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, MrgD reseptörünün Gi protein bağlı 3.1 Å çözünürlükteki kristal yapısı (PDB kodu: 7Y12, 7Y13, 7Y14, 7Y15) Kriyo-EM yöntemiyle belirlenmiştir (Suzuki ve ark., 2022). Bu çalışma ilk kez bir RAS reseptörünün G-protein bağlı yapısının belirlendiği ve hücre içi sinyal iletiminde diğer RAS reseptörlerinin nasıl bir davranış sergilediğini anlamada önemlidir. Yakın zamanda yapılan diğer bir çalışmada ise AT1R'nin hem Ang II ligandı hem de Gq ve β-arrestin proteinlerinin bağlı olduğu 2.9 Å çözünürlükteki kristal yapıları (PDB kodu: 7F6G) Kriyo-EM yöntemiyle elde edilmiştir (Zhang D. ve ark., 2023). Bu bilgilerin, kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için AT1R yapısına dayalı ilaç keşfini kolaylaştırabileceği düşünülmektedir.

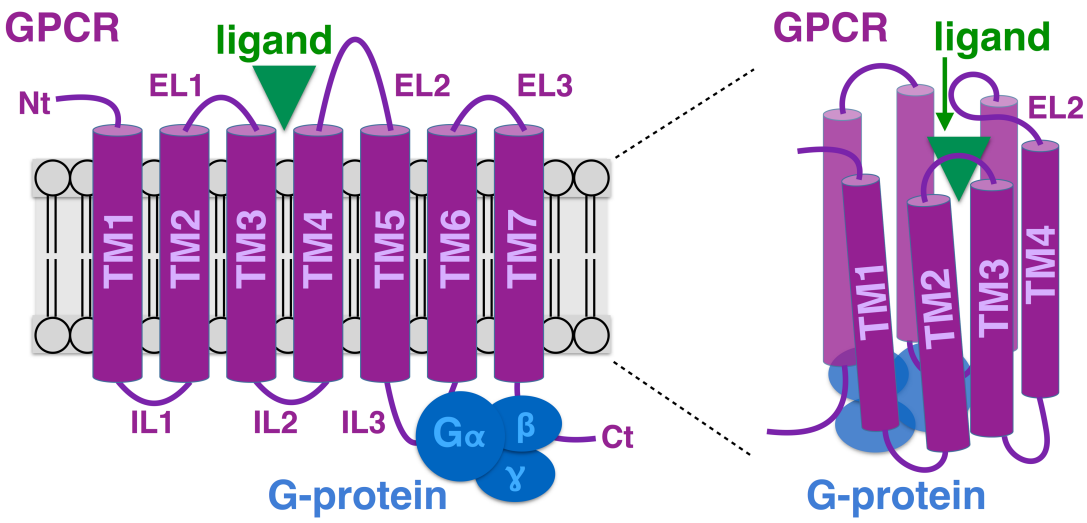
RAS'taki moleküler mekanizmaları ve buna dayalı RAS'ın fonksiyonel mekanizmasını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar artmaya devam etse de Ang peptitleriyle RAS reseptörlerinin tüm etkileşimlerinin bilinmemesi, MAS reseptörünün 3D yapısının henüz belirlenmemiş olması ve aktif durumdaki yapısı belirlenmiş olan RAS reseptörlerinin inaktif ve ara-durum yapılarının henüz bilinmiyor olması RAS mekanizmasını aydınlatmak için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

2.2. G-protein Bağlı Reseptörler

G-proteiniyle bağlantılı reseptörler (GPCR), hücre membranında bulunan ve hücre içerisindeki sinyal transdüksiyonunu başlatan bir reseptör ailesidir (Hilger ve ark., 2018; Congreve ve ark., 2020). GPCR'ler, çok çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar ve hücreler arası iletişimi düzenlerler. Sinir iletimi, hormon salınımı, görme, tat alma ve koku alma gibi birçok temel fizyolojik fonksiyon GPCR'ler aracılığıyla gerçekleştirilir (Granier ve ark., 2012; Stevens ve ark., 2013).

GPCR'ler, yapısında yedi TM alan (TM1-TM7) içeren bir polipeptit zinciri olan heptahelikal bir yapıya sahiptir. Bu yedi TM alan, hücre zarının dışından içine doğru geçer ve N-terminus (amin terminali) hücre dışında, C-terminus (karboksil terminali) ise hücre içinde bulunur. Ayrıca TM helikslerini hücre dışında ve içinde birbirine bağlayan 3 tane ekstraselüler ve 3 tane intraselüler TM bağlayıcı bileşen bulunmaktadır (Şekil 2.4). Bu yapı, GPCR'lerin sinyalleri algılamak ve G-proteinlerine bağlanmak için evrimleşmiş bir adaptasyondur (Hilger ve ark., 2018).

GPCR'ler, genellikle farklı ligandların bağlanmasıyla bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatmak için G-proteinlerine bağlanırlar. G-proteinleri, hücre içindeki ikincil haberci moleküllerinin üretimini başlatarak hücresel yanıtları düzenler. GPCR'ler, ligand bağlandığında yapısal değişikliklere uğrayarak G-proteinlerini aktive eder ve ardından hücresel yanıtların tetiklenmesini sağlar (Chan ve ark., 2019).



Şekil 2.4. G-protein bağlı reseptörlerin yapısı (Schneider ve ark., 2018).

2.2.1. GPCR'lerin Sınıflandırılması

GPCR'ler, genellikle ligand özelliklerine ve sinyal transdüksiyon mekanizmalarına göre sınıflandırılır (Davies ve ark., 2008; Hu ve ark., 2017). Bu sınıflandırmalar arasında endojen ligandlar (örn: hormonlar, nörotransmitterler), farmakolojik ligandlar (örn: ilaçlar), heterotrimerik G protein altbirimleri (Gi, Gs, Gq/11, G12/13), GRK'ler (GPCR

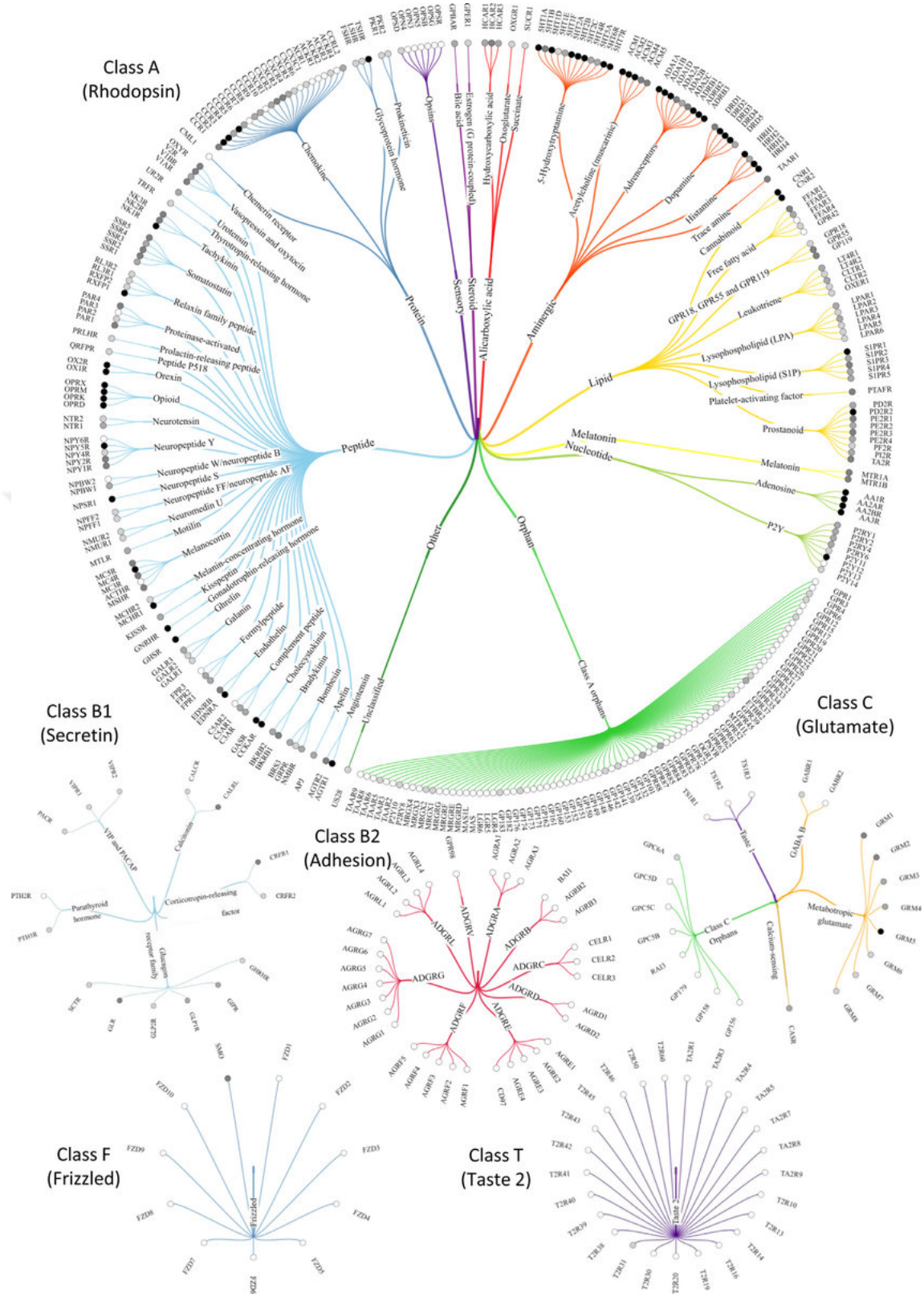
kinazları) ve arrestinler (β-arrestin) gibi faktörler rol oynar (Edward Zhou ve ark., 2019; Seyedabadi ve ark., 2022).

GPCR'lerin sınıflandırılması, farklı aileleri ve alt aileleri içermektedir (Şekil 2.4). En büyük GPCR ailesi olan A sınıfı GPCR'ler (Rhodopsin ailesi) tüm ailedeki reseptörlerin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. Bu ailedeki GPCR'ler çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlemekle görevlidir. Bu ailede, Beta-adrenerjik reseptörler, Dopamin reseptörleri, Serotonin reseptörleri, Ang reseptörleri ve Opioid reseptörleri gibi reseptörler bulunur. Diğer önemli GPCR aileleri arasında Sekretin, Metabotropik glutamat, Kalsitonin ve Kemokin reseptör aileleri bulunur (Hu ve ark., 2017).

Bu sınıflandırma sistemi, GPCR'lerin farklı ligandları algılamasını ve çeşitli hücresel yanıtları tetiklemesini açıklar. GPCR'lerin yapısı ve sınıflandırılması, ilaç geliştirme ve tedavi stratejilerinin belirlenmesi gibi alanlarda önemli bir role sahiptir.

GPCR ailesinin en büyük ve en iyi bilinen alt ailesi A sınıfı GPCR'lerdir. Bu alt ailedeki reseptörler, 2000'den fazla farklı GPCR genini içerir ve insan genomunun yaklaşık %1'ini oluştururlar (Zhou Q. ve ark., 2019). A sınıfı GPCR'lerden Beta-adrenerjik reseptörler, epinefrin ve norepinefrin gibi katekolaminlerin bağlanmasıyla kalp atış hızını ve kasılmasını artırarak sempatik sinir sisteminin uyarılmasına katkıda bulunurken (Ciccarelli ve ark., 2013), Opioid reseptörleri, endorfinler ve diğer opioid bileşiklerinin bağlanmasıyla analjezik etki sağlayarak çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlerler (Feng ve ark., 2012). Ayrıca bu reseptörler, hücresel sinyal iletiminde önemli bir rol oynar ve farmakolojik olarak hedeflenerek tedavi stratejilerinde kullanılırlar (Devi, 2001).

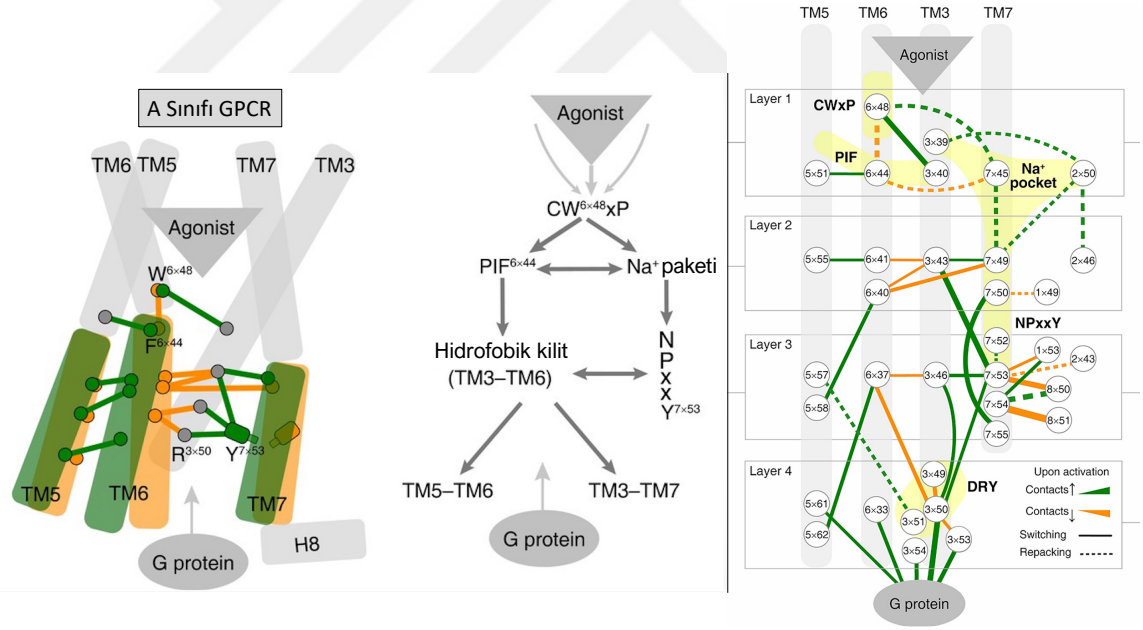
RAS'ın koruyucu koldaki elemanlarından AT2R ve MAS reseptörleri de A sınıfı GPCR ailesinin birer üyesidir. AT2R, A sınıfı GPCR ailesinin Peptid reseptörleri alt ailesine aitken MAS reseptörü Orphan reseptörleri alt ailesine aittir ve yapısal olarak farklılık göstermektedirler.



Şekil 2.5. G-protein bağlı reseptör türleri ve sınıflandırması (Pándy-Szekeres ve ark., 2018).

2.2.2. GPCR Aktivasyon Mekanizması

GPCR'lerin genel kabul gören aktivasyon mekanizması; hücre dışında bulunan spesifik bir hormon, nörotransmitter veya ilacın bir ligand olarak GPCR'ye bağlanmasıyla GPCR'nin konformasyonunda yapısal bir değişikliğe sebep olmasıyla başlar. Bu konformasyonel değişiklik, GPCR'lerin hücre içerisindeki G-proteinleri ile etkileşime girebilmesini sağlar (Hauser ve ark., 2021). Aktive olan GPCR, G-proteininin alfa (α) altbirimine bağlanmasını sağlar ve onu aktive eder. Bu, GDP (guanozin difosfat) yerine GTP (guanozin trifosfat) bağlanmasını sağlar. GTP bağlandıktan sonra G-proteininin alfa (α) alt birimi, beta (β) ve gama (γ) alt biriminden ayrılır. Aktive olan GPCR'den G-proteininin ayrılması siklik adenozin monofosfat (cAMP), inositol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) gibi ikincil haberci moleküllerinin üretimini başlatır. İkincil haberci molekülleri, hücre içindeki protein kinazlar tarafından tanınır ve hücre içi gen ekspresyonunun değişmesi, protein aktivasyonu, iyon kanallarının açılması veya kapanması gibi çeşitli hücresel yanıtları tetikler (Capote ve ark., 2015).



Şekil 2.6. A sınıfı G-protein bağlı reseptörlerin genel aktivasyon mekanizması (Zhou Q. ve ark., 2019).

Son yıllarda GPCR'lerin genel aktivasyon mekanizmasını tam olarak anlamaya yönelik yapılan araştırmalarda özellikle A sınıfı GPCR'lerin aktivasyon mekanizması üzerinde durulmuştur (Zhou Q. ve ark., 2019). A sınıfı GPCR'ler için hücre dışında ligand bağlanmasıyla başlayan GPCR sinyal iletimi ve bu sinyal iletimine katkı sunan makro ve mikro-anahtarların (switches) GPCR aktivasyonunda önemli olduğu belirtilmiştir (Zhou Q. ve ark., 2019; Hauser ve ark., 2021).

Makro-anahtarlar, GPCR'nin 7 TM segmentinin yanı sıra ekstraselüler ve intraselüler bölgelerinde bulunan büyük yapısal motiflerdir. Ligand bağlanmasıyla birlikte GPCR'nin makro-anahtarlarında meydana gelen yapısal değişiklikler ve konformasyonel geçişler ile GPCR'nin inaktif durumdan aktif duruma geçerek reseptör aktivasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir (Zhou Q. ve ark., 2019). Özellikle intraselüler bölgede TM3 ve TM6 arasındaki mesafenin değişimi, GPCR'lerin aktivasyon mekanizmasında önemli bir rol oynayan hidrofobik kilit (hydrophobic lock) olarak adlandırılan bir makro anahtarı ifade etmektedir (Zhou Q. ve ark., 2019; Hauser ve ark., 2021). İnaktif durumda, TM3 ve TM6 arasındaki hidrofobik amino asitlerin etkileşimleri, GPCR'nin aktif duruma geçmesini engelleyen bir bariyer oluşturur. Ligand bağlanması, GPCR'nin makro-anahtarlarındaki hidrofobik kilidi açmak için gerekli olan konformasyonel değişiklikleri tetikler. GPCR'nin konformasyonel değişimi, hidrofobik kilitteki etkileşimleri zayıflatır. TM6'nın bükülmesi, TM6'nın intraselüler ucunda bulunan hidrofobik amino asitlerin TM3 ile ilişkisini bozar. Bu, TM3 ve TM6 arasındaki mesafenin artmasına ve hidrofobik kilitlerin açılmasına yol açar. Hidrofobik kilidin açılması, GPCR'nin aktif duruma geçmesine izin verir (Şekil 2.6). Aktive olan GPCR ise, G-proteinleriyle etkileşime girerek hücresel sinyal yolaklarını etkinleştirir ve hücresel yanıtların oluşmasını sağlar.

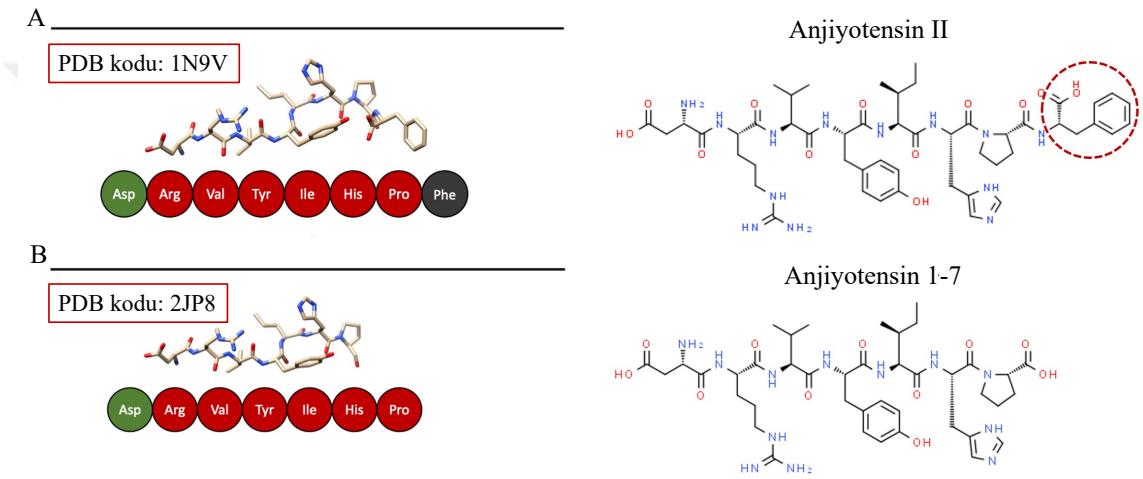
Makro-anahtarların yanısıra A sınıfı GPCR'lerin aktivasyon mekanizmasında belirli konformasyonel değişiklikleri ve sinyal iletimini düzenleyen korunmuş yapısal motifler bulunmaktadır. Bu yapısal motifler; CWxP (Cys-Trp-Xaa-Pro), PIF (Pro-Ile-Phe), E/DRY (Glu/Asp-Arg-Tyr) ve NPxxY (Asn-Pro-Xaa-Xaa-Tyr) motifleri ile Na^+ paket bölgesidir ve mikro-anahtar motifler olarak bilinmektedir (Şekil 2.6). Bu motifler GPCR'nin inaktif ve aktif durumları arasında geçiş yapmasını sağlayan sinyal iletiminde kritik yapısal bileşenlerdir (Katritch ve ark., 2013; White ve ark., 2018; Filipek, 2019).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Reseptör ve Ligand Yapılarının Hazırlanması

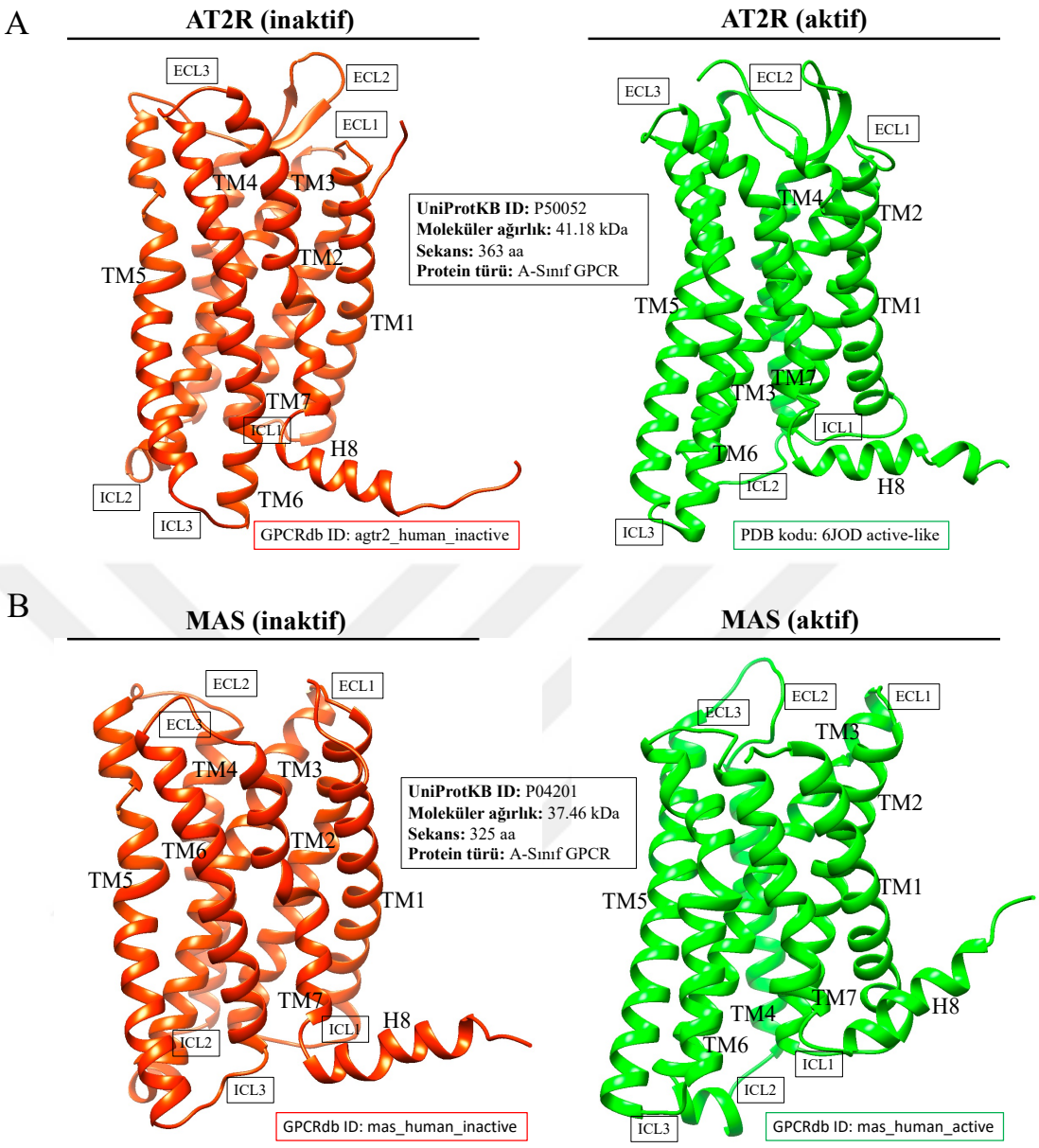
Bu tez çalışmasında RAS'ın koruyucu kolda etkili bileşenleri olarak bilinen Ang II ve Ang 1-7 peptitleri ile AT2R ve MAS reseptörleri kullanılmıştır.

NMR spektroskopi yöntemi kullanılarak elde edilen Ang II (PDB kodu: 1N9V) (Spyroulias ve ark., 2003) ve Ang 1-7 (PDB kodu: 2JP8) (Lula ve ark., 2007) ligandlarına ait yapılar Protein veri bankası (PDB databank)'ndan alınarak çalışmamızda kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Anjiyotensin ligandlarının 3D yapıları ve kimyasal formülleri. A) Ang II'nin B) Ang 1-7'nin amino asit sekansları, 3D yapıları ve kimyasal formüllerini temsil etmektedir.

AT2R'nin X-ışını kristalografi yöntemiyle belirlenen ve Ang II peptidiyle bağlı olan aktif benzeri yapısı PDB'den (Berman ve ark., 2000) alınarak (PDB kodu: 6JOD) (Asada ve ark., 2020) kullanılmıştır. Deneysel yöntemlerle elde edilmiş inaktif durumda herhangi bir 3D yapı bulunmaması nedeniyle inaktif benzeri AT2R yapısı GPCR veri bankasından (GPCRdb) (Isberg ve ark., 2016; Kooistra ve ark., 2021) alınarak kullanılmıştır. MAS reseptörünün 3D deneysel yapısı henüz mevcut değildir. Bu nedenle, MAS'ın ihtiyaç duyulan aktif ve inaktif benzeri model yapıları da GPCRdb'den elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. RAS'ın koruyucu koldaki reseptör bileşenleri. A) AT2R'nin inaktif ve aktif durumda 3D yapıları B) MAS reseptörünün inaktif ve aktif durumda 3D yapıları.

Elde edilen yapılarda belirlenen eksik rezidü kısımları MODELLER web sunucusu (Webb ve ark., 2016) kullanılarak istenen molekül yapıları kullanım için hazırlanmıştır. Tüm titre edilebilir yapıların protonasyon durumları, pH: 7.0 (nötr) ile eşleştirmek için H++ web sunucusu (Anandakrishnan ve ark., 2012) kullanılarak hazırlanmış ve eksik hidrojen atomları tamamlanmıştır. H++ web sunucusundan alınan yapılar, moleküler kenetleme işlemleri için kullanıldı.

3.2. Moleküler Kenetleme

Moleküler kenetleme yöntemi olarak kör yerleştirme (blind docking) yaklaşımı kullanılarak reseptörlerin aktif ve inaktif yapılarına en yüksek bağlanma afinitesine sahip ligand bağlanma pozları belirlenmiştir.

Moleküler kenetleme işlemleri için istatistiksel potansiyel tabanlı puanlama fonksiyonunu (ITScorePeP) (Yan ve ark., 2016) kullanan ve Vina'nın modifiye versiyonuna sahip MDockPeP: *ab-initio* protein-peptit kenetleme programı tercih edilmiştir (Xu X. ve ark., 2018).

AT2R'nin hem aktif hem de inaktif yapılarına Ang 1-7 ve Ang II ligandları ayrı ayrı kenetlenmiş ve simülasyonlar için ilk pozlar elde edilmiştir. AT2R'nin aktif yapısı PDB veri bankasından elde edildiği için ve bu kristal yapı Ang II bağlı reseptör yapısını içerdiğinden bu yapıda, Ang II yapıdan arındırılmış ve kenetleme işleminin ardından Ang II bağlı aktif-benzeri AT2R kristal yapısıyla kıyaslanmıştır. Aynı şekilde, MAS reseptörünün de hem aktif hem de inaktif yapılarına Ang 1-7 ligandı kenetlenmiş ve simülasyonlar için ilk pozlar elde edilmiştir.

Protein-peptit kenetleme sürecinden sonra en düşük ITScorePeP puanlamasına sahip pozlar MD simülasyonlar için seçilmiştir. Ligand ve reseptör arasındaki 2-boyutlu (2D) etkileşimleri belirlemek için Maestro (Schrödinger) programı (Maestro, 2020) kullanılmıştır.

3.3. Moleküler Dinamik Simülasyonlar

MD simülasyonlar için AT2R-Ang II (aktif ve inaktif), AT2R-Ang (1-7) (aktif ve inaktif), MAS-Ang (1-7) (aktif ve inaktif) protein-ligand kompleks yapıları ile ligand bağlı olmayan aktif ve inaktif durumdaki AT2R (Apo-AT2R) ve MAS (Apo-MAS) olmak üzere toplam 10 adet yapı kullanılmıştır.

Kullanılan tüm protein yapıları lipit çift tabakadan oluşan membrana yerleştirilmiştir. Yapıların membrana göre oryantasyonu, Orientations of Proteins and Membranes (OPM) veri tabanının Positioning of Proteins in Membrane (PPM) sunucusu kullanılarak belirlenmiştir (Lomize ve ark., 2012). Tüm yapılar CHARMM-GUI programının

Membrane Builder paketi (Jo ve ark., 2007; Jo ve ark., 2008; Wu E. L. ve ark., 2014) kullanılarak 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (POPE) ve kolesterol (CHL)'den oluşan lipit çift tabakası kokteyline POPC: POPE: CHL=2:2:1 oranda olacak şekilde yerleştirilmiştir.

MD simülasyonlar için membrana yerleştirilen yapılarla birlikte oluşturulan ligand-protein-membran kompleks sistemlerinin tümü 90x90x100 nanometre (nm) boyutlarında simülasyon kutularına yerleştirilmiş, TIP3P türü su molekülleri eklenmiş (Jorgensen ve ark., 1983) ve 0.15 mM (milimolar) NaCl ile nötralize edilmiştir. Reseptör ve ligandın yanı sıra her sistem yaklaşık 253 lipit, ~63,000 su molekülü, 50-60 sodyum (Na^+) ve 60-70 klor (Cl^-) iyonu ile toplamda ortalama 100,000 atom içermektedir.

Tablo 3.1'de özetlenen kompleks yapılar için Charmm36m kuvvet alanı (Huang ve ark., 2017) kullanılmış ve tüm sistemler GROMACS 2020.1 versiyon yazılım paketi (Abraham ve ark., 2015) ile NVIDIA RTX A4000 GPU ekran kartlarına sahip bilgisayar sistemleri kullanılarak MD simülasyonlarına tabi tutulmuştur.

Tablo 3.1. MD simülasyonlar için hazırlanan kompleks yapıların listesi.

UniProtKB	Protein	Protein ID	Apo	Ang 1-7	Ang II	Kuvvet Alanı	Nötralizasyon	Su Tipi	T (K)	t (ns)
P50052	AT2R (aktif)	PDB kodu: 6JOD	+	+	+	CHARMM36m	NaCl (0.15 mM)	TIP3P	310	1000
	AT2R (inaktif)	GPCRdb kodu: agtr2_human inactive	+	+	+	CHARMM36m	NaCl (0.15 mM)	TIP3P	310	1000
P04201	MAS (aktif)	GPCRdb kodu: mas_human active	+	+	_	CHARMM36m	NaCl (0.15 mM)	TIP3P	310	1000
	MAS (inaktif)	GPCRdbkodu: mas_human inactive	+	+	_	CHARMM36m	NaCl (0.15 mM)	TIP3P	310	1000

MD simülasyonlarından önce, her bir sistem kurulumu 5000 adım eşlenik gradyan minimizasyonu gerçekleştirilerek olası sterik çökmeleri ortadan kaldırmak için gevşetildi. Reseptör ve ligand rezidülerinin yanı sıra lipid moleküllerine 10 kcal/mol/$Å^2$ harmonik kısıtlama kuvveti sabitleri uygulandı. Dengeleme aşamasında, her sistem için harmonik kısıtlama kuvveti sabiti 5 kcal/mol/$Å^2$'ye ayarlandı. Bütün sistemlerde sıcaklık kademeli olarak 0 K'den 310 K'ye yükseltildi ve NVT kısmında 1.0 ps'lik sıcaklık bağlantı sabitine sahip bir Nose-Hoover termostatı (Evans ve ark., 1985) uygulanarak 10 ns üzerinde dengelendi, ardından bir sabit basınç grubu (NPT) kullanılarak yarı izotropik Berendsen barostat (Berendsen ve ark., 1984) ile 1 ns yoğunluk dengelemesi yapıldı ve basınç MD

simülasyon yürütmeleri boyunca bir yarı izotropik Parrinello-Rahman barostat (Parrinello ve ark., 1981) kullanılarak sabit tutuldu. Her sistem için 1000 ns süreli simülasyon yürütmesi, periyodik sınır koşulları ve 2 fs zaman adımı kullanılarak gerçekleştirildi. MD simülasyonlar sırasında, tekrar eden görüntülerin makroskobik bir kafesindeki bir birim hücrenin tam elektrostatik enerjisini hesaplamak için, Particle Mesh Ewald (PME) yöntemi (Darden ve ark., 1993) uygulandı. Tüm bağlar, SHAKE algoritması (Ryckaert ve ark., 1977) kullanılarak sınırlandırıldı.

3.4. Yörünge Analizleri

AT2R'nin Ang II ve Ang 1-7 peptitleriyle, MAS reseptörünün ise Ang 1-7 peptidiyle ligand-protein etkileşimlerini incelemek, ligand bağlanma durumlarında reseptörlerin dinamiklerini belirlemek ve inaktif-aktif yapısal değişimler ile reseptörlerin aktivasyon mekanizmalarını anlamak için birbirini doğrulayıcı şekilde birçok analiz yapılmıştır.

3.4.1. RMSD ve RMSF Analizleri

Reseptör rezidülerinin karbon-alfa (Cα) veya omurga atomlarının Kök Ortalama Kare Sapması (RMSD) ve Kök Ortalama Kare Dalgalanması (RMSF)'nı hesaplamak için GROMACS yazılım paketinin bir parçası olan gmx-moleküler dinamik simülasyon paketi kullanılmıştır.

RMSD analizinde genellikle simülasyonun başlangıç yapısı bir referans yapı olarak alınır ve atomların koordinatlarının simülasyonun sonraki adımlarındaki aynı atomların koordinatlarıyla karşılaştırılmasıyla hesaplanır (Martínez, 2015). Bu hesaplama için (1) denklemi kullanılır.

$$\boldsymbol{RMSD} = \sqrt{\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{N}} \sum_{\boldsymbol{i}}^{\boldsymbol{N}} \boldsymbol{m_i} \parallel \boldsymbol{r_i(t)} - \boldsymbol{r_i^{ref}} \parallel^{\mathbf{2}}} \qquad (1)$$

Burada m*i* ve r*i*, yapıyı referans yapıya uydurduktan sonra t zamanında *i* atomunun konumunu, N ise simülasyon boyunca yapıların toplam sayısını ifade etmektedir.

RMSF analizinde bir proteinin hangi bölgelerinin daha esnek ve hangilerinin daha katı olduğu ile proteinin stabilitesi hesaplanır. Bu hesaplama için (2) denklemi kullanılır.

$$\boldsymbol{RMSF} = \sqrt{\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{T}}\sum_{\boldsymbol{t_j=1}}^{\boldsymbol{T}} \| \boldsymbol{r_i(t)} - \boldsymbol{r_i^{ref}} \|^{\mathbf{2}}} \quad (2)$$

Burada T, ortalaması alınmak istenen zamandır ve r_i^{ref}, *i* atomunun referans konumunu ifade etmektedir. Yüksek RMSF değerleri, daha büyük dalgalanmaları veya istikrarsızlığı gösterirken, düşük değerler daha fazla kararlılığı göstermektedir (Martínez, 2015).

3.4.2. Mesafe Analizleri

Reseptörlerin TM3, TM5, TM6 ve TM7 helikslerinin hücre içi kısımlarının arasındaki mesafe değişimleri MD simülasyonlar süresince GROMACS yazılım paketinin bir parçası olan gmx-moleküler dinamik simülasyon paketi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu mesafe analizleri için gmx make_ndx komutları ile mesafe analizleri yapılacak TM helislerinin hücre içindeki son 8 amino asitlerine ait Cα atomları seçilerek index dosyaları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu index dosyaları gmx distance komutları kullanılarak iki heliks arasındaki mesafe, ortak kütle merkezleri (center of mass: COM) arasındaki mesafenin zamana bağlı değişimleri olarak hesaplanmış ve değişim grafikleri çizdirilmiştir (Chelvanayagam ve ark., 1998).

MD simülasyonlarda AT2R'nin aktif ve inaktif-benzeri yapılarına Ang II bağlanma durumunda PHE8-MET128 ve Ang 1-7 bağlanma durumlarında ise PRO7-MET128 arasındaki mesafelerin simülasyon boyunca değişimlerini belirlemek için gmx make_ndx komutları ile bu rezidülere ait Cα atomları seçilerek index dosyaları ile gmx distance komutları kullanılarak mesafe analizleri yapılmıştır. MAS reseptörünün aktif ve inaktif-benzeri yapılarına Ang 1-7 bağlanma durumlarında ise bu bağlanmada anahtar rol oynayan reseptöre ait bir rezidü daha önce belirlenmediğinden dolayı mesafe analizleri yapılmamıştır. Yapılan diğer mesafe analizleri ise ligandların simülasyonun başlangıcından itibaren bulunduğu konumdan ne kadar uzaklaştığını belirlemek için yapılan mesafe analizleridir.

3.5. Ligand-Protein Etkileşim Analizleri

Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının AT2R'ye, Ang 1-7'nin ise MAS reseptörüne, reseptörlerin aktif ve inaktif yapısal durumlarda bağlı kalıp kalmadığını belirlemek için ligand-reseptör arasındaki bağlanmadan sorumlu olan özellikle hidrojen bağları, tuz

köprüleri ve hidrofobik etkileşimlerin yürütülen MD simülasyonlar boyunca analizleri yapılmıştır.

Hidrojen bağları, -OH, HOH, -NH gibi tipik bir donör (verici) atomun kovalent olarak bağlı hidrojen atomunu bir elektronegatif akseptör (alıcı) atoma verdiğinde meydana gelen kovalent olmayan bağlardır. Donör-akseptör mesafesi 2.2-2.5 Å olduğu durumda güçlü hidrojen bağları oluşurken 2.5-3.2 Å olduğu durumda orta, 3.2-4.0 Å olduğu durumda ise daha zayıf hidrojen bağları oluşur ve bu bağlanma elektrostatik bir etkileşimdir.

Ligand-protein arasındaki hidrojen bağlarının analizleri için VMD 1.9.3 programının (Humphrey ve ark., 1996) hidrojen bağ analiz paketi kullanılmıştır. Bu analizler için ligand ve reseptöre ait donör ve akseptör atomları arasındaki mesafe için üst sınır 3.0 Å ve donör-akseptör açısı için 20^{o} bir açısal sınır tanımlanmıştır. Bu sınırların üstündeki açı ve mesafelerde hidrojen bağlarının varlığı söz konusu olmadığı için analizlere dahil edilmemiştir. MD simülasyonlar boyunca kaydedilen 2000 kareden oluşan yörünge dosyaları kullanılarak inaktif ve aktif durumda bağlı Ang II ve Ang 1-7 ligandları ile reseptörler arasındaki tüm hidrojen bağlarının analizleri yapılmış daha sonra bu hidrojen atomlarının 2000 kareden oluşan simülasyonunun yüzdelik grafikleri çizdirilmiştir.

Tuz köprülerinin analizleri için VMD 1.9.3 programının tuz köprüsü analiz paketi kullanılmıştır. Bu analizler için ligand ve reseptöre ait oksijen-nitrojen arasındaki mesafe için üst sınır 3.2 Å olarak tanımlanmıştır. Bu sınırın üstündeki mesafelerde amino asitler arasında tuz köprülerinin varlığı söz konusu olmadığı için analizlere dahil edilmemiştir. MD simülasyonlar boyunca kaydedilen 10000 kareden oluşan yörünge dosyaları kullanılarak inaktif ve aktif durumda bağlı Ang II ve Ang 1-7 ligandları ile reseptörler arasındaki tüm tuz köprülerinin analizleri yapılmış ve bu tuz köprüleri arasındaki mesafelere ait simülasyonlar boyunca değişim grafikleri çizilmiştir.

Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının AT2R ile, Ang 1-7'nin ise MAS reseptörü ile hem aktif hem de inaktif durumlarda MD simülasyonlar boyunca yaptığı ligand-protein elektrostatik etkileşimlerine aracılık eden hidrofobik kuvvetleri analiz etmek için MD simülasyonlarından yörüngeleri analiz etmede nesne yönelimli bir Python kitaplığı olan, parçacık tabanlı yörüngeleri (PDB formatındaki biyomoleküller gibi bireysel koordinat

çerçeveleri dahil) okumasına ve NumPy dizileri aracılığıyla atomik koordinatlara erişmesine olanak tanıyan MDAnalysis programı kullanılmıştır (Michaud-Agrawal ve ark., 2011; Gowers ve ark., 2016). Hidrofobik etkileşim analizleri için tüm ligand-reseptör kompleks yapılarının MD simülasyonlardan elde edilen topoloji ve trajectory dosyaları kullanılmış ve ligand-protein amino asitleri aralarındaki mesafe 4.0 Å olarak sınırlandırılmıştır. Python'da statik, animasyonlu ve etkileşimli görselleştirmeler oluşturmak için kullanılan Matplotlib (Hunter, 2007) ile hidrofobik etkileşimlere ait 2000 kareden oluşan simülasyonunun yüzdelik grafikleri çizdirilmiştir.

3.6. Dihedral Açıların Analizleri

AT2R ve MAS reseptörlerinin Ang II ve Ang 1-7 ligand bağlanmasına dayalı inaktif-aktif yapısal değişimleri için yürütülen MD simülasyonlar ile ligand bağlanma durumlarında ligandsız duruma göre GPCR aktivasyon mekanizması ve sinyalizasyonunda etkili mikro-anahtar motiflerin açısal değişimlerini incelemek için dihedral açıların analizleri yapılmıştır. Apo durumda reseptörlerdeki CWxP, PIF, E/DRY ve NPxxY motiflerinde motifi oluşturan her amino asit için Phi, Psi ve Chi açılarının MD simülasyon süresi boyunca -180^{o} ve +180^{o} aralığındaki açısal değişimleri MD simülasyonlarından yörüngeleri analiz etmede nesne yönelimli bir Python kitaplığı olan MDAnalysis programı kullanılarak yapılmıştır (Michaud-Agrawal ve ark., 2011; Gowers ve ark., 2016). AT2R'ye Ang II ve Ang 1-7 bağlanma durumlarında da aynı işlemler tekrar edilmiş ve hem ligandlı hem de ligandsız durumlarda inaktif ve aktif yapılar için yapılan dihedral açıların analizlerinin Matplotlib (Hunter, 2007) ile değişim grafikleri çizdirilmiştir. MAS reseptörü orphan-benzeri A sınıfı bir GPCR olması ve AT2R'deki gibi tanımlanan mikro-anahtarlardan sadece NPxxY motifine sahip olduğu bilindiğinden dihedral açıların analizleri hem ligandlı hem de ligandsız durumlarda inaktif ve aktif MAS yapıları için benzer şekilde tekrarlanmıştır.

3.7. Yapısal Dinamik ve Sinyal İletim Analizleri

Yukarıda belirtilen klasik yörünge analiz araçlarının yanı sıra, MDM-TASK web sunucusu (Brown ve ark., 2017; Ross ve ark., 2018; Amamuddy ve ark., 2021) kullanılarak İletişim Eğilimi (CP), Dinamik Çapraz Korelasyon (DCC), Arasındalık Merkeziliği (BC) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) gibi teknikler MD simülasyonlardan

elde edilen yörüngeler için de kullanılmıştır. Bu analizler ligand bağlanmasına dayalı AT2R ve MAS reseptörlerinin yapısal dinamik değişimlerini incelemek için yapılmıştır.

3.7.1. İletişim Eğilimi Analizleri

İletişim Eğilimi (CP), dinamik etkileşimlerde yer alan ve bir proteinin farklı bölgeleri arasında sinyaller iletebilen kalıntıların yolları olan iletişim yolları kavramına dayanır. Kalıntı çiftlerinin CP'si, kalıntının bir iletişim yolunun parçası olma olasılıklarının toplamı olarak hesaplanır. CP, kalıntılar arası mesafedeki dalgalanmanın bir fonksiyonu olarak tanımlanır; burada Cα-Cα mesafelerinde düşük yoğunluklu dalgalanmalar sergileyen rezidülerin, yüksek yoğunluklu dalgalanmalara göre daha verimli iletişim kurduğu kabul edilir. Mesafe dalgalanmalarının genliğinin kalıntılar arası iletişimin hızını etkilediği ve daha küçük dalgalanmaların daha hızlı iletişime yol açtığı düşünülmektedir. CP değeri, Denklem 3'te verilen kalıntılar arası mesafenin ortalama kare dalgalanmasının hesaplanmasıyla elde edilmiştir (Chennubhotla ve ark., 2007; Morra ve ark., 2009; Penkler ve ark., 2019).

$$\boldsymbol{CP} = \langle \left(\boldsymbol{d_{ij}} - \boldsymbol{d_{ij,ave}} \right)^{\mathbf{2}} \rangle \tag{3}$$

Denklem 3'te d*ij*, sırasıyla *i* ve *j* kalıntılarının Cα atomları arasındaki zamana bağlı mesafedir ve parantezler, yörünge üzerindeki zaman ortalamasını gösterir. CP değerleri, 0 ila 1 arasında değişebilir ve daha yüksek değerler, rezidünün dinamik etkileşimler ve iletişim yollarında yer alma olasılığının daha yüksek olduğunu gösterir.

Ang II ve Ang 1-7'nin AT2R ve MAS reseptörlerinin hem aktif hem de inaktif-benzeri yapılarına bağlı oldukları ve olmadıkları durumlarda yürütülen MD simülasyonlardan elde edilen 3000 karelik yörünge dosyaları kullanılarak tüm kalıntı çiftleri için CP değerleri elde edilmiş ve rezidü x rezidü CP iletişim haritaları çizdirilmiştir.

3.7.2. Dinamik Çapraz Korelasyon Analizleri

Dinamik Çapraz Korelasyon (DCC), zaman içinde bir protein yapısındaki atom çiftleri arasındaki mesafelerin dalgalanmaları çapraz korelasyonun bir ölçüsüdür. Bir protein yapısının farklı bölgeleri arasındaki dinamik etkileşimleri değerlendirmek için moleküler dinamikte yaygın olarak kullanılır. DCC, bir proteinin farklı bölgelerindeki dalgalanmaların nasıl ilişkili olduğu hakkında bilgi sağlayabilir ve hangi bölgelerin sıkı

bir şekilde bağlı ve hangi bölgelerin daha bağımsız olduğunu belirlemeye yardımcı olabilir. Proteinin farklı bölgelerinin işlevsel ve yapısal rollerini daha iyi anlamak için (4) denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Kasahara ve ark., 2014; Bowerman ve ark., 2016).

$$\boldsymbol{C_{i,j}} = \frac{\langle(\boldsymbol{r_i}-\langle\boldsymbol{r_i}\rangle)\cdot(\boldsymbol{r_j}-\langle\boldsymbol{r_j}\rangle)\rangle}{\sqrt{(\langle\boldsymbol{r_i^2}\rangle-\langle\boldsymbol{r_i}\rangle^2)\left(\langle\boldsymbol{r_j^2}\rangle-\langle\boldsymbol{r_j}\rangle^2\right)}} \quad (4)$$

Köşeli parantez içine alınmış nicelikler yörünge boyunca zaman ortalamalı değerleri temsil eder. *ri* ve *rj* sırasıyla *i* ve *j* atomlarının konumsal vektörleridir. Denklem 4'teki formül ile hesaplanan çapraz korelasyon değerleri -1 (tamamen antikorelasyonlu) ila +1 (mükemmel korelasyonlu) aralığını kapsar. Ang II ve Ang 1-7'nin AT2R ve MAS reseptörlerinin hem aktif hem de inaktif-benzeri yapılarına bağlı oldukları ve olmadıkları durumlarda yürütülen MD simülasyonlardan elde edilen 3000 karelik yörünge dosyaları kullanılarak tüm kalıntı çiftleri için DCC değerleri elde edilmiş ve çapraz korelasyon haritaları çizdirilmiştir.

3.7.3. Dinamik Rezidü Etkileşim Ağı Analizleri

Dinamik Rezidü Etkileşim Ağı (DRIN), biyomolekülü simülasyon sırasında zaman içinde değişebilen bir düğümler (rezidüler) ve kenarlar (etkileşimler) ağı olarak temsil etmek için grafik teorisini kullanır. DRIN hem ligandsız sisteme hem de ligand bağlı AT2R ve MAS komplekslerine uygulandı. Her bir MD simülasyon yörüngesinde, DRIN'ler, Cβ atomlarının (veya glisin için Cα'nın) düğümler olarak işlenmesiyle ve aralarında 6.7 Å mesafe sınırına dayalı olarak kenarlar oluşturuldu. Sistemlerin DRIN'leri ortalama arasındalık merkeziliği (BC) ve ortalama en kısa yol uzunluğu (L_i) gibi iki ölçüm kullanılarak analiz edildi. BC metriği, en kısa yol navigasyonunda bir rezidünün kullanıldığı ortalama sıklığı ölçer. Ağdaki bir düğümün BC'si, o düğümün proteinin diğer bölümleri arasındaki iletişim için ne kadar önemli olduğunun bir ölçüsüdür. L_i metriği, mümkün olan en kısa yolu kullanarak *j*'den *i* kalıntısına ulaşmak için gereken bağlantı sayısını temsil eder. Ortalama L_i, belirli bir düğüme giden tüm en kısa yolların toplam yol sayısına bölünmesiyle elde edildi (Amamuddy ve ark., 2021). İki düğüm arasındaki L_i, düğümler tarafından temsil edilen atomlar veya rezidüler arasındaki mesafeler veya etkileşimler dikkate alınarak Dijkstra'nın algoritması gibi grafik teorisi algoritmaları kullanılarak hesaplanabilir. Burada hem ligandsız Apo-AT2R ve Apo-MAS sistemlerinin

hem de Ang II ve Ang 1-7 ligandları bağlı AT2R ve MAS komplekslerinin BC ve L_i 'si, MDM-TASK web sunucusu kullanılarak her yörüngenin 3000 karesinden hesaplandı (Sethi ve ark., 2009; Penkler ve ark., 2019).

$$\overline{\boldsymbol{BC_v}} = \frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{m}} \sum_{\boldsymbol{i=1}}^{\boldsymbol{m}} \sum_{\boldsymbol{s,t\epsilon V}} \frac{\boldsymbol{\sigma_i(s,tIv)}}{\boldsymbol{\sigma_i(s,t)}} \tag{5}$$

$$\boldsymbol{L_i} = \frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{N-1}} \sum_{\boldsymbol{j=1}}^{\boldsymbol{N}} \boldsymbol{L_{ij}} \tag{6}$$

Denklem 5 ortalama BC ve Denklem 6 ortalama L_i hesaplanması için kullanılan formülleri göstermektedir. Burada s-t düğüm çiftlerinin belirli bir v düğümünü jeodezik mesafeleri boyunca kat ettikleri yeri gösterir. σi(s,tIv), kalıntı v tarafından köprülenen yolların sayısını belirtirken, σi(s,t), her ikisi de *i* zamanında değerlendirilen grafik için toplam yol sayısıdır. Her kalıntı için, bu değerin daha sonra toplam m çerçeveden ortalaması alınmıştır.

3.7.4. Temel Bileşen Analizleri

Moleküler dinamik verilerinde Temel Bileşen Analizi (PCA), protein yapısındaki baskın hareketleri ve dalgalanma modlarını belirlemek için tipik olarak atomik konumların zaman serilerine uygulanır. PCA, bu baskın hareketleri ve dalgalanmaları tanımlayarak, bir proteinin farklı bölgelerinin işlevsel ve yapısal rollerinin yanı sıra ligand bağlama mekanizmaları hakkında fikir verebilir. PCA'nın bir kartezyen koordinatı, genel MD'ye bağlıdır ve yörüngedeki tüm konformasyonların serbestlik derecelerini açıklamak için kartezyen koordinatları kullanır. Kartezyen koordinat uzayında, kovaryans matrisinin (C) öğeleri (7) denklemi ile tanımlanır (David ve ark., 2014; Amamuddy ve ark., 2021).

$$\boldsymbol{C_{i,j}} = \langle (\boldsymbol{x_i} - \langle \boldsymbol{x_i} \rangle)(\boldsymbol{x_j} - \langle \boldsymbol{x_j} \rangle) \rangle \tag{7}$$

Kovaryans matrisinin özdeğerlerinin ayrıştırılmasıyla, protein dinamiğinin toplu modlarını temsil eden PC1, PC2 ve PC3 gibi özvektörler elde edilmiştir. Her özvektörün, proteinin hareketine ne ölçüde katkıda bulunduğunu gösteren ve karşılık gelen bir varyansı veya özdeğeri vardır. Daha büyük özvektörler, baskın protein hareketlerine karşılık gelir. PC1, PC2 ve PC3 özvektörlerin toplamı genelde protein hareketlerinin %50'den fazlasını açıklayabilir. Apo-AT2R ve Apo-MAS yapıları için hem aktif hem de inaktif durumlarında hesaplanan özvektörler kullanılarak PC1-PC2, PC1-PC3 ve PC2-PC3 vektörel değişim grafikleri çizdirilmiş, Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının aktif ve

inaktif yapıdaki AT2R ve MAS reseptörlerine bağlı durumlarda bu özvektörler MD simülasyonlardan elde edilen yörüngelerinden tekrar hesaplanmış ve Apo yapılarda olduğu gibi vektörel değişim grafikleri çizdirilmiştir. Ligand bağlanma durumları ligandsız durumlara göre hesaplanan vektörel değişimler ile kıyaslanmış ve özvektörlerin ligand bağlanmasıyla birlikte reseptör hareketine katkı sağlayıp sağlamadığını incelemek için PCA grafikleri yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

RAS'taki ligand ve reseptör bileşenlerinin koruyucu koldaki moleküler mekanizmalarını belirlemek için yürüttüğümüz çalışmada elde ettiğimiz bulgular 3 ana başlıkta ifade edilmiştir. Öncelikle AT2R ve MAS reseptörlerine ait ligand-protein etkileşimleri ardından bu ligand bağlanma etkileşimlerine dayalı reseptör yapılarında dinamik değişimleri belirlemek için yapılan analiz sonuçları paylaşılmıştır. Son olarak, bu yapısal dinamik değişimlerinin reseptörlerin aktivasyon mekanizmasıyla ilişkisini, A sınıfı GPCR genel aktivasyon mekanizması üzerinden açıklamak için elde ettiğimiz bulgular paylaşılmıştır.

4.1. Ligand-Protein Etkileşimleri

4.1.1. Moleküler Kenetleme ve Ligand Etkileşimleri

Moleküler kenetleme ve MD simülasyonlar için hazırlanan ligand ve reseptör yapıları MDockPeP: ab-initio protein-peptit docking programı ile AT2R (inaktif benzeri) – Ang 1-7, AT2R (aktif benzeri) – Ang 1-7, AT2R (inaktif benzeri) – Ang II, AT2R (aktif benzeri) – Ang II, MAS (inaktif benzeri) – Ang 1-7 ve MAS (aktif benzeri) – Ang 1-7 ligand-reseptör kenetlemeleri kör kenetleme yapılarak en iyi istatistiksel potansiyel tabanlı puanlama fonksiyonu (ITScorePeP)'na sahip olan modeller seçilmiştir. AT2R'nin Ang II bağlı durumdaki kristal yapısı bilindiğinden bu kristal yapıdan Ang II çıkarılmış ve kör kenetleme yapıldıktan sonraki seçilen model MD simülasyonlar için kullanılmıştır. Tablo 4.1'de kör kenetleme sonucunda elde edilen ligand-protein kenetlemelerine ait en iyi ITScorePeP skoruna sahip ilk on model sırasıyla AT2R ve MAS reseptörleri için listelenmiştir. MDockPeP moleküler kenetleme ile elde edilen modellerden en düşük ITScorePeP skoruna sahip olanlar ligandların en iyi bağlanabileceği pozu verdiği için dinamik simülasyonlar için bu modeller seçilmiştir.

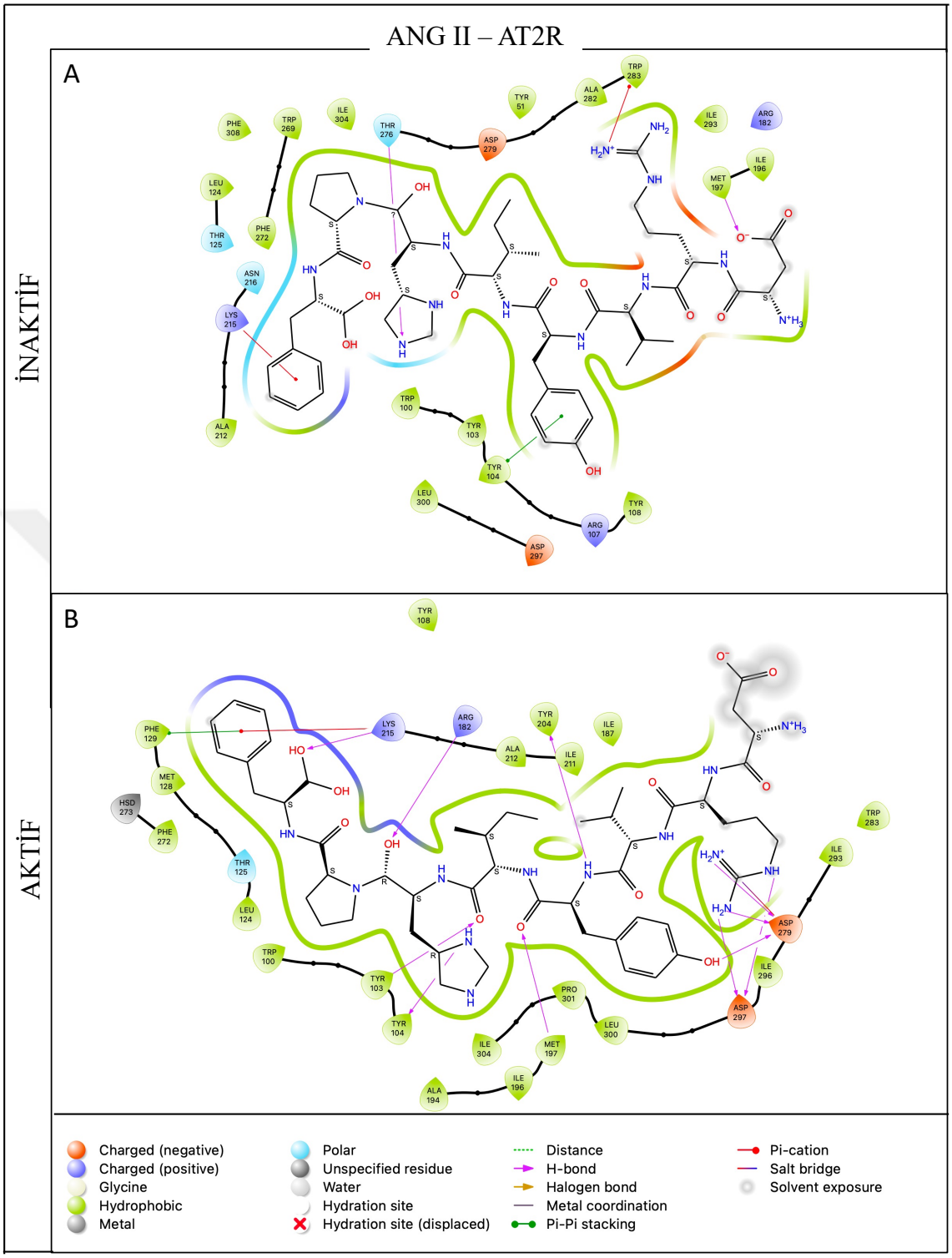
AT2R'ye Ang 1-7 ligandının moleküler kenetleme sonuçlarına göre seçilen modellerdeki hem inaktif hem de aktif benzeri yapılara kenetleme skorları birbirlerine oldukça yakındır. İnaktif benzeri yapı için Ang II'nin Ang 1-7'ye kıyasla daha iyi bir kenetleme skoruna sahip olduğu söylenebilir ve Ang II'nin aktif benzeri yapı için en iyi kenetleme skoruna sahip olduğu görülmektedir.

MAS reseptörüne Ang 1-7 ligandının moleküler kenetleme sonuçlarına göre ise seçilen modellerdeki hem inaktif hem de aktif benzeri yapılara kenetleme skorları birbirlerine oldukça yakın olmakla birlikte aktif benzeri yapıda inaktif benzeri yapıya oranla kenetleme skoru daha düşüktür.

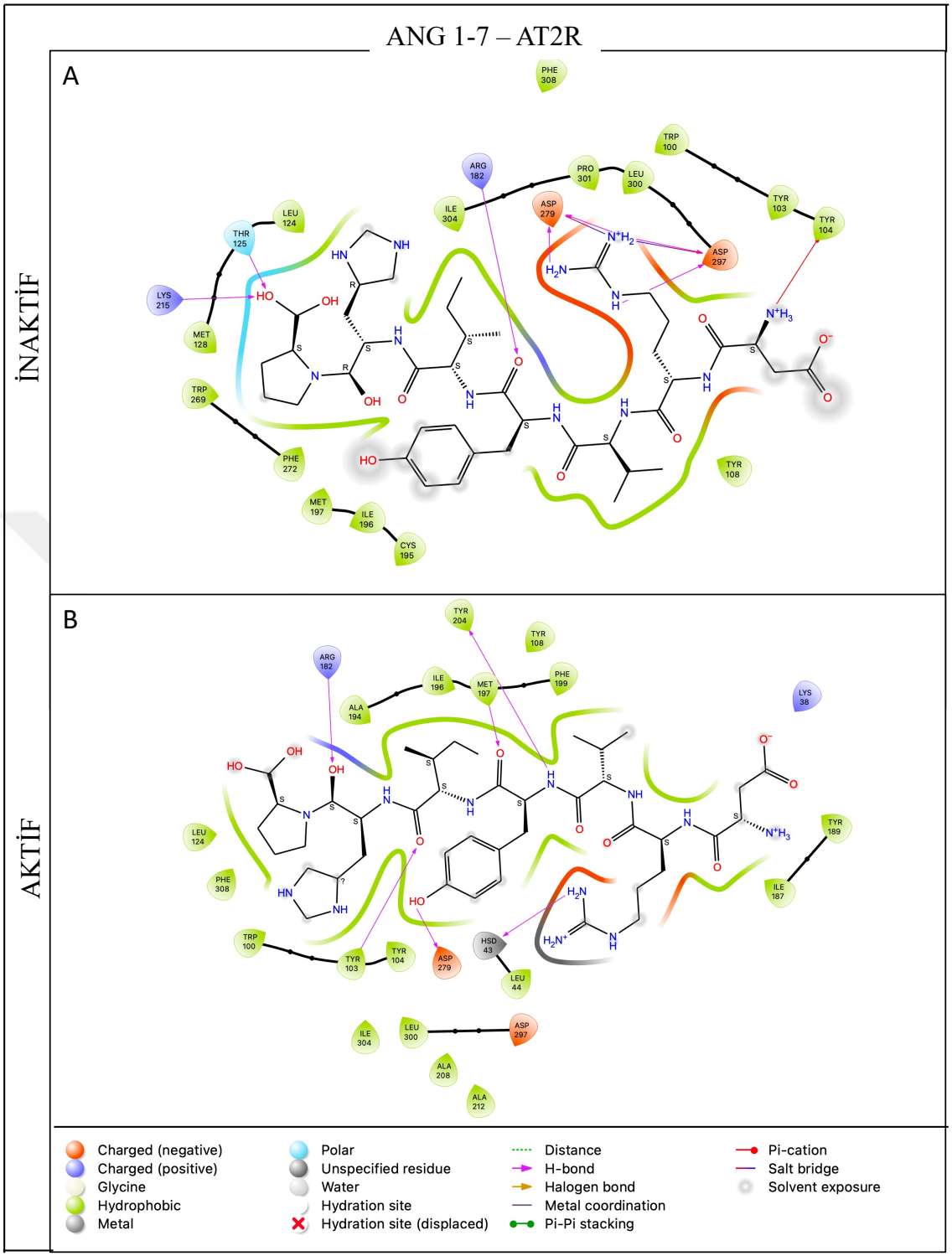
Tablo 4.1. AT2R ve MAS reseptörlerinin ligand kenetlemelerine ait bağlanma skorları. AT2R'nin inaktif ve aktif yapılarına Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının, MAS reseptörünün inaktif ve aktif yapılarına ise Ang 1-7 ligandının ayrı ayrı kör kenetlemesi ile elde edilen en iyi 10 model ve bağlanma skorlarının tablosu.

		AT2R				**MAS**	
ITScorePeP		**Ang II**		**Ang 1-7**		**Ang 1-7**	
		İnaktif	**Aktif**	**İnaktif**	**Aktif**	**İnaktif**	**Aktif**
	Model 1	-179.6	-208.1	-161.0	-163.4	-160.9	-164.5
	Model 2	-177.8	-188.6	-154.7	-154.9	-154.1	-156.1
	Model 3	-172.5	-181.0	-154.4	-149.9	-154.0	-151.8
	Model 4	-169.1	-177.6	-152.4	-148.0	-149.1	-150.5
	Model 5	-167.7	-173.5	-151.9	-143.4	-148.8	-147.1
	Model 6	-166.5	-170.0	-149.9	-139.7	-147.3	-143.6
	Model 7	-161.4	-169.0	-145.9	-139.6	-146.3	-142.6
	Model 8	-161.0	-168.9	-145.8	-138.8	-145.6	-140.2
	Model 9	-158.8	-167.3	-145.4	-138.4	-145.5	-139.3
	Model 10	-158.8	-166.1	-143.7	-137.4	-145.3	-139.2

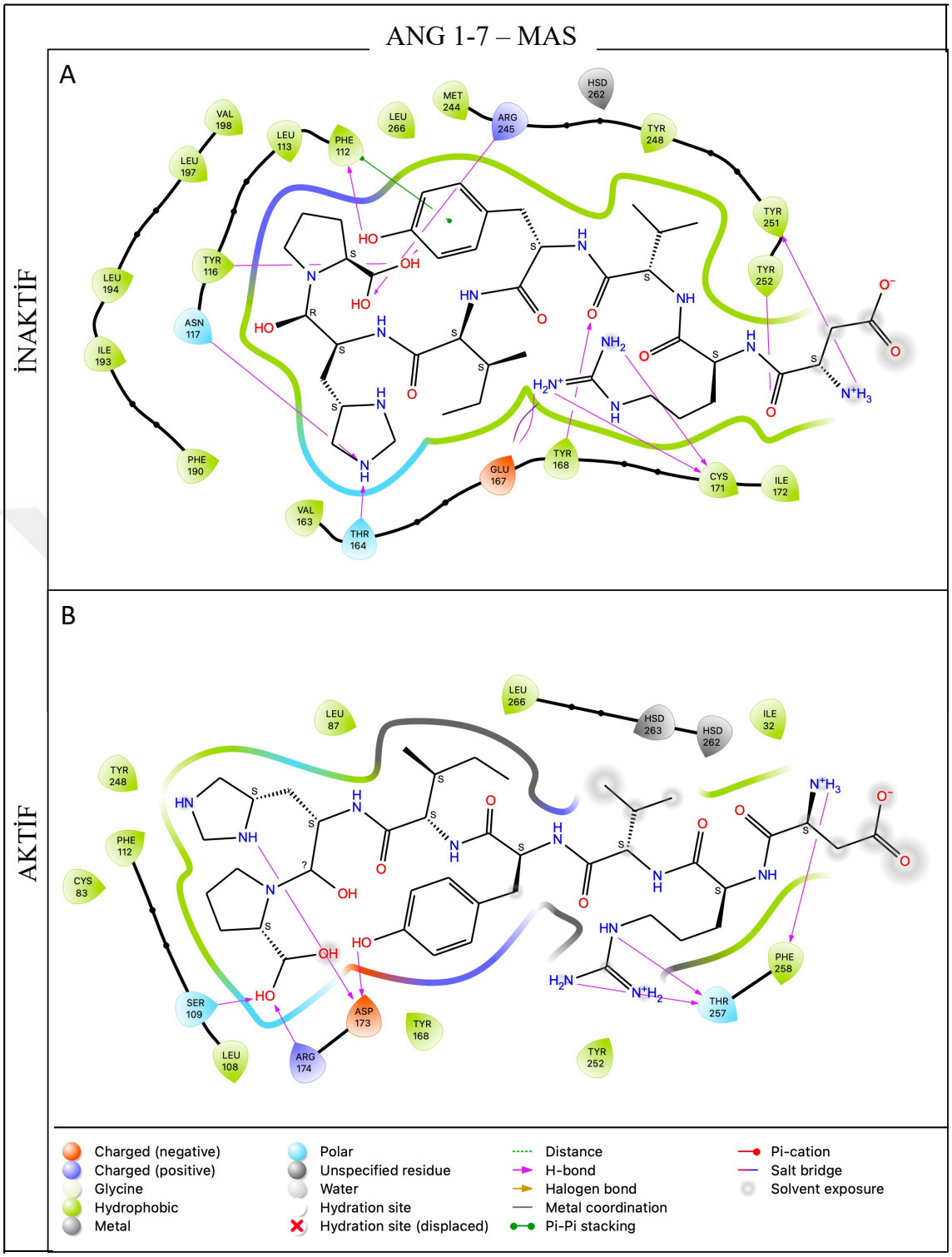
Moleküler kenetlemelerden elde edilen en düşük bağlanma skorlarına sahip ligand-reseptör bağlı pozları dinamik simülasyonlar için seçilmiştir. Bu ilk pozlar için bağlanma durumlarında ligand ve reseptör arasındaki etkileşimleri ifade eden bağların 2D ligand-protein bağlanma etkileşimlerine ait bulgular Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Bu 2D ligand-protein etkileşimleri moleküler kenetlemelerden seçilen model yapılara ait en düşük bağlanma skorlarını sağlayan etkileşimleri göstermektedir.



Şekil 4.1. AT2R'nin Ang II ile en iyi kenetleme skorlarına sahip 2D ligand etkileşimleri. A) AT2R'nin inaktif yapısı ve B) AT2R'nin aktif yapısı ile Ang II ligandının 2D ligand-protein bağlanma etkileşimleri.



Şekil 4.2. AT2R'nin Ang 1-7 ile en iyi kenetleme skorlarına sahip 2D ligand etkileşimleri. A) AT2R'nin inaktif yapısı ve B) AT2R'nin aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının 2D ligand-protein bağlanma etkileşimleri.



Şekil 4.3. MAS reseptörünün Ang 1-7 ile en iyi kenetleme skorlarına sahip 2D ligand etkileşimleri. A) MAS reseptörünün inaktif yapısı ve B) MAS reseptörünün aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının 2D ligand-protein bağlanma etkileşimleri.

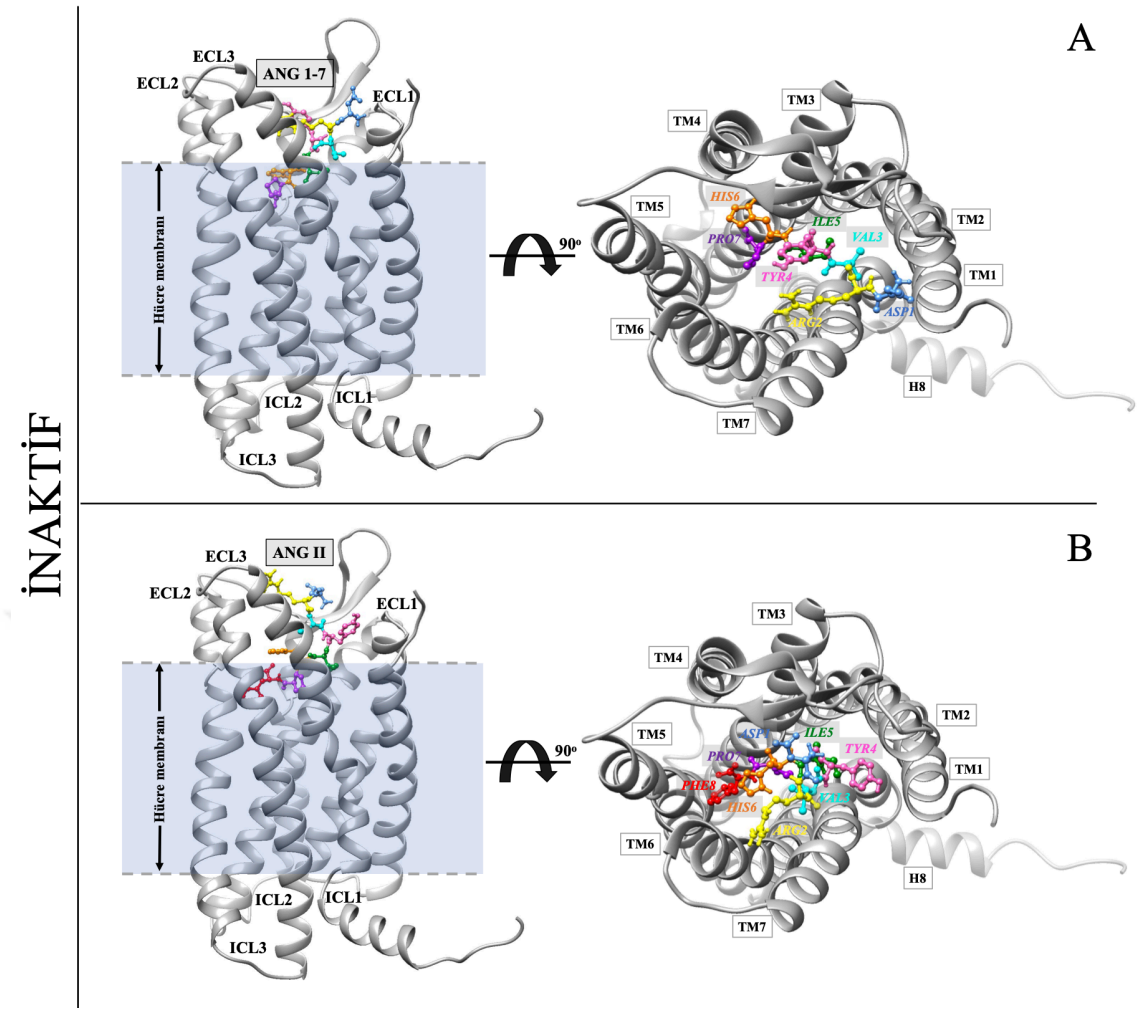
AT2R'ye inaktif ve aktif durumda Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının Şekil 4.1 ve 4.2'de görülen bağlanma pozlarında reseptöre ait TRP100, TYR103, TYR104, LEU124, MET128, ILE196, MET197 ve PHE272 rezidülerinin ligandlar ile hidrofobik etkileşimde oldukları belirlenmiştir. Bu etkileşimler tüm bağlanma durumları için ortak olup simülasyon boyunca değişimleri ayrıca incelenmiştir.

Hidrofobik etkileşimler dışında ayrıca reseptöre ait rezidülerden polar yüklü THR125, pozitif yüklü ARG182 ve LYS215, negatif yüklü ASP279 ve ASP297'nin ligandlar ile ortak hidrojen bağları yaptığı tespit edilmiştir.

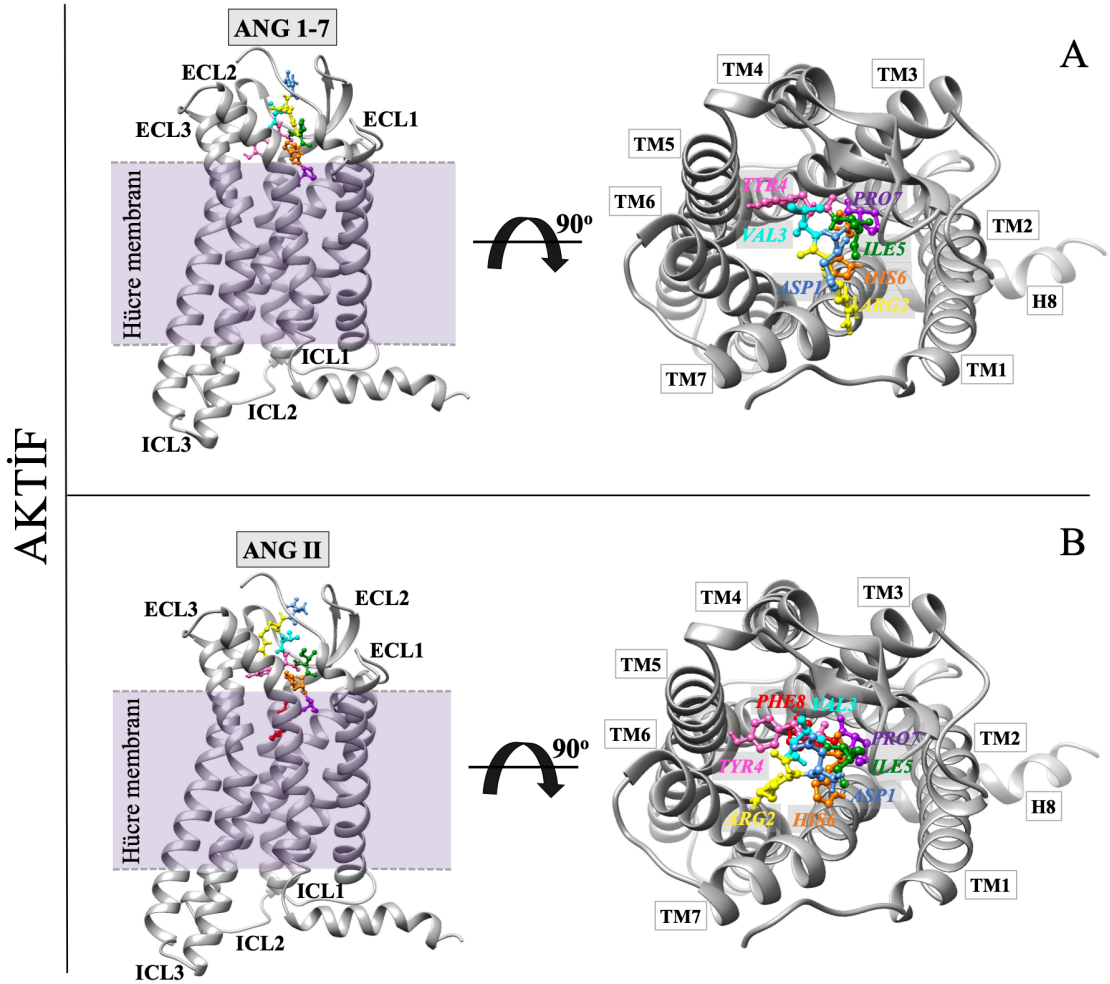
MAS reseptörüne inaktif ve aktif durumlardaki Ang 1-7 bağlanmasına ait Şekil 4.3'te görülen bağlanma pozlarında ise reseptöre ait PHE112 ve TYR248 rezidülerinin ligandlar ile hidrofobik etkileşimde oldukları belirlenmiştir. Bu hidrofobik etkileşimler dışında ayrıca reseptöre ait rezidülerden polar yüklü ASN117, THR164 inaktif yapıda, SER109 ve THR257 aktif yapıda, pozitif yüklü ARG245 inaktif yapıda ve ARG174 aktif yapıda, negatif yüklü GLU167 inaktif yapıda ve ASP173 aktif yapıda ligandlar ile hidrojen bağları yaptığı tespit edilmiştir.

Moleküler kenetlemelerden elde edilen en düşük bağlanma skorlarına sahip ligand-reseptör bağlı pozları için aktif ve inaktif yapıdaki AT2R'ye Ang 1-7 ve Ang II bağlanma durumlarında 3D ligand-protein bağlanma etkileşimlerine ait bulgular Şekil 4.4 ve 4.5'te verilmiştir. Bu 3D ligand-protein etkileşimleri moleküler kenetlemelerden seçilen model yapılara ait en düşük bağlanma skorlarını sağlayan etkileşimler ile ligandların bağlanma konumlarını ve reseptöre ait TM heliks konformasyonel yapılarını göstermektedir.

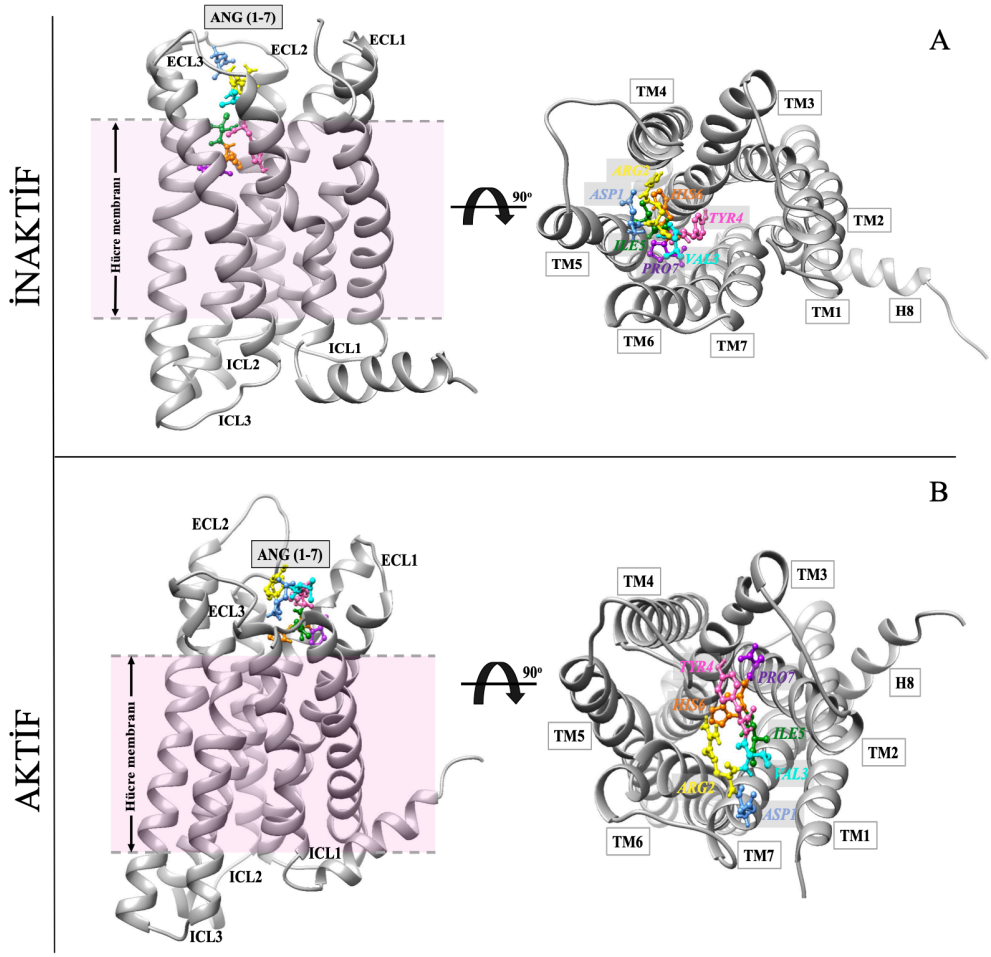
En düşük bağlanma skorlarına sahip ligand-reseptör bağlı pozları için aktif ve inaktif yapıdaki MAS reseptörüne Ang 1-7 bağlanma durumlarında 3D ligand-protein bağlanma etkileşimlerine ait bulgular Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu 3D ligand-protein etkileşimleri moleküler kenetlemelerden seçilen model yapılara ait en düşük bağlanma skorlarını sağlayan etkileşimler ile ligandların bağlanma konumlarını ve reseptöre ait TM heliks konformasyonel yapılarını göstermektedir.



Şekil 4.4. İnaktif benzeri AT2R'nin en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri. A) AT2R'nin inaktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve B) Ang II ligandının 3D ligand-protein bağlanmalarının yandan ve üstten görünümleri.

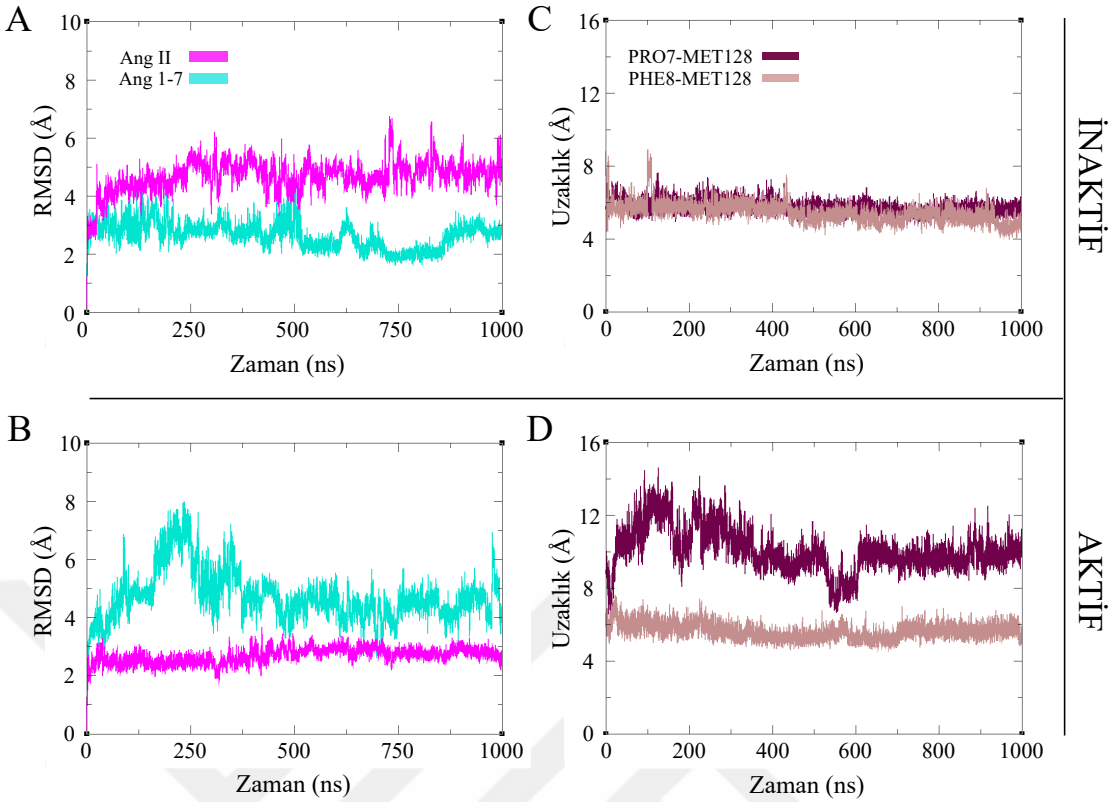


Şekil 4.5. Aktif benzeri AT2R'nin en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri. A) AT2R'nin aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve B) Ang II ligandının 3D ligand-protein bağlanmalarının yandan ve üstten görünümleri.



Şekil 4.6. MAS reseptörünün en iyi kenetleme skorlarına sahip 3D ligand etkileşimleri. A) MAS reseptörünün inaktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının, B) aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının 3D ligand-protein bağlanmalarının yandan ve üstten görünümleri.

Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının AT2R'ye moleküler kenetleme ile belirlenen en düşük kenetleme skoruna sahip ilk pozlarından başlamak üzere yapılan MD simülasyonlar boyunca stabilitelerini ve esnekliklerini gösteren RMSD ve mesafe analizlerinin grafikleri Şekil 4.4 (A) ve (B)'de verilmiştir. Hem inaktif hem de aktif benzeri AT2R'ye bağlanan Ang II ve Ang 1-7 ligandlarının 1000 ns MD simülasyon boyunca reseptöre stabil olarak bağlı kaldıkları belirlenmiştir. Ayrıca aktif benzeri AT2R'ye bağlanan Ang 1-7'nin ilk 250 ns simülasyon boyunca stabilitesinde yaklaşık 4 Å kadar bir değişim olduğu görülmüştür.

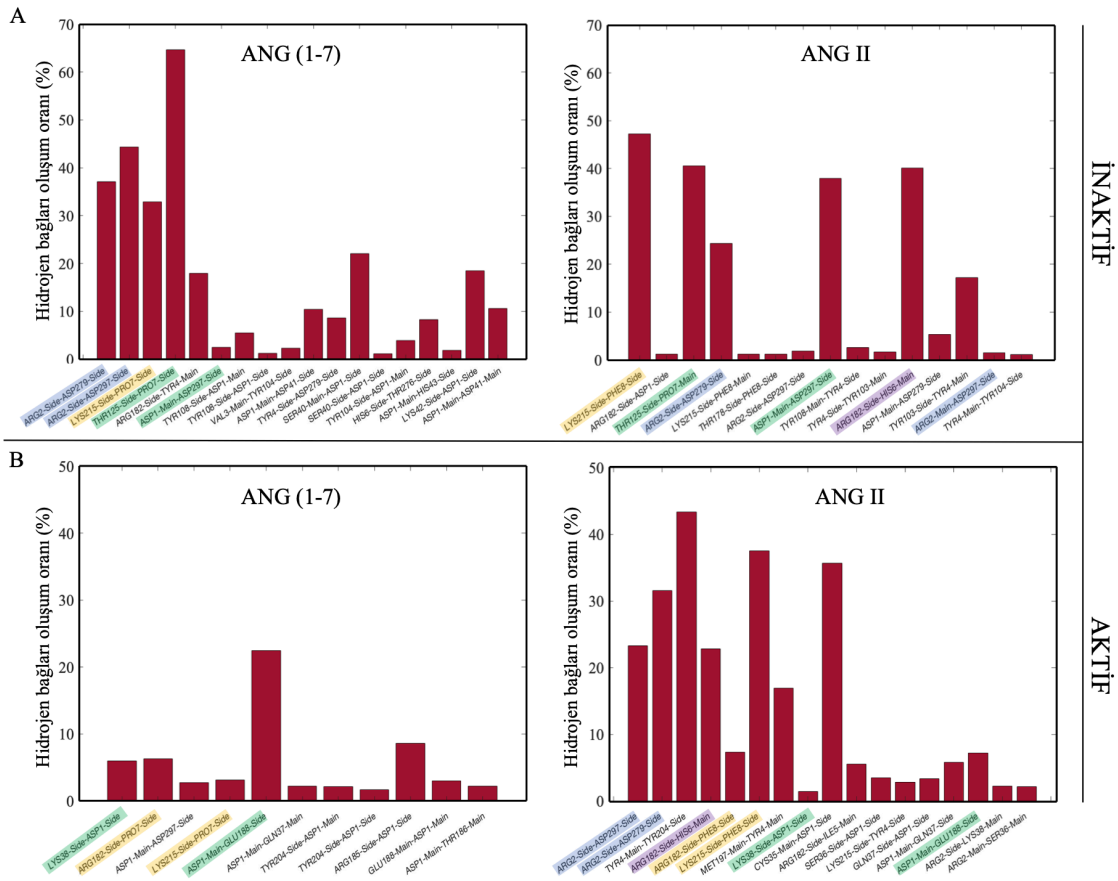


Şekil 4.7. AT2R'ye bağlanan ligandların RMSD ve mesafe analizleri. A) İnaktif benzeri ve B) aktif benzeri yapıda AT2R'ye bağlanan Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının RMSD değişim grafikleri. C) İnaktif benzeri ve D) aktif benzeri yapıdaki ligand-reseptör arasındaki PRO7 (Ang 1-7) -MET128 (AT2R) ve PHE8 (Ang II) -MET128 (AT2R) mesafelerinin MD simülasyon boyunca değişim grafikleri.

Ang II'nin son amino asidi olan PHE8 ile hidrofobik olarak bağlanarak AT2R'nin aktivasyonunda kilit bir rol oynadığı düşünülen AT2R'ye ait MET128 amino asidi arasındaki ve Ang II'nin son amino asidinin ACE2 tarafından koparılmasıyla oluşan Ang 1-7'nin son amino asidi olan PRO7 ile MET128 arasındaki mesafenin MD simülasyon boyunca değişimi Şekil 4.7 (C) ve (D)'de verilmiştir. AT2R'nin inaktif yapısına ligandların bağlı olduğu durumda Ang II ve Ang 1-7 ligandlarına ait son amino asitlerin MET128 ile arasındaki mesafe değişim analizleri incelendiğinde iki ligandın da MET128 ile 1000 ns MD simülasyon boyunca aralarındaki mesafenin değişmediği görülmüştür. AT2R'nin aktif yapısına ligandların bağlı olduğu durumda ise PHE8-MET128 arasındaki mesafe simülasyon boyunca değişmezken PRO7-MET128 arasındaki mesafenin arttığı ve Ang 1-7'nin moleküler kenetlemesindeki ilk poza ait mesafeden yaklaşık 4 Å kadar uzaklaştığı görülmektedir.

4.1.2. Hidrojen Bağları

AT2R ve MAS reseptörlerinin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına moleküler kenetleme ile kenetlenen Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının ilk bağlanma pozlarından başlayarak MD simülasyonlar boyunca ligand-protein arasındaki etkileşimlere aracılık eden hidrojen bağlarını belirlemek için VMD 1.9.3 programı ile yapılan analiz sonuçları Şekil 4.8 ve 4.9 ile Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.8. AT2R için ligand-protein arasındaki hidrojen bağları. A) AT2R'nin inaktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve Ang II ligandının B) AT2R'nin aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve Ang II ligandının MD simülasyon boyunca ligand bağlanmasına katkı sağlayan hidrojen bağlarının yoğunluk grafikleri.

Tablo 4.2. İnaktif benzeri durumda AT2R'nin Ang 1-7 ve Ang II ligandları ile MD simülasyon boyunca etkileşimleri sırasındaki hidrojen bağları.

AT2R – Ang 1-7 (inaktif)		
Donör	**Akseptör**	**Frame**
THR125-Side	PRO7-Side	1293
ARG2-Side	ASP297-Side	888
ARG2-Side	ASP279-Side	743
LYS215-Side	PRO7-Side	657
SER40-Main	ASP1-Side	441
LYS42-Side	ASP1-Side	369
ARG182-Side	TYR4-Main	358
ASP1-Main	ASP41-Main	212
ASP1-Main	ASP41-Side	209
TYR4-Side	ASP279-Side	172
HIS6-Side	THR276-Side	166
TYR108-Side	ASP1-Main	109
TYR104-Side	ASP1-Main	77
ASP1-Main	ASP297-Side	50

AT2R – Ang II (inaktif)		
Donör	**Akseptör**	**Frame**
LYS215-Side	PHE8-Side	945
THR125-Side	PRO7-Main	811
ARG182-Side	HIS6-Main	803
ASP1-Main	ASP297-Side	759
ARG2-Side	ASP279-Side	486
TYR103-Side	TYR4-Main	344
ASP1-Main	ASP279-Side	107
TYR108-Main	TYR4-Side	52

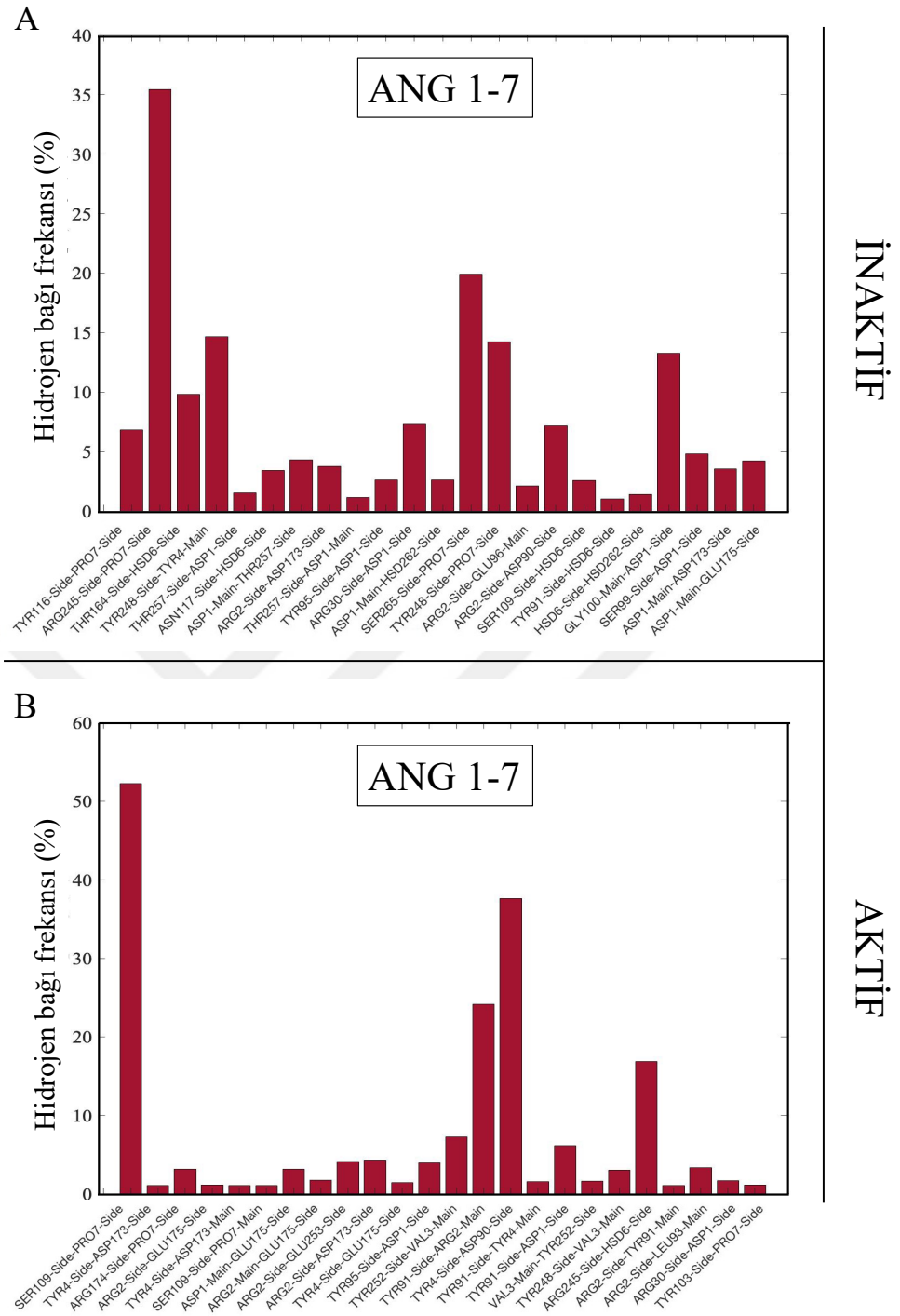
Tablo 4.3. Aktif benzeri durumda AT2R'nin Ang 1-7 ve Ang II ligandları ile MD simülasyon boyunca etkileşimleri sırasındaki hidrojen bağları.

AT2R – Ang 1-7 (aktif)		
Donör	**Akseptör**	**Frame**
ASP1-Main	GLU188-Side	449
ARG185-Side	ASP1-Side	172
ARG182-Side	PRO7-Side	126
LYS38-Side	ASP1-Side	119
LYS215-Side	PRO7-Side	62
GLU188-Main	ASP1-Main	60
ASP1-Main	ASP297-Side	55

AT2R – Ang II (aktif)		
Donör	**Akseptör**	**Frame**
TYR4-Main	TYR204-Side	867
LYS215-Side	PHE8-Side	750
CYS35-Main	ASP1-Side	714
ARG2-Side	ASP279-Side	631
ARG2-Side	ASP297-Side	465
ARG182-Side	HIS6-Main	456
MET197-Main	TYR4-Main	338
ARG182-Side	PHE8-Side	146
ASP1-Main	GLU188-Side	144
ASP1-Main	GLN37-Side	116
ARG182-Side	ILE5-Main	111
SER36-Side	ASP1-Side	69
GLN37-Side	ASP1-Side	66
LYS215-Side	TYR4-Side	56

AT2R'nin inaktif benzeri yapısına Ang 1-7'nin bağlanmasına katkı sağlayan hidrojen bağlarının sayısı aktif yapısına kıyasla daha fazladır ve simülasyon süresinin çoğunda bu hidrojen bağlarının korunduğu gözlemlenmiştir. İnaktif benzeri yapıda Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağları; PRO7-THR125, ARG2-ASP297, ARG2-ASP279 ve PRO7-LYS215 amino asit çiftleri arasındaki bağlardır. Aktif benzeri yapıda Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağları ise; ASP1-GLU188 amino asit çifti arasındaki bağlardır. Ang 1-7'nin inaktif ve aktif yapılara bağlanmasında katkı sunan ortak bir hidrojen bağı bulunmamaktadır.

AT2R'nin inaktif benzeri yapısına Ang II'nin bağlanmasında katkı sağlayan hidrojen bağlarının sayısı aktif yapısına kıyasla daha azdır. İnaktif benzeri yapıda Ang II'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağları; PHE8-LYS215, PRO7-THR125, HIS6-ARG182, ASP1-ASP297 ve ARG2-ASP279 ligand-protein çifti arasındaki bağlardır. Aktif yapıda Ang II'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağları ise; TYR4-TYR204, PHE8-LYS215, ASP1-CYS35, ARG2-ASP279, ARG2-ASP297 ve HIS6-ARG182 ligand-protein çiftleri arasındaki bağlardır. Bu bağlardan PHE8-LYS215, ARG2-ASP279 ve HIS6-ARG182 arasındaki hidrojen bağları Ang II'nin inaktif ve aktif yapılara bağlanmasında katkı sunan ortak bağlardır. Ayrıca inaktif yapıya Ang 1-7 ve Ang II bağlanmasında PRO7-THR125 ve ARG2-ASP279 arasındaki hidrojen bağları ortaktır. Aktif yapıya Ang 1-7 bağlanmasında LYS215 ile PRO7 hidrojen bağı yaparken Ang II bağlanmasında bu bağın PHE8 ile sağlandığı görülmüştür.



Şekil 4.9. MAS reseptörü için ligand-protein arasındaki hidrojen bağları. A) MAS reseptörünün inaktif benzeri yapısı ile Ang 1-7 ligandının, B) aktif benzeri yapısı ile Ang 1-7 ligandının MD simülasyonlar boyunca ligand bağlanmasına katkı sağlayan hidrojen bağlarının yoğunluk grafikleri.

Tablo 4.4. İnaktif ve aktif benzeri durumlarda MAS reseptörünün Ang 1-7 ligandı ile MD simülasyonlar boyunca etkileşimleri sırasındaki hidrojen bağları.

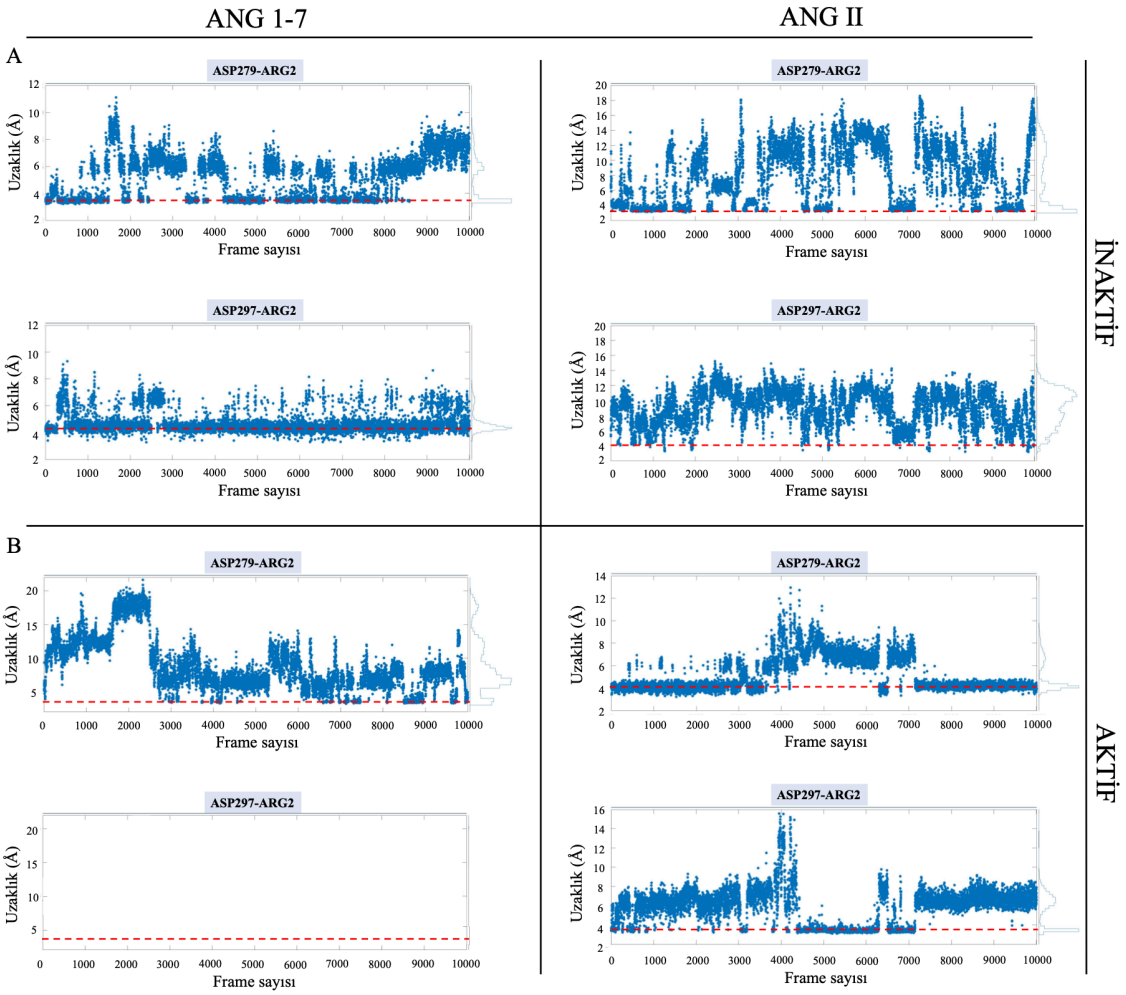
MAS – Ang 1-7 (inaktif)		
Donör	**Akseptör**	**Frame**
ARG245-Side	PRO7-Side	3545
SER265-Side	PRO7-Side	1992
TYR248-Side	TYR4-Main	1464
TYR248-Side	PRO7-Side	1422
GLY100-Main	ASP1-Side	1328
THR164-Side	HIS6-Side	984
ARG30-Side	ASP1-Side	729
ARG2-Side	ASP90-Side	716
TYR116-Side	PRO7-Side	684
SER99-Side	ASP1-Side	480
ASP1-Main	THR257-Side	432
ASP1-Main	GLU175-Side	421
ARG2-Side	ASP173-Side	375
ASP1-Main	ASP173-Side	356
ASN117-Side	HIS6-Side	344
ASP1-Main	HSD262-Side	264
TYR95-Side	ASP1-Side	261
SER109-Side	HIS6-Side	258
ARG2-Side	GLU96-Main	212
THR257-Side	ASP1-Side	153
HIS6-Side	HSD262-Side	140
THR257-Side	ASP1-Main	116
TYR91-Side	HIS6-Side	104

MAS – Ang 1-7 (aktif)		
Donör	**Akseptör**	**Frame**
SER109-Side	PRO7-Side	5223
TYR4-Side	ASP90-Side	3765
TYR91-Side	ARG2-Main	2416
ARG245-Side	HIS6-Side	1686
TYR252-Side	VAL3-Main	728
ARG2-Side	ASP173-Side	434
ARG2-Side	GLU253-Side	414
TYR95-Side	ASP1-Side	394
ARG2-Side	LEU93-Main	332
ASP1-Main	GLU175-Side	314
ARG174-Side	PRO7-Side	318
TYR248-Side	VAL3-Main	303
ARG2-Main	GLU175-Side	176
ARG30-Side	ASP1-Side	169
VAL3-Main	TYR252-Side	161
TYR91-Side	TYR4-Main	159
TYR4-Side	GLU175-Side	143
TYR103-Side	PRO7-Side	114
ARG2-Side	GLU175-Side	113
TYR4-Side	ASP173-Side	110
ARG2-Side	TYR91-Main	109
TYR4-Side	ASP173-Main	108
SER109-Side	PRO7-Main	107

MAS reseptörünün inaktif ve aktif benzeri yapılarına Ang 1-7'nin bağlanmasına katkı sağlayan farklı hidrojen bağları bulunsa da sayısal olarak eşittir. İnaktif benzeri yapıda Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağları; PRO7-ARG245, PRO7-SER265, TYR4-TYR248, PRO7-TYR248, ASP1-GLY100 ve HIS6-THR164 amino asit çiftleri arasındaki bağlardır. Aktif benzeri yapıda Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağları ise; PRO7-SER109, TYR4-ASP90, ARG2-TYR91 ve HIS6-ARG245 amino asit çiftleri arasındaki bağlardır. Ayrıca Ang 1-7'nin inaktif ve aktif benzeri yapılara bağlanmasına katkı sunan ortak bir hidrojen bağı bulunmamaktadır.

4.1.3. Tuz Köprüleri

AT2R ve MAS reseptörlerinin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına moleküler kenetleme ile kenetlenen Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının ilk bağlanma pozlarından başlayarak MD simülasyonlar boyunca ligand-protein arasındaki etkileşimlere aracılık eden tuz köprülerini belirlemek için VMD 1.9.3 programı ile yapılan analiz sonuçları Şekil 4.10 ve 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10. AT2R için ligand-protein arasındaki tuz köprüleri. A) AT2R'nin inaktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve Ang II ligandının B) AT2R'nin aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve Ang II ligandının MD simülasyonlar boyunca ligand bağlanmasına katkı sağlayan tuz köprülerinin değişim grafikleri.

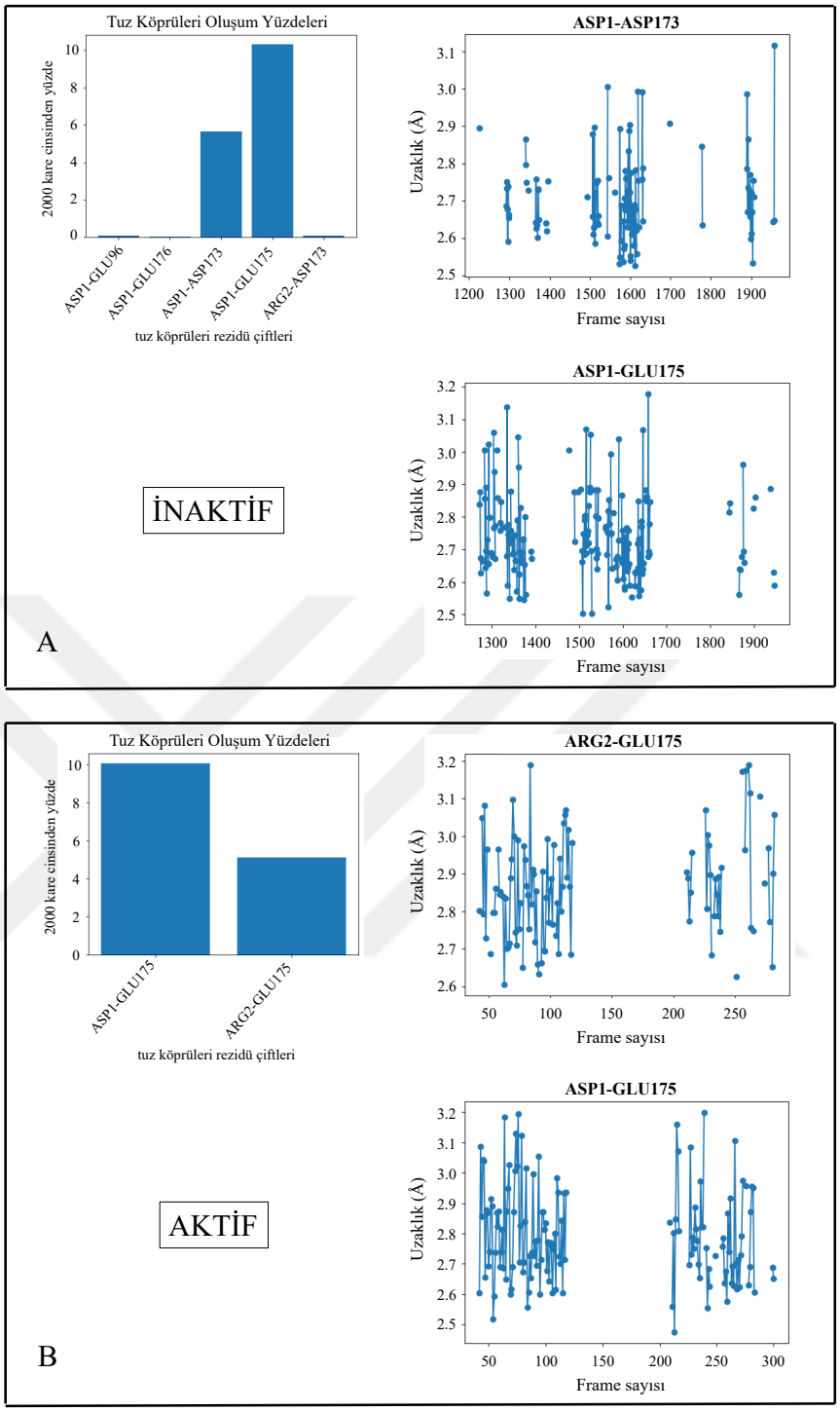
AT2R'nin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasında katkı sağlayan tuz köprüleri aynı olup simülasyon boyunca tuz köprülerini oluşturan rezidüler arasındaki mesafe değişimleri gözlemlenmiştir. İnaktif ve aktif benzeri

yapılarda Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasına katkı yapan tuz köprüleri; ARG2-ASP279 ve ARG2-ASP297 amino asit çiftleri arasındaki bağlardır.

Ang 1-7'nin inaktif yapıya bağlanmasında bu tuz köprülerinden bağlanmaya en çok katkı yapan ARG2-ASP297 arasındaki bağdır ve simülasyon boyunca bu tuz köprüsünü oluşturan bağ korunmuştur. Ang 1-7'nin aktif benzeri yapıya bağlanmasında ise bu tuz köprüsü hiç oluşmamış, bunun yerine ARG2-ASP279 bağı tarafından bağlanmaya katkı sağlanmıştır.

Ang II'nin inaktif benzeri yapıya bağlanmasında ARG2-ASP279 bağı ARG2-ASP297 bağından daha çok katkı sağlamış fakat simülasyon boyunca bu tuz köprüleri korunmamıştır. Ang II'nin aktif yapıya bağlanmasında ise bu iki tuz köprüsünden ARG2-ASP279 arasındaki bağ en çok katkıyı yapmış, 400-700 ns simülasyon süreleri arasında ARG2'nin ASP279 ile yaptığı bağ koparak ASP297 ile tuz köprüsü oluşturmuş ve bu sayede ligand-protein arasındaki tuz köprüsü simülasyon boyunca korunmuştur.

MAS reseptörünün hem inaktif hem de aktif benzeri yapısına Ang 1-7 ligandının bağlanmasında katkı sağlayan tuz köprülerini oluşturan rezidüler arasındaki mesafe değişimleri MD simülasyonlar boyunca hesaplanmıştır. İnaktif benzeri yapıda Ang 1-7 ligandının bağlanmasına en çok katkı yapan tuz köprüleri; ASP1-GLU175 ve ASP1-ASP173, aktif yapıda ise ASP1-GLU175 ve ARG2-GLU175 amino asit çiftleri arasındaki bağlardır. Ang 1-7'nin inaktif yapıya bağlanmasında bağlanmaya en çok katkıyı yapan iki tuz köprüsü MD simülasyonda ilk 600 ns'den sonra oluşmuş, aktif yapıya bağlanmasında ise simülasyonun ilk 150 ns boyunca tuz köprülerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca ligand-protein arasındaki mesafeler 3.2 Å sınırıyla korunmuştur. ASP1-GLU175 tuz köprüsü Ang 1-7'nin inaktif ve aktif yapılara bağlanmasında katkı sunan ortak bağ olduğu görülmüştür.



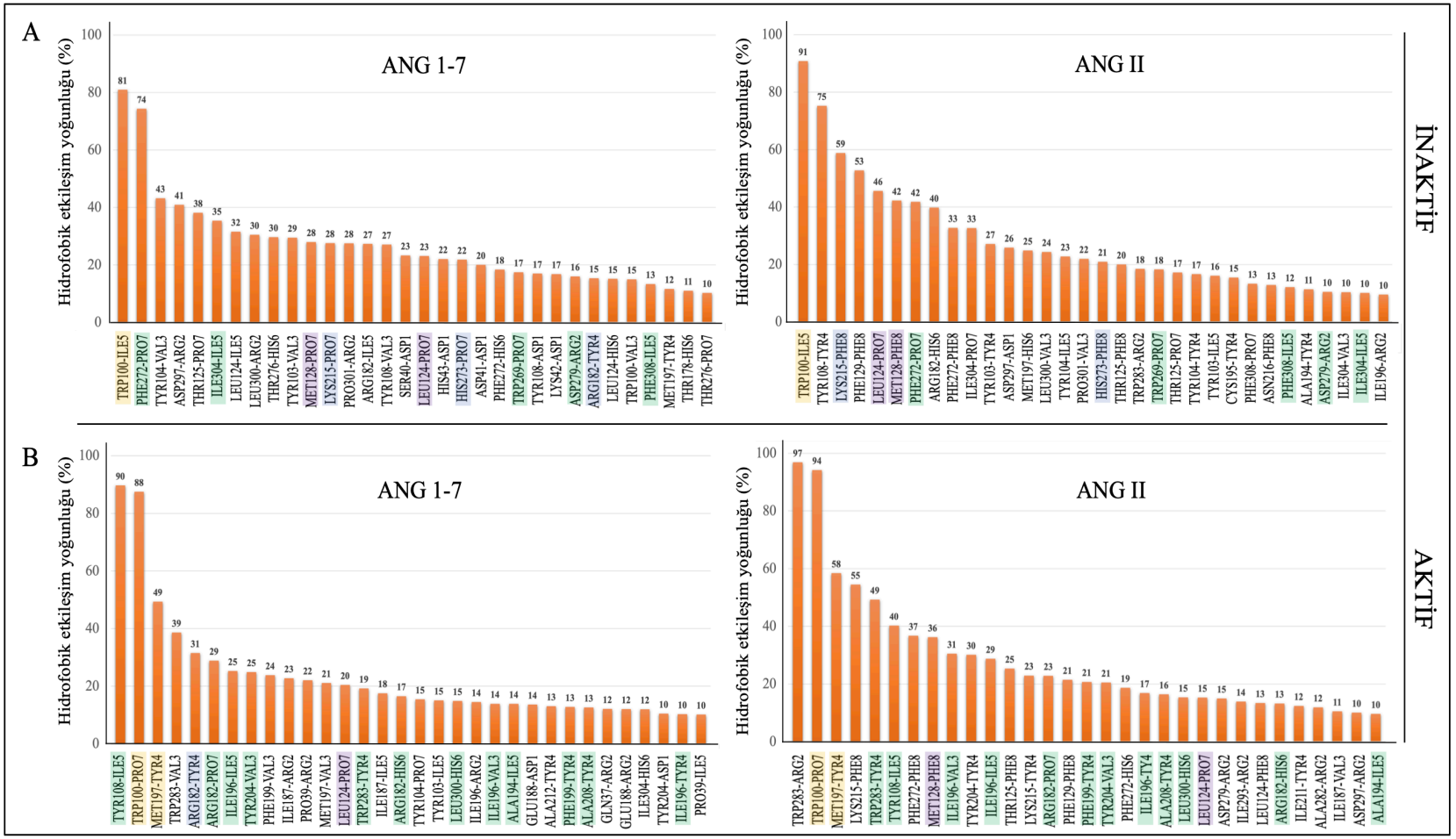
Şekil 4.11. MAS reseptörü için ligand-protein arasındaki tuz köprüleri. A) MAS reseptörünün inaktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının, B) aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının MD simülasyon boyunca ligand bağlanmasına katkı sağlayan tuz köprülerinin değişim grafikleri.

4.1.4. Hidrofobik Etkileşimler

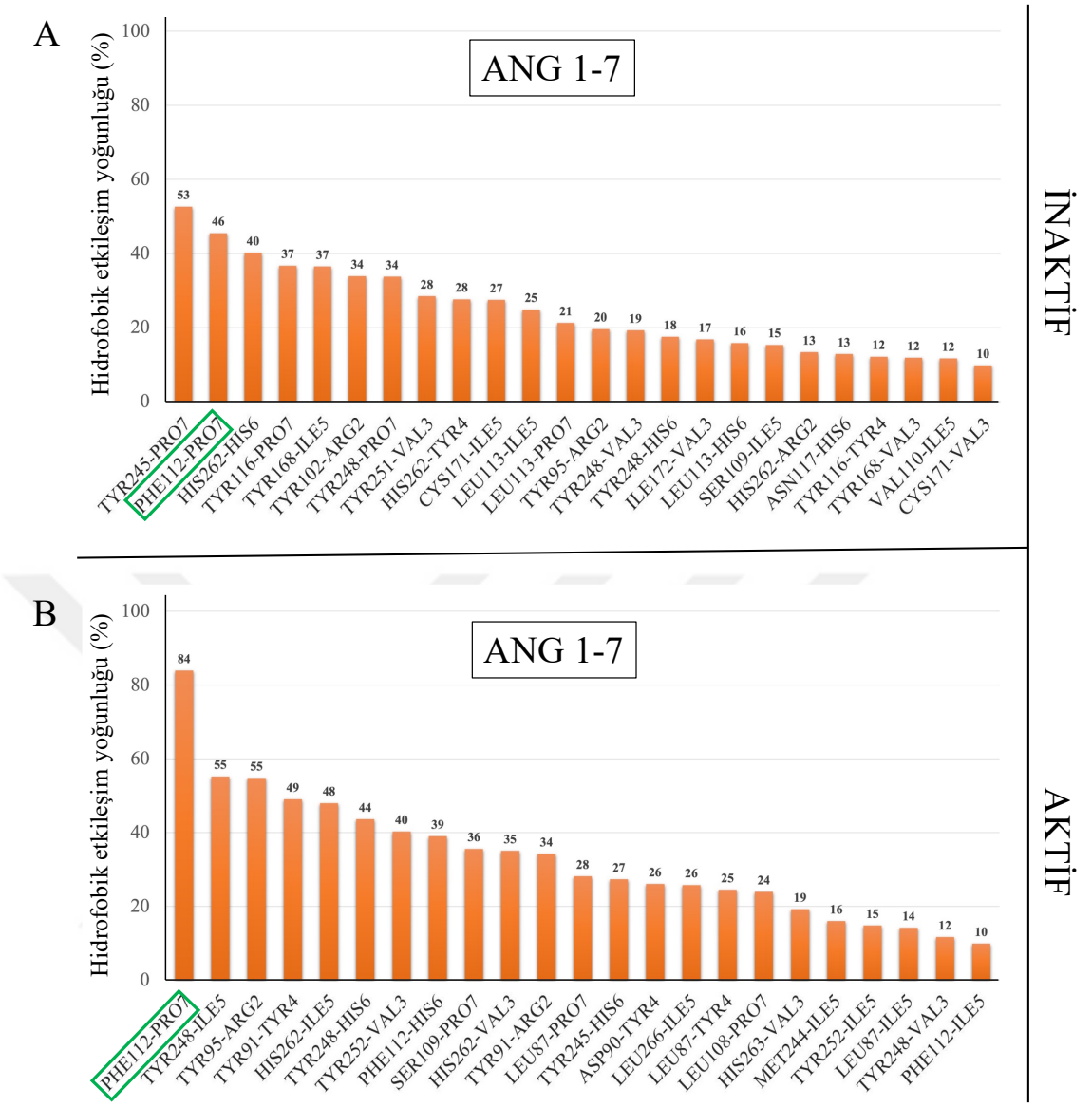
AT2R ve MAS reseptörlerinin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına moleküler kenetleme ile kenetlenen Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının ilk bağlanma pozundan başlayarak MD simülasyonlar boyunca ligand-protein arasındaki etkileşimlere aracılık eden hidrofobik etkileşimlere ait analiz sonuçları Şekil 4.12 ve 4.13'te verilmiştir.

AT2R yapılarına ligandların bağlanmasına katkı sunan ve neredeyse simülasyon süresinin tamamında bu ligandların reseptöre bağlı kalmasını sağlayan hidrofobik kuvvetler ile inaktif ve aktif yapılara farklı iki ligandın bağlanmasına dayalı olarak oluşan benzer ve farklı hidrofobik kuvvetlerin de varlığı belirlenmiştir. AT2R'nin inaktif yapısına Ang 1-7'nin bağlanmasına ILE5-TRP100 ve PRO7-PHE272, aktif yapısına Ang 1-7'nin bağlanmasına ILE5-TYR108 ve PRO7-TRP100, inaktif yapısına Ang II'nin bağlanmasına ILE5-TRP100 ve TYR4-TYR108, aktif yapısına Ang II'nin bağlanmasına ise ARG2-TRP283 ve PRO7-TRP100 amino asit çiftleri arasındaki bağların katkı yaptığı ve MD simülasyonlar süresince korunan hidrofobik kuvvetler olduğu belirlenmiştir. Ligand-protein arasındaki bağlanmalara en fazla katkı yapan hidrofobik etkileşimlerde AT2R'nin inaktif ve aktif durumdaki yapılarına Ang 1-7 ve Ang II gibi farklı ligandlar bağlandığında reseptöre ait TRP100 rezidüsünün ortak olduğu görülmüştür.

İnaktif ve aktif benzeri MAS reseptör yapılarına Ang 1-7 bağlanmasına katkı sunan hidrofobik kuvvetler belirlenmiştir. MAS reseptörünün inaktif yapısına Ang 1-7'nin bağlanmasına en fazla katkı yapan PRO7-TYR245 ve PRO7-PHE112, aktif yapısına Ang 1-7'nin bağlanmasına en fazla katkı yapan ise PRO7-PHE112 ve ILE5-TYR248 amino asit çiftleri arasındaki bağlara ait hidrofobik kuvvetler olduğu belirlenmiştir. MAS reseptörünün inaktif ve aktif benzeri yapılarına Ang 1-7 bağlandığında bağlanmaya katkı sunan PRO7-PHE112 hidrofobik kuvvetinin ortak olduğu ve bu kuvvetin inaktif yapıya kıyasla aktif yapıya bağlanmada MD simülasyonlar süresince daha çok katkı sağladığı görülmüştür.



Şekil 4.12. AT2R için ligand-protein arasındaki hidrofobik etkileşimler. A) AT2R' nin inaktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve Ang II ligandının B) AT2R' nin aktif yapısı ile Ang 1-7 ligandının ve Ang II ligandının MD simülasyonlar boyunca ligand bağlanmasına katkı sağlayan hidrofobik kuvvetlerin yoğunluk grafikleri.



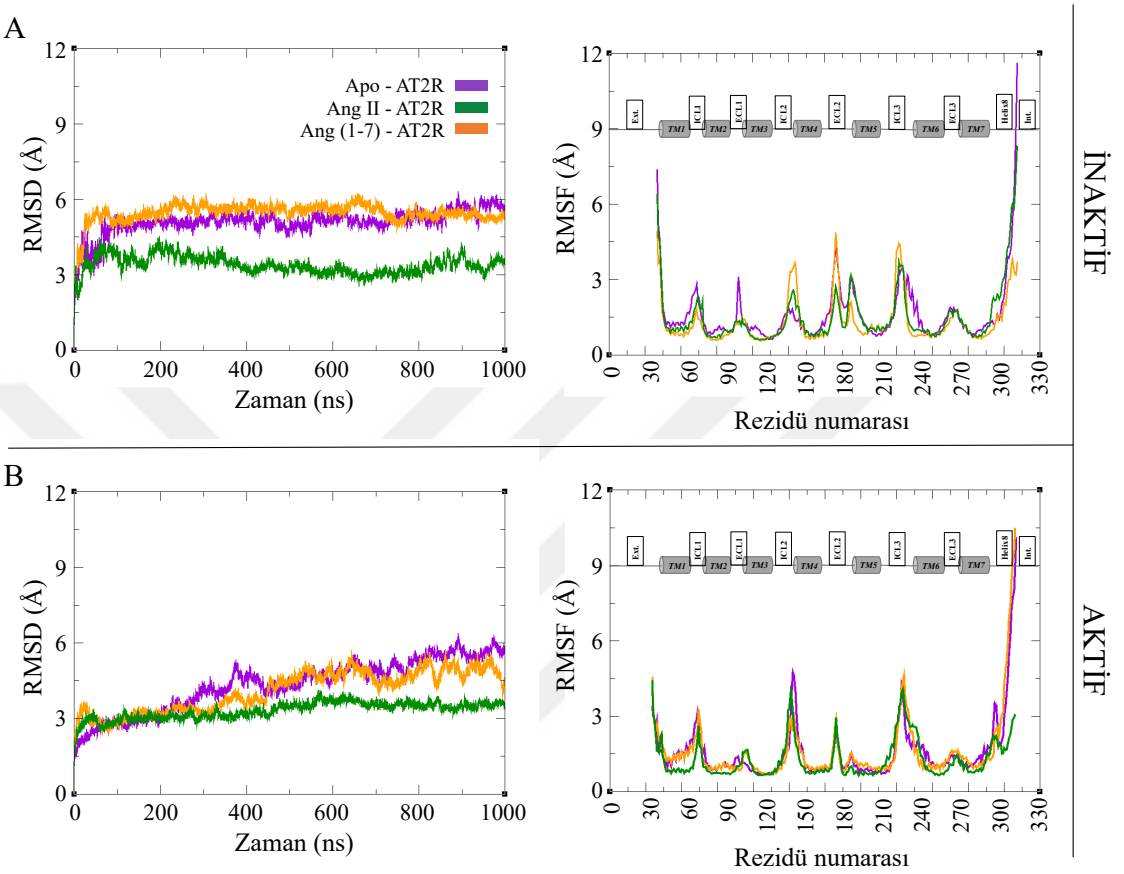
Şekil 4.13. MAS reseptörü için ligand-protein arasındaki hidrofobik etkileşimler. A) MAS reseptörünün inaktif yapısıyla ve B) aktif yapısıyla Ang 1-7 ligandının MD simülasyonlar boyunca ligand bağlanmasına katkı sağlayan hidrofobik kuvvetlerin yoğunluk grafikleri.

4.2. Yapısal Dinamik Değişimler

Ang 1-7 ligandının AT2R ve MAS reseptörünün hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına bağlanma durumları incelendiğinde MD simülasyonlar boyunca ligand bağlanmasına dayalı reseptör yapılarında meydana gelen konformasyonel ve yapısal dinamik değişimlerin analizlerine ait bulgular aşağıda verilmiştir. Ayrıca Ang II ligandının AT2R'ye bağlanmasına dayalı yapısal dinamik değişimlerin analizleri de verilmiştir.

4.2.1. RMSD ve RMSF Analizleri

AT2R'nin ligand bağlı olduğu ve olmadığı durumlarda inaktif ve aktif benzeri yapılarda meydana gelen yapısal stabilite ve esneklik değişimlerine ait RMSD ve RMSF grafikleri Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

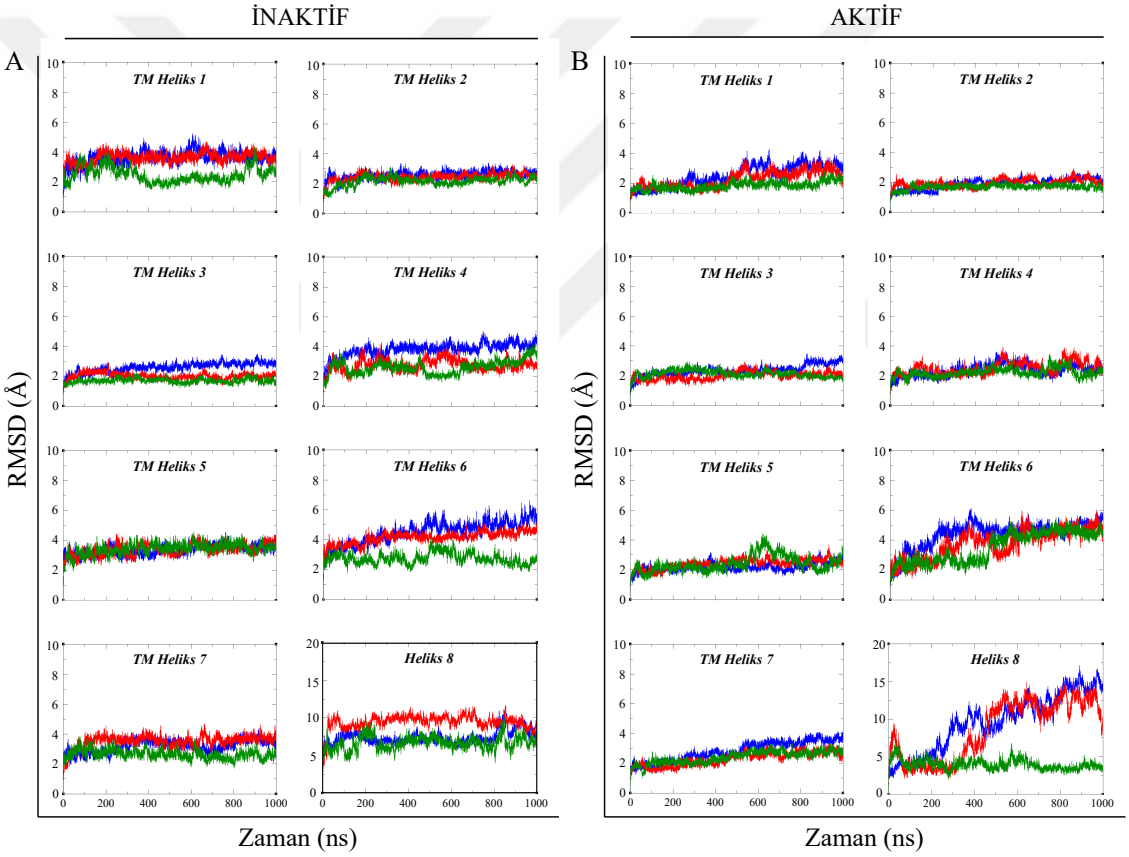


Şekil 4.14. AT2R için RMSD ve RMSF analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait RMSD ve RMSF değişim grafikleri.

İnaktif benzeri durumda Apo-AT2R ve Ang 1-7 bağlı AT2R yapılarının RMSD grafikleri incelendiğinde yaklaşık 5.5-6 Å civarında benzer bir stabiliteye sabit oldukları görülürken, Ang II bağlı AT2R yapısının yaklaşık 3 Å seviyesinde RMSD'ye sahip olduğu ve reseptörü ligandsız duruma kıyasla daha kararlı bir yapıya dönüştürdüğü görülmüştür. İnaktif benzeri AT2R yapısına ait RMSF grafiği incelendiğinde Apo-AT2R'deki yapısal dalgalanmalara göre Ang 1-7 bağlanmasının özellikle ICL2, ECL2 ve ICL3'te daha fazla dalgalanmaya sebep olduğu görülmüştür. Ang II bağlanması ile de ICL2'de meydana gelen dalgalanmanın Apo-AT2R'ye göre daha fazla olmasına rağmen Ang 1-7 bağlanmasında görülen dalgalanmadan daha düşüktür. Apo-AT2R'ye kıyasla Ang 1-7 ve

Ang II bağlanması ile özellikle ligand bağlanma bölgesi olan ECL1'deki dalgalanmalarda ise bir azalma görülmüştür.

Aktif benzeri durumda Apo-AT2R ve Ang 1-7 bağlı AT2R yapılarının RMSD grafikleri incelendiğinde RMSD değerinin başlangıçta 3 Å civarında, 300 ns sonra ise yaklaşık 5.5-6 Å civarında olduğu ve Ang 1-7 bağlı durumla Apo durumun benzer bir stabiliteye sabit oldukları görülmüştür. Ang II bağlı AT2R yapısının ise yaklaşık 3 Å bir RMSD'ye sahip olduğu ve reseptörü ligandsız duruma kıyasla daha kararlı bir yapıda tuttuğu görülmüştür. Aktif benzeri AT2R yapısına ait RMSF grafiği incelendiğinde ise Apo-AT2R'deki yapısal dalgalanmalara göre yalnızca ICL2'deki dalgalanmalarda Ang 1-7 ve Ang II liganlarının bağlanmasıyla bir azalma görülmüştür.



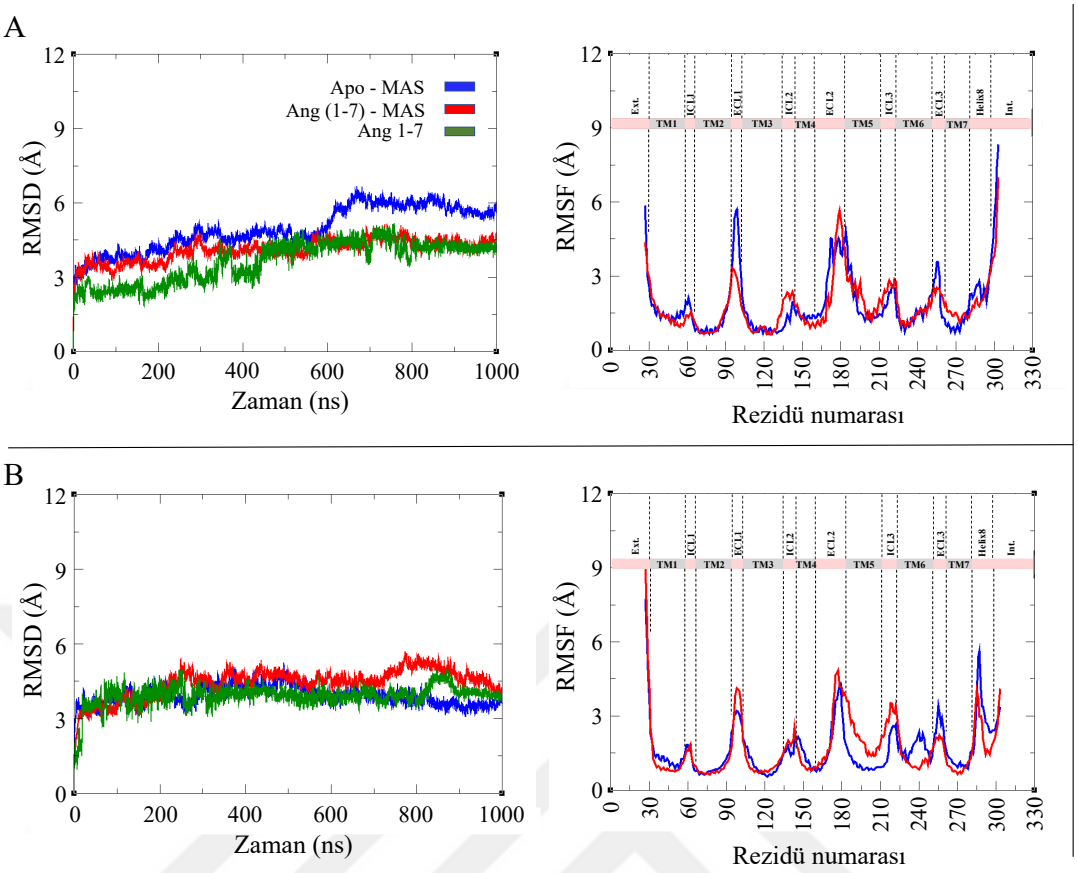
Şekil 4.15. AT2R'nin TM sarmal yapılarına ait RMSD analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait TM helikslerin RMSD değişim grafikleri. Mavi renk Apo-AT2R, kırmızı renk Ang (1-7)-AT2R ve yeşil renk Ang II-AT2R kompleks yapılarını temsil etmektedir.

AT2R'nin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına ligand bağlanmadığı ve Ang 1-7 ile Ang II ligandlarının bağlı olduğu durumlarda reseptörün 7 TM bileşeni ve kuyruk kısmındaki heliks yapısına ait RMSD değişimlerinin grafikleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Ang II ligandının bağlanması ile inaktif benzeri AT2R'nin TM1, TM3, TM4, TM6 ve TM7 yapılarının Apo-AT2R'ye kıyasla daha kararlı bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. TM3, TM4 ve TM7'de daha az bir RMSD değişimi gözlemlenirken özellikle TM1 ve TM6'da bu değişim oldukça fazladır. TM2 ve TM5 bileşenlerinde ise Apo-AT2R'ye kıyasla herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Ang II ligandının aktif benzeri AT2R'ye bağlanması ile TM1, TM6 ve Heliks 8 yapılarında Apo-AT2R'ye kıyasla daha kararlı bir yapı görülmüştür. TM1 yapısında daha az bir RMSD değişimi gözlemlenirken bu değişim Heliks 8'de en fazladır. TM6'da ise 400 ns boyunca Apo-AT2R'ye kıyasla daha kararlı bir yapı mümkünken 400 ns'den sonra bu kararlılık ortadan kalkmıştır.

Ang 1-7 ligandının inaktif benzeri AT2R'ye bağlanması ile TM3 ve TM4 bileşenlerinin Apo-AT2R'ye kıyasla daha kararlı bir yapıya sahip olduğu gözlenirken Heliks 8 bileşeninin kararlı yapıdan uzaklaştığı görülmüştür. TM1, TM2, TM5, TM6 ve TM7 bileşenlerinde ise Apo-AT2R'ye kıyasla herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Ang 1-7 ligandının aktif benzeri AT2R'ye bağlanması ile tüm TM bileşenlerinde ve Heliks 8'de Apo-AT2R'ye kıyasla herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir.

MAS reseptörünün ligand bağlı olduğu ve olmadığı durumlarda inaktif ve aktif benzeri yapılarında meydana gelen yapısal kararlılık ve esneklik değişimlerine ait RMSD ve RMSF grafikleri Şekil 4.16'te gösterilmiştir.

İnaktif benzeri MAS yapısı ile bu yapıya Ang 1-7 bağlandıktan sonraki RMSD grafiği incelendiğinde 600 ns MD simülasyon boyunca Apo-MAS ile Ang 1-7 bağlı MAS yapısının aynı RMSD değerine sahip olduğu fakat ligand bağlanmasının RMSD değeri 4-5 Å olarak reseptörü ligandsız duruma kıyasla daha kararlı bir yapıda tuttuğu görülmüştür. Ang 1-7 ligandının da inaktif benzeri yapıdaki MAS reseptörüne bağlanıp 1000 ns boyunca kararlı bir şekilde bağlı kaldığı belirlenmiştir. İnaktif benzeri MAS yapısına ait RMSF grafiği incelendiğinde Apo-MAS'taki yapısal dalgalanmalara göre Ang 1-7 bağlanmasının ECL1 ve ECL3'te dalgalanmayı azalttığı, ECL2'de ise artırdığı görülmüştür.



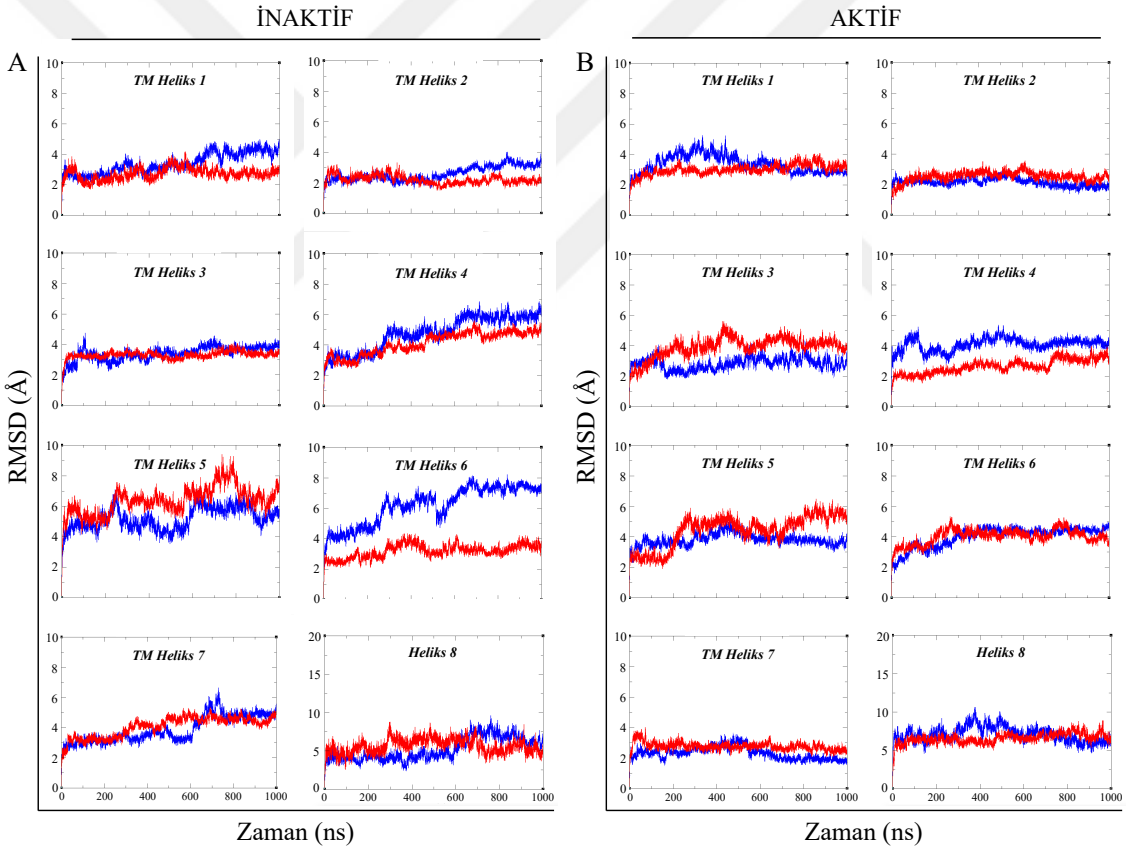
Şekil 4.16. MAS reseptörü için RMSD ve RMSF analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-MAS, Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ve Ang 1-7 ligandına ait RMSD ve RMSF değişim grafikleri.

Aktif benzeri MAS yapısı ile bu yapıya Ang 1-7 bağlandıktan sonraki RMSD grafiği incelendiğinde ise 1000 ns simülasyon boyunca Apo-MAS ile Ang 1-7 bağlı MAS yapısının hemen hemen aynı 4-5 Å RMSD değerine sahip olduğu fakat 700 ns'den sonra ligand bağlanmasıyla reseptörün kararlı yapıdan uzaklaşmaya başladığı görülmüştür. Ang 1-7 ligandının da aktif benzeri yapıdaki MAS reseptörüne bağlanıp 1000 ns boyunca kararlı bir şekilde bağlı kaldığı belirlenmiştir. Aktif benzeri MAS yapısına ait RMSF grafiği incelendiğinde Apo-MAS'taki yapısal dalgalanmalara göre Ang 1-7 bağlanmasının ECL3 ve TM6'da dalgalanmayı azalttığı; ECL1, ECL2, ICL3 ve TM5'te ise artırdığı görülmüştür.

MAS reseptörünün hem inaktif hem de aktif yapılarına ligand bağlanmadığı ve Ang 1-7 ligandının bağlı olduğu durumlarda reseptörün 7 TM bileşeni ve kuyruk kısmındaki heliks yapısına ait RMSD değişimlerinin grafikleri Şekil 4.17'te verilmiştir.

Ang 1-7 ligandının inaktif benzeri MAS reseptörüne bağlanması ile TM1, TM2, TM4 ve Heliks 8 bileşenlerinin Apo-MAS'a kıyasla özellikle 600 ns'den sonra daha kararlı bir yapıya sahip olduğu gözlenirken TM6 bileşeninin simülasyon boyunca yaklaşık 5-6 Å RMSD farkla en kararlı yapıya ulaştığı görülmüştür. TM5 bileşeni ligand bağlanmasıyla kararlı yapıdan uzaklaşırken TM3 ve TM7 bileşenlerinde ise Apo-MAS'a kıyasla herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir.

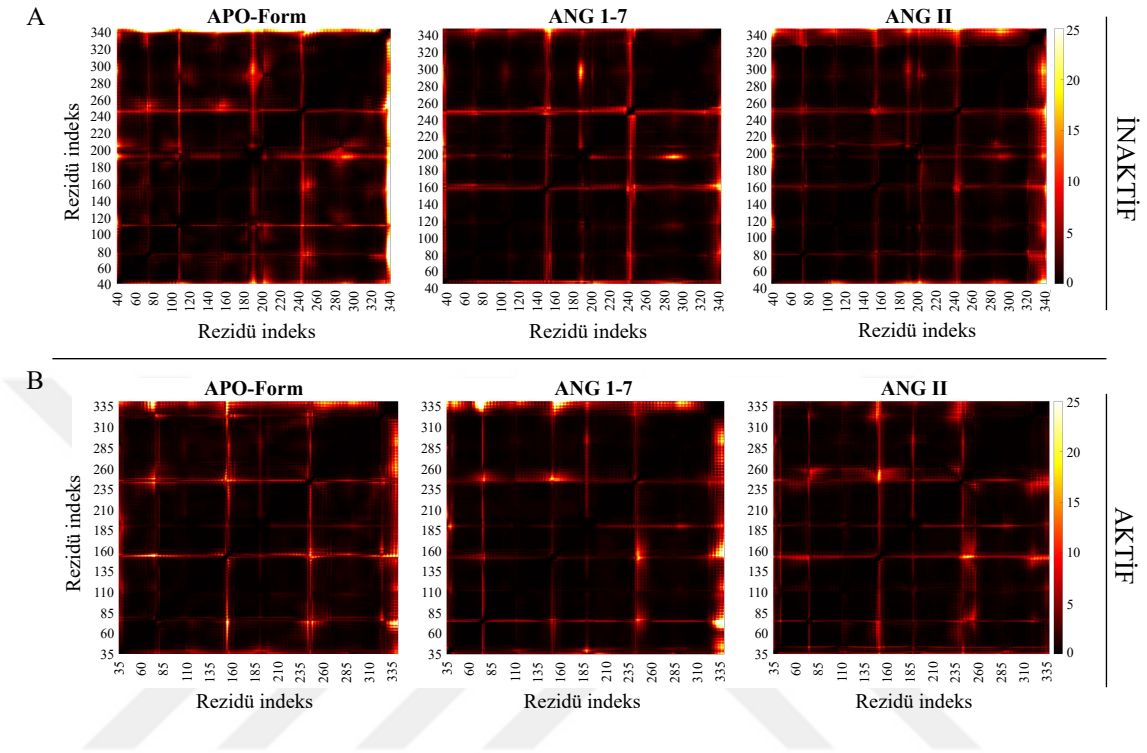
Ang 1-7 ligandının aktif benzeri MAS reseptörüne bağlanması ile TM1, TM2, TM6, TM7 ve Heliks 8 bileşenlerinde Apo-MAS'a kıyasla herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. TM4 bileşeni ligand bağlanmasıyla simülasyon boyunca daha kararlı yapıya ulaşırken TM3 bileşeninin simülasyon boyunca, TM5 bileşenleninin ise 600 ns'den sonra kararlı yapıdan uzaklaştığı görülmüştür.



Şekil 4.17. MAS reseptörünün TM sarmal yapılarına ait RMSD analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ait TM helikslerin RMSD değişim grafikleri. Mavi renk Apo-MAS ve kırmızı renk Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarını temsil etmektedir.

4.2.2. CP Analizleri

AT2R'ye inaktif ve aktif benzeri durumda ligand bağlanmadan önce ve sonra reseptöre ait rezidü çiftlerinin ikili etkileşimleri için yapılan iletişim eğilimi analiz sonuçlarına ait etkileşim haritaları Şekil 4.18'de verilmiştir.



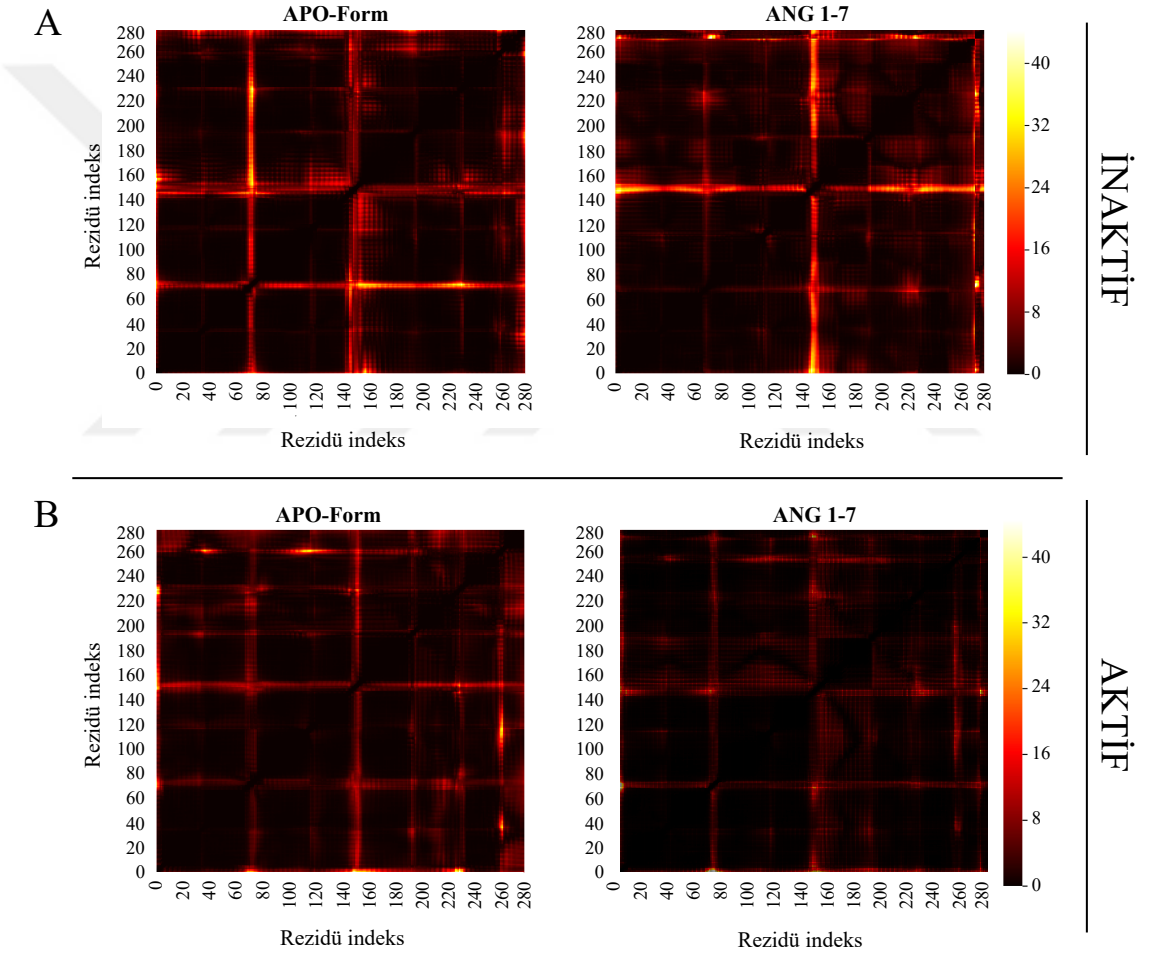
Şekil 4.18. AT2R için CP analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait CP değişim haritaları.

İnaktif durumda Apo-AT2R için etkileşim haritası incelendiğinde herhangi bir ligand bağlanmadığı durumda reseptörün ECL1, ECL2, ICL1 ve ICL3 kısımlarında iletişim eğilimlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Ang 1-7 ligandı inaktif benzeri AT2R'ye bağlandığında Apo-AT2R'ye kıyasla ECL1, ECL2 ve ICL1 kısımlarında iletişim eğilimlerinin azaldığı, ICL2 ve ICL3 kısımlarında ise arttığı belirlenmiştir. Ang II ligandı inaktif benzeri AT2R'ye bağlandığında ise Apo-AT2R'ye kıyasla ECL1, ECL2 ve ICL3 kısımlarında iletişim eğilimlerinin azaldığı, ICL2 kısmında arttığı ve ICL1 kısmında bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

Aktif durumda Apo-AT2R için etkileşim haritası incelendiğinde ise ligand bağlanmadığı durumda reseptörün ECL2, ICL1, ICL2, ICL3 ve Heliks 8 kısımlarında iletişim eğilimlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Ang 1-7 ligandı aktif benzeri AT2R'ye

bağlandığında Apo-AT2R'ye kıyasla ICL2, ICL3 ve Heliks 8 kısımlarında iletişim eğilimlerinin azaldığı, ICL1 kısmında arttığı ve ECL2 kısmında bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Ang II ligandı aktif benzeri AT2R'ye bağlandığında ise Apo-AT2R'ye kıyasla Heliks 8 kısmında iletişim eğilimlerinin azaldığı, ICL1 kısmında arttığı fakat bu artışın Ang 1-7 bağlanmasına kıyasla daha az olduğu, ECL2, ICL2 ve ICL3 kısımlarında ise bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

MAS reseptörüne inaktif ve aktif benzeri durumda ligand bağlanmadan önce ve sonra reseptöre ait rezidü çiftlerinin ikili etkileşimleri için yapılan iletişim eğilimi analiz sonuçlarına ait etkileşim haritaları Şekil 4.19'da verilmiştir.



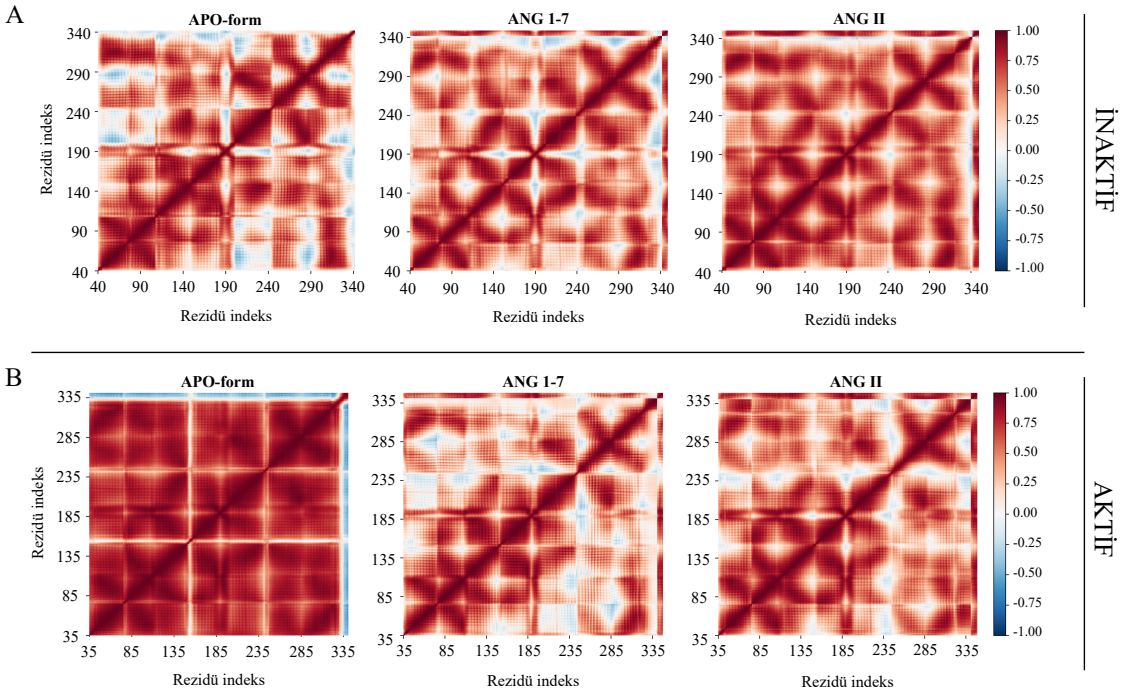
Şekil 4.19. MAS reseptörü için CP analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ait CP değişim haritaları.

İnaktif benzeri durumda Apo-MAS için etkileşim haritası incelendiğinde ligand bağlanmadığı durumda reseptörün ECL1 ve ECL2 kısımlarında iletişim eğilimlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Ang 1-7 ligandı inaktif benzeri MAS reseptörüne bağlandığında ise Apo-MAS'a kıyasla ECL1 ve ECL3 kısımlarında iletişim eğilimlerinin azaldığı, ECL2 ve Heliks 8 kısımlarında arttığı ve ICL3 kısmında bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

Aktif benzeri durumda Apo-MAS için etkileşim haritası incelendiğinde ligand bağlanmadığı durumda reseptörün ECL1, ECL2, ECL3, ICL3 ve Heliks 8 kısımlarında iletişim eğilimlerinin varlığı görülmüştür. Ang 1-7 ligandı aktif benzeri MAS reseptörüne bağlandığında Apo-MAS'a kıyasla bu kısımların tümünde iletişim eğilimlerinin azaldığı belirlenmiştir.

4.2.3. DCC Analizleri

AT2R'ye inaktif ve aktif benzeri durumda ligand bağlanmadan önce ve sonra reseptöre ait rezidü çiftlerinin ikili etkileşimleri için yapılan dinamik çapraz korelasyon analiz sonuçlarına ait etkileşim haritaları Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. AT2R için DCC analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait DCC değişim haritaları.

Ligand bağlı olmadığı inaktif benzeri Apo-AT2R için 1000 ns simülasyon boyunca reseptörün TM heliksleri ve bu heliksleri birbirine bağlayan bileşenlerin karşılıklı ve iç korelasyonları incelendiğinde TM1-TM5, TM1-ICL3, TM1-ECL3, TM2-TM5, TM2-ICL3, TM2-ECL3, TM5-TM7 ve ECL3-TM7 arasındaki karşılıklı korelasyonlar Ang 1-7 bağlandığında artmış, Ang II bağlandığında ise Ang 1-7'ye kıyasla daha da artmıştır. TM3-ECL2, TM5-ECL2, ICL3-ECL2 ve ECL3-ECL2 karşılıklı korelasyonlar ise Ang 1-7 bağlandığında azalmasına rağmen, Ang II bağlandığında artmıştır. Ayrıca TM1, TM2, TM3 ve TM6'nın Heliks 8 ile korelasyonları da Ang 1-7 bağlanmasıyla azalmış fakat Ang II bağlanmasıyla artmıştır.

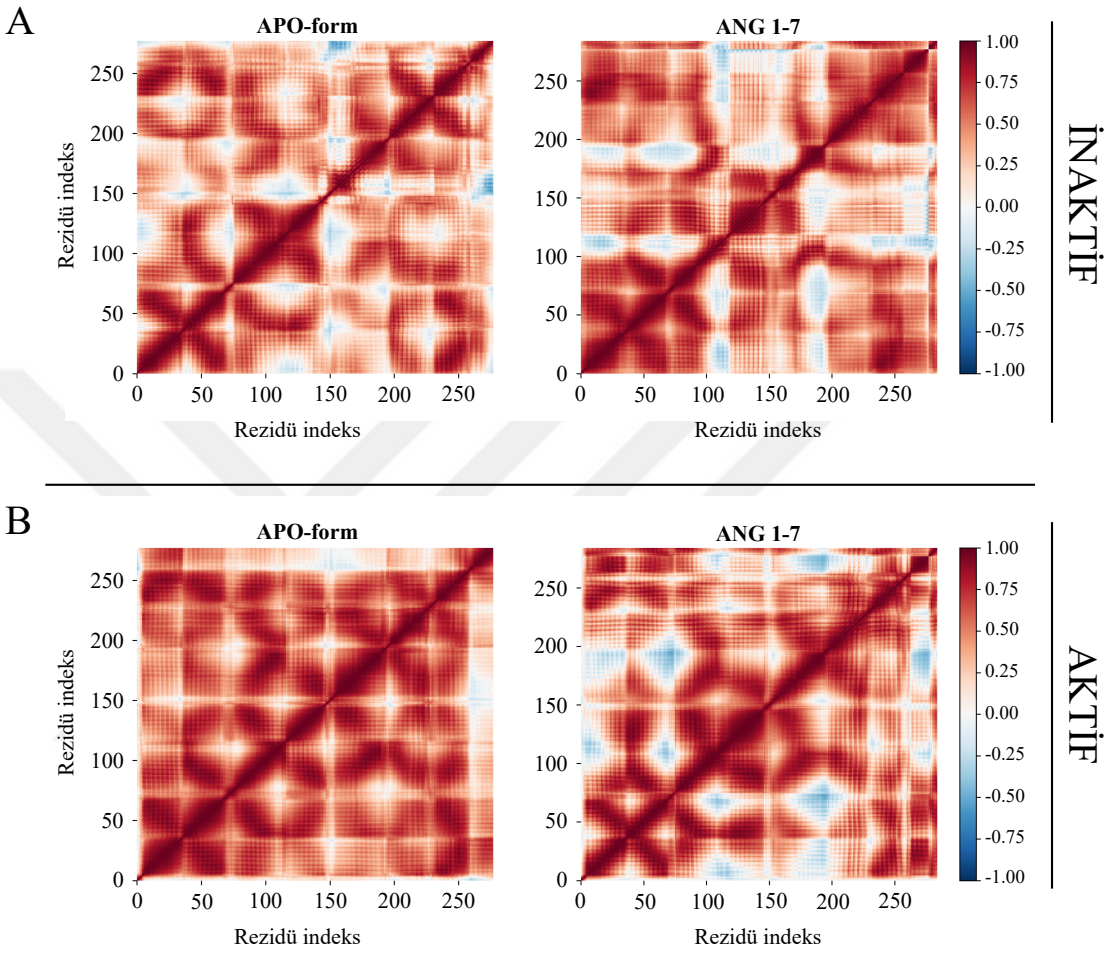
Aktif benzeri Apo-AT2R için MD simülasyonlar boyunca reseptörün TM heliksleri ve bu heliksleri bağlayan bileşenlerinin karşılıklı ve iç korelasyonları incelendiğinde; Apo durumda reseptörün tüm bileşenlerinin birbirleriyle çok yüksek bir korelasyona sahip olduğu görülmüştür. Ang 1-7 bağlanmasıyla TM1-TM3, TM1-TM5, TM1-TM6, TM1-ICL3, TM1-ECL3, TM2-TM5, TM2-ICL3, TM3-ECL3, TM5-ECL3, TM4-ICL3, ECL2-ICL3, ECL3-TM7 ve ICL3-TM6 arasındaki karşılıklı korelasyonlarda bir azalma görülürken Ang II bağlanmasıyla da TM1-TM5, TM1-TM6, TM2-TM5, TM4-TM5, ECL2-TM5, TM5-TM6, TM5-Heliks8 ve TM6-Heliks8 arasındaki karşılıklı korelasyonlarda bir azalma görülmüştür.

MAS reseptörüne inaktif ve aktif benzeri durumda ligand bağlanmadan önce ve sonra reseptöre ait rezidü çiftlerinin ikili etkileşimleri için yapılan dinamik çapraz korelasyon analiz sonuçlarına ait etkileşim haritaları Şekil 4.21'de verilmiştir.

İnaktif benzeri Apo-MAS için 1000 ns simülasyon boyunca reseptörün TM heliksleri ve bu heliksleri bağlayan bileşenlerinin karşılıklı ve iç korelasyonları incelendiğinde Ang 1-7 bağlanmasıyla TM1-TM6 ve ECL3-TM6 arasındaki karşılıklı korelasyonlar ile TM1, TM2, TM6 ve TM7'nin iç korelasyonlarının arttığı, TM1-TM3, TM1-TM5, TM2-TM3, TM2-TM5, TM4-TM5, TM3-TM6 ve TM3-TM7 arasındaki karşılıklı korelasyonların ise azaldığı görülmüştür.

Aktif benzeri Apo-MAS için MD simülasyon boyunca reseptörün TM heliksleri ve bu heliksleri bağlayan bileşenlerinin karşılıklı ve iç korelasyonları incelendiğinde ise; Apo

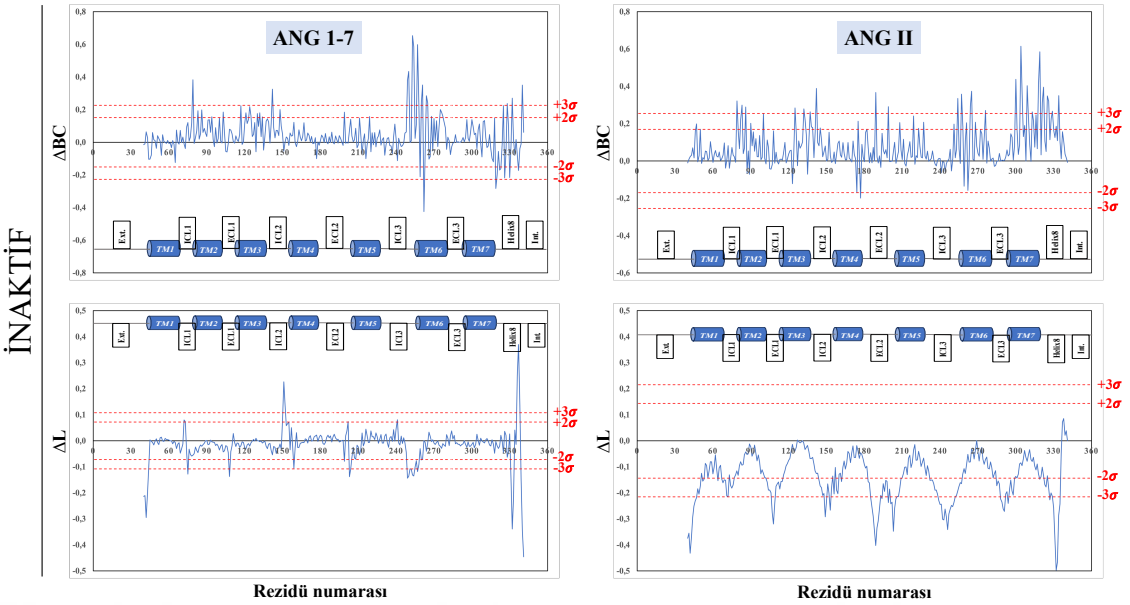
durumda reseptörün tüm bileşenlerinin TM4-TM7 arasındaki korelasyonlar hariç birbirleriyle çok yüksek bir korelasyona sahip olduğu görülmüştür. Ang 1-7 bağlanmasıyla TM1-TM3, TM1-TM5, TM2-TM3, TM2-TM5, TM4-TM5, TM3-TM6 ve TM3-TM7 arasındaki karşılıklı korelasyonlarda bir azalma belirlenmiştir.



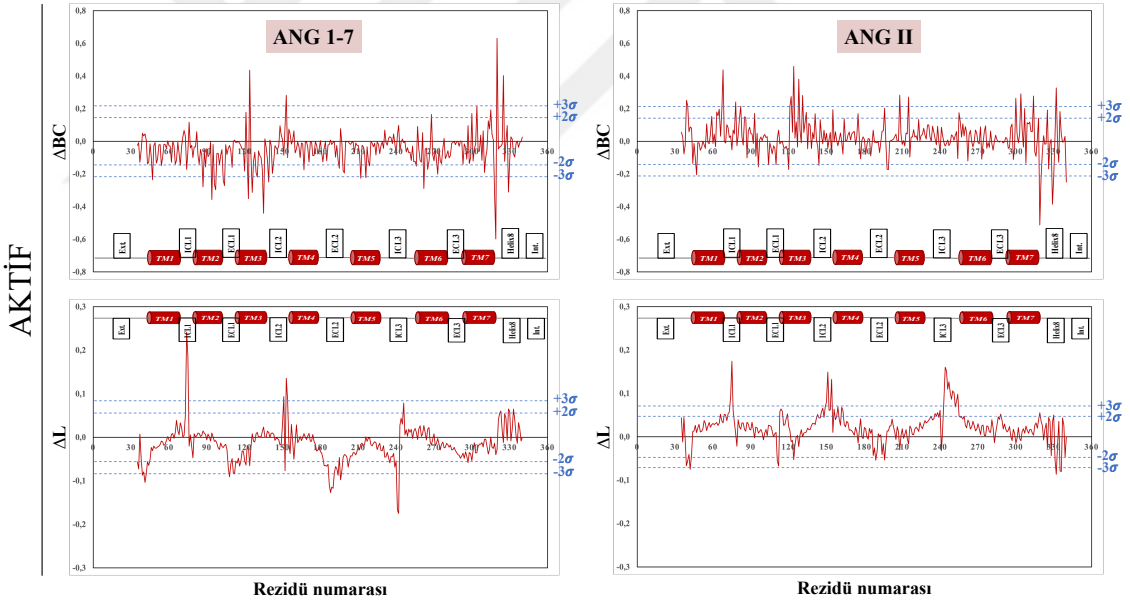
Şekil 4.21. MAS reseptörü için DCC analizleri. A) İnaktif durumda, B) aktif durumda Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ait DCC değişim haritaları.

4.2.4. DRIN Analizleri

Ang 1-7 ve Ang II'nin AT2R'ye inaktif ve aktif benzeri durumlarda bağlanmasının reseptör dinamiğine ve sinyal mekanizmasına etkisini belirlemek için hesaplanan ΔBC ve ΔL grafikleri Şekil 4.22 ve 4.23'te gösterilmektedir. Ang 1-7 ve Ang II bağlanması üzerine ortalama BC ve L değerlerinde önemli bir artış/azalma olan rezidüler sırasıyla Tablo 4.5 ve 4.6'da listelenmiştir.



Şekil 4.22. İnaktif durumda AT2R için DRIN analizleri. İnaktif benzeri AT2R'ye Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanması durumda ΔBC ve ΔL değişim grafikleri.



Şekil 4.23. Aktif durumda AT2R için DRIN analizleri. Aktif benzeri AT2R'ye Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanması durumda ΔBC ve ΔL değişim grafikleri.

İnaktif yapıya Ang 1-7 bağlanması özellikle hücre içi ilmek bölgelerindeki rezidüler ile TM6 sarmalının BC ve L değerlerinin ligand bağlanmasına yanıt olarak en çok değişikliğe uğradığını göstermektedir. Ang 1-7 bağlanması inaktif yapıdaki reseptörün ICL1, ICL2, ICL3 ilmekleri, TM6 sarmalı ve Heliks 8'in sinyallemedeki rolünü önemli ölçüde artırırken (+ΔBC), ICL2 hariç diğer bileşenlerin ΔL değerleri negatiftir. Ang 1-7 bağlanmasına yanıt olarak reseptörün TM6 dışındaki tüm TM sarmallarının BC ve L değerlerinde ise önemli derecede bir değişiklik yok gibi görünmektedir.

Ang 1-7 bağlanmasına kıyasla Ang II'nin inaktif yapıya bağlanması tüm ilmek bölgelerindeki rezidüler ile tüm TM sarmallarının BC ve L değerlerinin ligand bağlanmasına yanıt olarak değişikliğe uğradığını göstermektedir. Ang II bağlanması inaktif yapıdaki reseptörün bütün ilmek bölgeleri ve TM sarmallarının sinyalizasyondaki rolünü önemli ölçüde artırırken (+ΔBC), bütün ΔL değerleri negatiftir.

Tablo 4.5. Ang 1-7 bağlanma durumunda hem artan hem de azalan BC ve ortalama L için AT2R rezidülerinin listesi.

	Standart sapma	BC'de önemli bir artışa sahip rezidüler	BC'de önemli bir azalışa sahip rezidüler	Ortalama L değerinde önemli bir artışa sahip rezidüler	Ortalama L değerinde önemli bir azalışa sahip rezidüler
İNAKTİF	±3σ	SER79, **ARG142**, ILE249, THR250, GLN253, VAL254, MET257, ALA260, VAL261, ALA264, **PHE265**, LYS328, VAL332, LEU340	VAL262, **CYS319**	LEU151, SER152, PRO336, ILE337, THR338	SER40, ASP41, LYS42, HIS43, PRO75, TYR108, LYS203, TYR204, ILE249, THR250, ASP252, GLN253, VAL254, MET257, SER331, VAL332, PHE333, TRP339, LEU340, GLN341
	±2σ	ILE83, LEU86, LEU94, TYR103, CYS117, GLY121, LEU124, THR125, ALA130, **ILE132**, PHE134, TYR148, PHE199, GLY219, ALA258, **CYS268**, LEU275, THR276, PHE277, PHE325	ALA259, PHE320, GLY322, ASN323, GLN326, ARG330, ILE337	GLN72, LYS73, PHE150, GLU202, THR241	LEU44, GLN159, PHE199, ARG251, LEU255, LYS256, ALA258, ALA260
AKTİF	±3σ	LEU124, GLN153, ILE304, PHE320, PHE325	ILE47, ALA87, LEU94, THR96, LEU97, TYR103, TYR104, PHE123, LEU126, ALA130, ILE135, SER139, ALA212, ASN216, VAL262, **TYR318**, **CYS319**, LEU329	GLY74, PRO75, LEU151, GLN153, ARG154	PRO39, ASP41, LYS42, TYR108, PHE112, ILE187, GLU188, TYR189, LEU190, ALA194, ILE196, THR241, ASN242
	±2σ	GLY121, **CYS268**, LEU300, **PRO315**	ILE54, PHE69, GLY74, ALA89, TRP110, PHE120, PHE129, PHE134, **ARG142**, VAL167, CYS195, ALA198, PHE199, GLY219, LYS256, **PHE265**, HIS273, ASN310	LYS246, ASN323, LEU329, ARG330, PHE333	CYS35, SER36, SER40, HIS43, LEU44, ARG107, ASP109, LEU111, PRO114, MET116, GLY121, LEU124, SER152, ASP183, VAL184, ARG185, THR186, GLY191, VAL192, ASN193, MET197, GLU202, ARG235, LEU239, ASP297

Tablo 4.6. Ang II bağlanma durumunda hem artan hem de azalan BC ve ortalama L için AT2R rezidülerinin listesi.

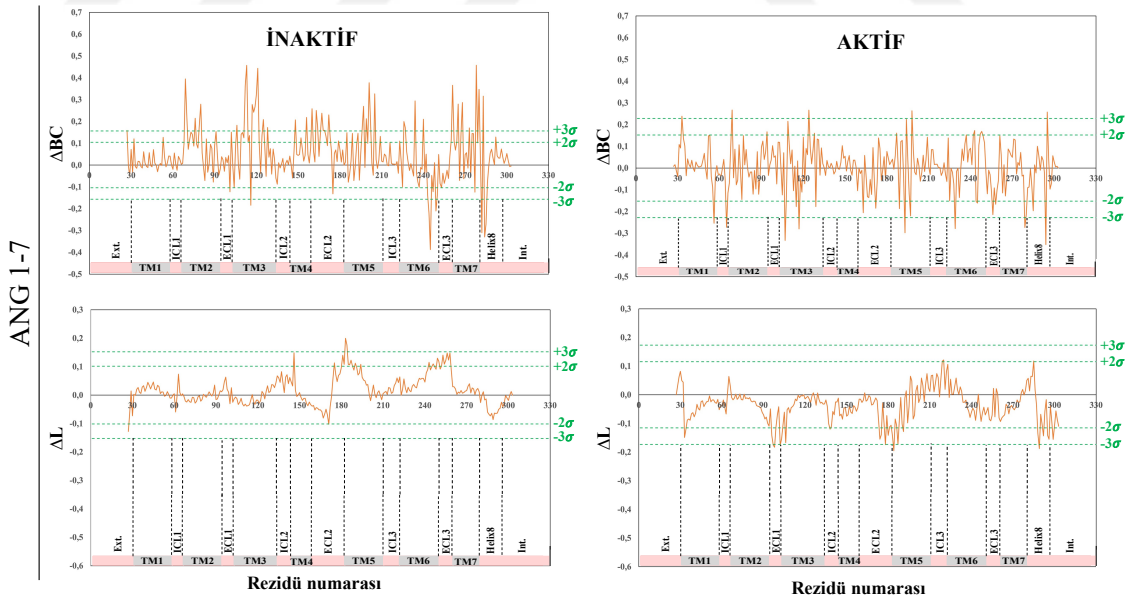
	Standart sapma	BC'de önemli bir artışa sahip rezidüler	BC'de önemli bir azalışa sahip rezidüler	Ortalama L değerinde önemli bir artışa sahip rezidüler	Ortalama L değerinde önemli bir azalışa sahip rezidüler
İNAKTİF	±3σ	SER79, ILE83, LEU86, THR125, **ILE132**, CYS137, **ARG142**, TYR189, PHE199, VAL254, MET257, ALA264, **PHE265**, THR276, LEU300, ILE304, LEU305, THR309, VAL313, **TYR318**, CYS319, VAL321, GLY322, PHE325, GLN326, LEU329, ARG334	NONE	NONE	SER40, ASP41, LYS42, HIS43, LEU44, ASP45, ALA46, ILE47, GLN72, ARG107, TYR108, ASP109, PRO149, PHE150, GLN153, ARG185, THR186, ILE187, GLU188, TYR189, LEU190, GLY191, VAL192, ALA194, PHE199, PRO201, GLU202, LYS203, TYR204, ALA205, LEU239, LYS240, THR241, ASN242, SER243, TYR244, GLY245, LYS246, ASN247, ARG248, ILE249, THR250, ARG251, ASN288, SER289, CYS290, GLU291, ALA294, GLN327, ARG330, SER331, VAL332, PHE333, ARG334, VAL335
	±2σ	ILE47, LEU50, TYR82, **ASP90**, TRP100, PHE133, MET138, SER139, SER145, SER175, ARG182, SER208, GLY219, **PRO223**, ILE227, ARG251, ALA258, VAL261, **CYS268**, GLY307, ASN310, **ASN314**, **PHE316**, LYS328, VAL332	SER174, PRO177	NONE	PRO48, ILE49, LEU50, TYR52, ILE53, VAL64, TYR67, LEU68, PHE69, CYS70, CYS71, GLY74, PRO75, LYS76, TYR103, TYR104, SER105, TYR106, TRP110, LEU111, PHE112, GLY113, PRO114, VAL115, GLN144, SER145, VAL146, ILE147, TYR148, LEU151, SER152, ARG154, ASN156, TRP158, GLN159, TYR162, ASP183, VAL184, ASN193, CYS195, ILE196, MET197, ALA198, PRO200, GLN206, TRP207, SER208, ALA209, PHE232, GLY233, ILE234, ARG235, LYS236, HIS237, LEU238, ASP252, GLN253, VAL254, LEU255, LYS256, MET257, GLY285, VAL286, ILE287, VAL292, ILE293, VAL295, ILE296, ASP297, LEU298, ALA299, **CYS319**, ASN323, ARG324, GLN326, LYS328, LEU329
AKTİF	±3σ	PRO39, SER40, LEU68, VAL78, TYR82, GLY121, SER122, LEU124, **MET128**, SER131, SER208, LYS215, LEU300, ILE304, **ASN314**, VAL332	**CYS319**, PHE320, LEU329, ARG330, LEU340	GLY74, PRO75, PHE150, LEU151, ARG154, SER243, TYR244, GLY245, LYS246, ASN247, ARG248, ILE249, THR250, ARG251, GLN253, VAL254	LYS42, VAL332, VAL335, PRO336
	±2σ	PHE59, ILE63, VAL64, VAL65, THR67, ILE81, ASN85, LEU86, LEU93, PHE134, **ASP141**, ARG155, SER175, ILE196, LEU255, GLY307, PHE325, VAL335	ILE47, THR96, TYR104, TRP110, PHE120, GLN144, ALA198, PHE199, GLN326	VAL66, PHE69, CYS70, GLN72, LYS73, GLY113, PRO114, VAL115, VAL119, TYR143, VAL146, ILE147, PRO149, SER152, GLN153, ASN156, GLN159, TYR162, ILE163, LYS236, HIS237, LEU238, LYS240, ASP252, ASN288, **CYS319**, ARG330	PRO39, SER40, LEU111, PHE112, LEU124, TYR189, ILE196, SER331

Aktif yapıya Ang 1-7 bağlanması ise reseptörün TM2, TM3, TM7 ve Heliks 8 sarmallarının BC ve L değerlerinin ligand bağlanmasına yanıt olarak en çok değişikliğe uğradığını göstermektedir. Ang 1-7 bağlanması aktif yapıdaki reseptörün TM3, ICL2 ve Heliks 8'in sinyallemedeki rolünü önemli ölçüde artırırken (+ΔBC); TM2, TM3 ve TM7'nin sinyallemesini azaltmaktadır (-ΔBC). ICL1 ve ICL3 ilmeklerinin ΔL değerleri pozitif iken, bunların dışındaki diğer tüm ilmeklerin ΔL değerleri negatiftir. Ang 1-7 bağlanmasına yanıt olarak reseptörün TM3 ve TM7 dışındaki tüm TM sarmallarının BC ve L değerlerinde ise önemli bir değişiklik yok gibi görünmektedir.

Aktif yapıya Ang II bağlanmasına yanıt olarak en büyük değişikliğin TM1, TM3, TM5, TM7 ve Heliks 8 rezidülerinin BC ve L değerlerinde meydana geldiği görülmektedir. Ang II bağlanması aktif benzeri yapıdaki reseptörün TM1, ICL1, TM3, TM5 ve TM7 bileşenlerinin sinyallemedeki rolünü artırırken (+ΔBC), Heliks 8'in sinyallemesini azaltmaktadır (-ΔBC). Ayrıca hücre içi ilmek bölgelerindeki ICL1, ICL2 ve ICL3 rezidülerinin ΔL değerlerinin pozitif olduğu görünmektedir.

Ang 1-7 ligandının inaktif ve aktif benzeri AT2R'ye bağlanmasıyla hem BC hem de L değerlerinde önemli bir artma ve azalma olan rezidüler listelendiğinde inaktif durumda pozitif BC değerlerinin aktif durumdaki bağlanmaya kıyasla daha fazla olduğu bu nedenle sinyalizasyona inaktif durumda daha fazla katkı sağladığı görülmüştür. Benzer olarak aktif durumdaki negatif BC değerlerinin de inaktif durumdaki bağlanmaya kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir.

Ang II ligandının inaktif ve aktif benzeri AT2R'ye bağlanmasıyla hem BC hem de L değerlerinde önemli bir artma ve azalma olan rezidüler listelendiğinde ise inaktif ve aktif durumlarda pozitif BC değerlerinin fazla olması sinyalizasyona katkı sunarken özellikle inaktif durumda negatif L değerlerinin fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.24. MAS reseptörü için DRIN analizleri. Ang 1-7 ligandının inaktif ve aktif benzeri yapıdaki MAS reseptörüne bağlanması durumunda ΔBC ve ΔL değişim grafikleri.

Ang 1-7'nin MAS reseptörüne inaktif ve aktif benzeri durumlarda bağlanmasının reseptör dinamiğine ve sinyal mekanizmasına etkisini belirlemek için hesaplanan ΔBC ve ΔL grafikleri Şekil 4.24'te gösterilmektedir. Ang 1-7 bağlanması üzerine ortalama BC ve L değerlerinde önemli bir artma/azalma olan rezidüler Tablo 4.7'te listelenmiştir.

Tablo 4.7. Ang 1-7 bağlanması durumunda hem artan hem de azalan BC ve ortalama L için MAS rezidülerinin listesi.

	Standart sapma	BC'de önemli bir artışa sahip rezidüler	BC'de önemli bir azalışa sahip rezidüler	Ortalama L değerinde önemli bir artışa sahip rezidüler	Ortalama L değerinde önemli bir azalışa sahip rezidüler
İNAKTİF	±3σ	ASN27, TYR69, ILE70, ALA76, SER79, LEU80, VAL106, **PHE112**, LEU113, ASN117, THR118, **GLY119, LEU120, TYR121,** ALA125, VAL128, GLN148, LEU156, SER160, VAL163, THR164, GLU167, TYR168, VAL169, ILE172, PHE196, LEU197, PHE199, **PRO201**, LEU202, VAL205, LEU226, TYR227, **ILE234**, **PHE240**, LEU261, SER265, PHE268, SER273, **PHE278**, **TYR280**, VAL283	TYR116, MET244, ARG245, LEU249, PHE282, GLY284, SER285	ASP183, CYS184	NONE
	±2σ	ILE32, LEU53, HIS72, LEU73, SER74, ILE84, TYR91, TYR102, VAL110, THR111, PHE114, GLY115, LEU122, THR124, VAL152, MET166, MET170, ASP173, HIS179, ARG185, ILE189, ILE193, ILE209, SER223, ASN260, HIS262, ILE264, LEU267, ALA275, **ASN276**, LYS292	HIS101, GLU175, **PRO243**, LEU247, LEU250, **PRO277**	LYS146, **GLU175**, ARG181, ASN182, ARG185, ALA186, VAL187, ILE188, PHE190, LEU194, **PRO243**, LEU246, LEU249, LEU250, TYR252, GLU253, TYR254, TRP255, SER256, THR257, PHE258	ASN27, CYS171
AKTİF	±3σ	PRO33, TYR69, THR124, VAL198, LEU295	PHE56, PRO65, THR107, ASN117, ILE193, VAL229, **ILE279**, SER294	NONE	LEU97, SER98, TYR102, SER178, CYS184, LYS289
	±2σ	ASP94, SER109, VAL128, VAL187, LEU194, **PRO243**, LEU247, **TYR248**	GLY115, GLU129, VAL163, ILE172, ILE189, LEU197, MET244, **ARG245**, SER256, PHE258, **TYR280**, SER285	TRP219, ALA220, SER285	PRO33, ILE34, GLU96, TYR103, VAL106, ILE138, ARG174, GLU175, SER180, ASP183, VAL187, ILE191, LYS288, LYS292, LEU295, LYS296, LEU299.

İnaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanması reseptörün TM1 ve ICL1 hariç tüm bileşenlerinin BC ve L değerlerinin ligand bağlanmasına yanıt olarak en çok değişikliğe uğradığını göstermektedir. Ang 1-7 bağlanması inaktif yapıdaki reseptörün TM2, TM3, ECL2, TM5, TM6 ve TM7'nin sinyallemedeki rolünü önemli ölçüde artırırken (+ΔBC); TM6'nın son rezidüleri ile Heliks 8'in sinyallemesini azaltmaktadır (-ΔBC). İnaktif yapıda Ang 1-7 bağlanmasına yanıt olarak sadece TM5 sarmalının ΔL değerleri pozitif iken, bunun dışındaki diğer tüm bileşenlerin ΔL değerlerinde çok fazla değişiklik yok gibi görünmektedir.

İnaktif benzeri yapıya kıyasla, aktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasına yanıt olarak reseptör bileşenlerinin BC ve L değerlerinde daha az değişikliğin meydana geldiği görülmektedir. Ang 1-7 bağlanması aktif benzeri yapıdaki reseptörün TM2, TM3 ve TM5 bileşenlerinin sinyallemedeki rolünü artırırken (+ΔBC); ICL1, TM3, TM5, TM6, TM7 ve Heliks 8'in sinyallemesini azaltmaktadır (-ΔBC). Ayrıca aktif yapıda Ang 1-7 bağlanmasına yanıt olarak reseptör bileşenlerinin ΔL değerlerinde önemli bir değişiklik yok gibi görünmektedir.

Ang 1-7 ligandının inaktif ve aktif benzeri MAS reseptörüne bağlanmasıyla hem BC hem de ortalama L değerlerinde önemli bir artma ve azalma olan rezidüler listelendiğinde inaktif durumda pozitif BC değerlerinin aktif durumdaki bağlanmaya kıyasla daha fazla olduğu bu nedenle sinyalizasyona inaktif durumda daha fazla katkı sağladığı görülmüştür.

4.2.5. PCA Bulguları

AT2R ve MAS reseptörlerinin inaktif ve aktif benzeri yapılarının Apo durumda ve Ang 1-7 ile Ang II ligandlarının bağlı olduğu durumlarda kompleks yapılardaki atomların dalgalanmalarına ait temel bileşen analizleri Şekil 4.25 ve 4.26'da gösterilmiştir.

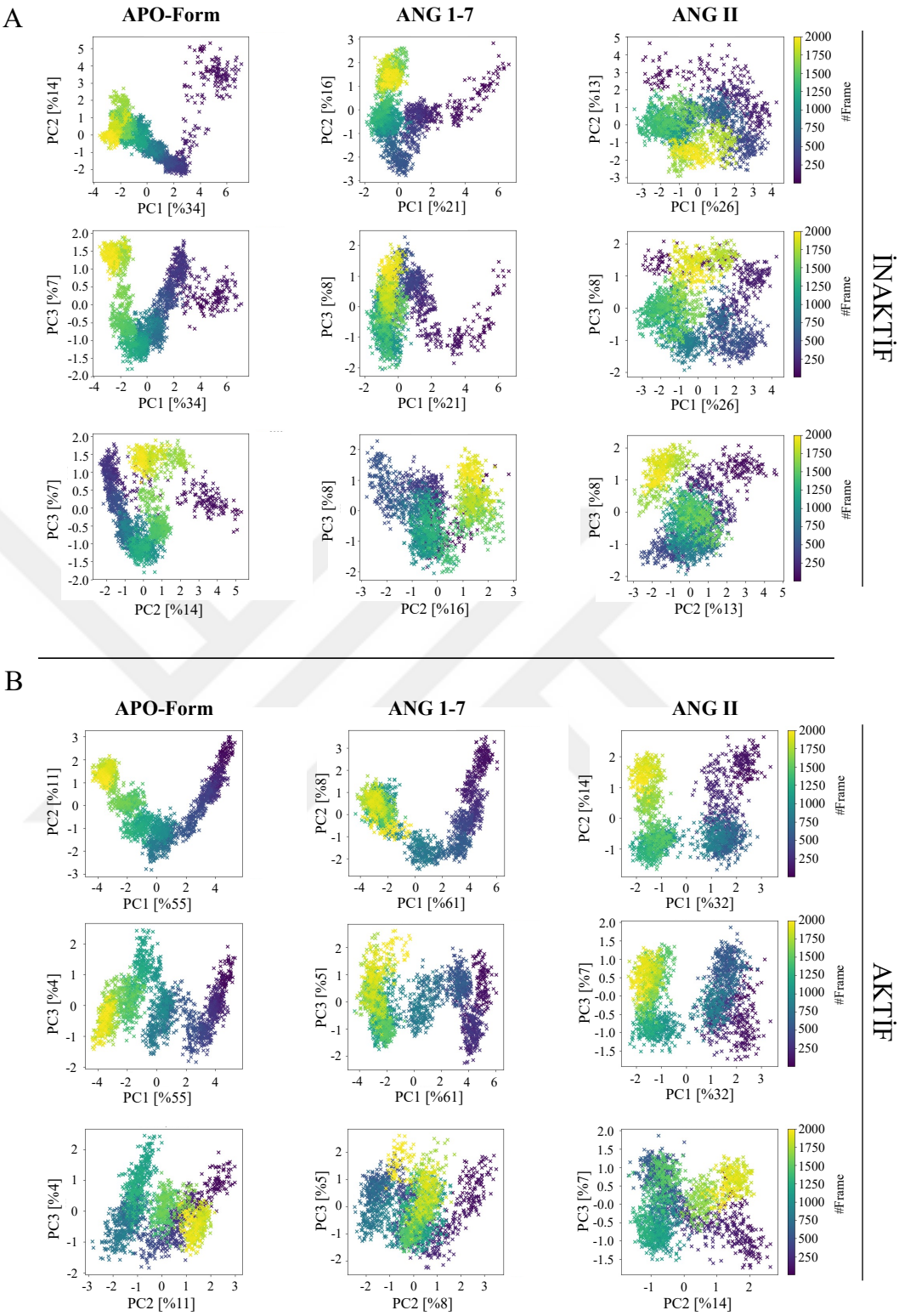
AT2R'nin inaktif benzeri yapısı için temel bileşen analizleri incelendiğinde birinci ana bileşenin (PC1) Apo-AT2R'de (%34) gözlenen yapısal varyasyonların önemli bir bölümünü oluşturduğunu fakat Ang 1-7 (%21) ve Ang II (%26) ligandları bağlandığında yapısal varyasyonların sadece PC1 ile açıklanamayacağını ortaya koymaktadır. İnaktif benzeri yapı için ikinci ana bileşen (PC2), Apo-AT2R'deki varyasyonların %14'ünü, Ang(1-7)-AT2R'de %16'sını ve AngII-AT2R kompleksindeki varyasyonların %13'ünü oluşturmaktadır. Üçüncü ana bileşen (PC3) ise, Apo-AT2R'deki varyasyonların %7'sini, Ang(1-7)-AT2R kompleksinde %8'ini ve AngII-AT2R kompleksinde ise %7'sini açıklar. MD yörüngesi, PC1'e karşı PC2'nin dağılım grafiğinde görüldüğü üzere, AT2R'nin inaktif benzeri yapısı için üç durumu örneklemiştir. Bu örneklemeye göre rezidülerin özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketleri Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda benzer, Ang II bağlı durumda ise farklıdır.

AT2R'nin aktif benzeri yapısı için temel bileşen analizleri incelendiğinde PC1'in Apo-AT2R (%55), Ang(1-7)-AT2R (%61) ve AngII-AT2R'de (%32) gözlenen yapısal

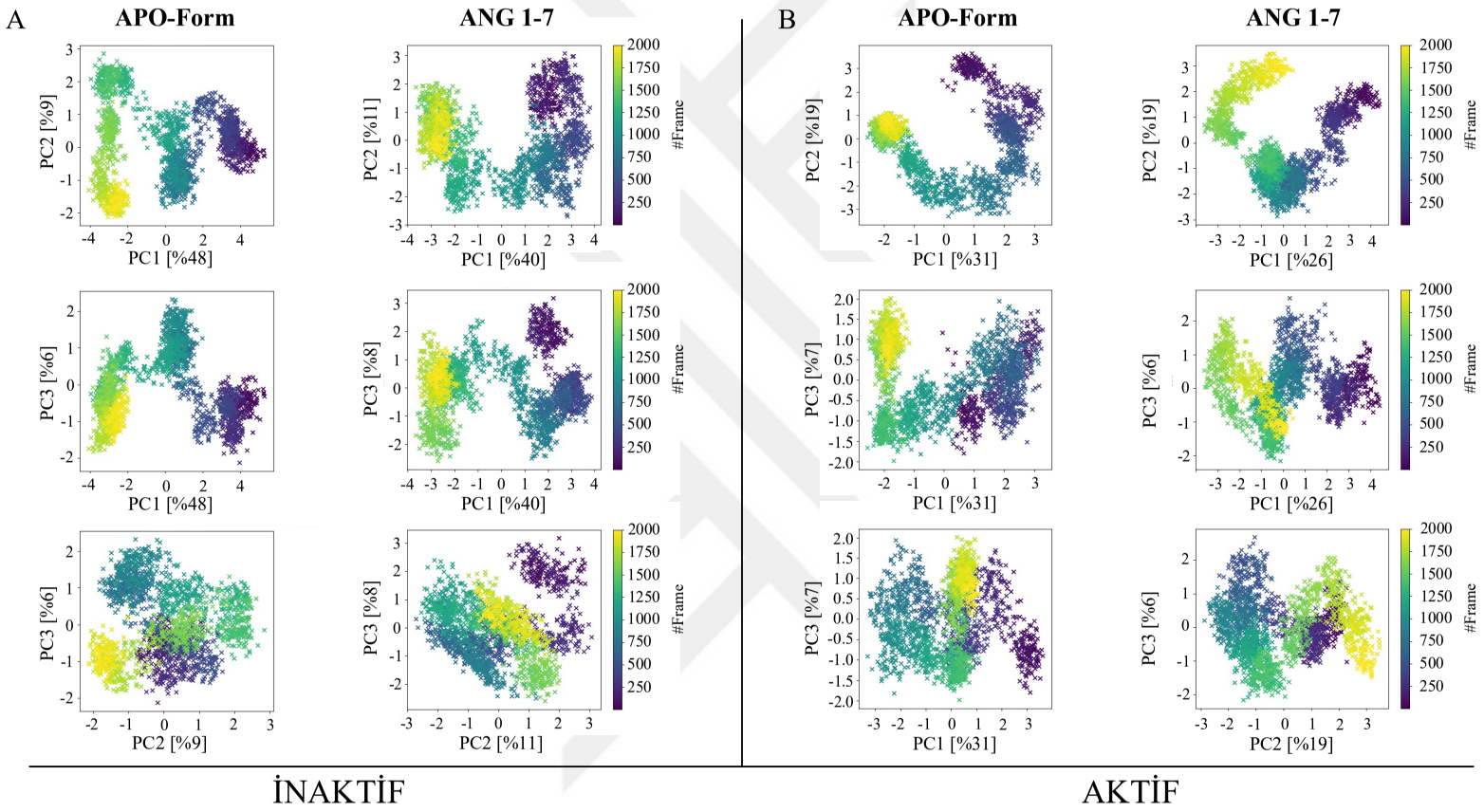
varyasyonların önemli bir bölümünü oluşturduğu görülmektedir. Aktif benzeri yapı için PC2, Apo-AT2R'deki varyasyonların %11'ini, Ang(1-7)-AT2R kompleksinde %8'ini ve AngII-AT2R kompleksinde %14'ünü oluşturmaktadır. PC3 ise, Apo-AT2R'deki varyasyonların %4'ünü, Ang(1-7)-AT2R kompleksinde %5'ini ve AngII-AT2R kompleksinde %7'sini açıklar. MD yörüngesi, PC1'e karşı PC2'nin dağılım grafiğinde görüleceği üzere, AT2R'nin aktif benzeri yapısı için üç durumu örneklemiştir. Bu örneklemeye göre rezidülerin özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketleri Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda benzer, Ang II bağlı durumda ise farklıdır.

MAS reseptörünün inaktif benzeri yapısı için temel bileşen analiz sonuçları, PC1'in, hem Apo-MAS yapısında (%48) hem de Ang (1-7)-MAS kompleksinde (%40) gözlenen yapısal varyasyonların önemli bir bölümünü oluşturduğunu ortaya koymuştur. İnaktif benzeri yapı için PC2, Apo-MAS'taki varyasyonların %9'unu ve Ang(1-7)-MAS kompleksindeki varyasyonların %11'ini oluşturur. PC3 ise, Apo-MAS'taki varyasyonların %6'sını ve Ang (1-7)-MAS kompleksinde %7'sini açıklar. MD yörüngesi, PC1'e karşı PC2'nin dağılım grafiğinde görüldüğü gibi, MAS reseptörünün inaktif benzeri yapısı için iki durumu örneklemiştir. Bu örneklemeye göre Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda rezidülerin özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketlerinin farklı olduğu görülmüştür.

MAS reseptörünün aktif benzeri yapısı için temel bileşen analiz sonuçları ise, PC1'in, hem Apo-MAS' yapısında (%31) hem de Ang (1-7)-MAS kompleksinde (%26) gözlenen yapısal varyasyonların önemli bir bölümünü oluştursa bile yapısal varyasyonların sadece PC1 ile açıklanamayacağını ortaya koymaktadır. Aktif benzeri yapı için PC2, Apo-MAS'taki ve Ang(1-7)-MAS kompleksindeki varyasyonların %19'unu oluşturur. PC3 ise, Apo-MAS'taki varyasyonların %7'sini ve Ang (1-7)-MAS kompleksindeki varyasyonların %6'sını açıklar. MD yörüngesi, PC1'e karşı PC2'nin dağılım grafiğinde görüldüğü üzere, MAS reseptörünün inaktif benzeri yapısı için de iki durumu örneklemiştir. Bu örneklemeye göre inaktif benzeri yapıya benzer şekilde Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda rezidülerin özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketlerinin farklı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.25. AT2R için PCA analizleri. A) İnaktif benzeri durumda ve B) aktif benzeri durumda Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait PC1-PC2, PC1-PC3, PC2-PC3 değişim grafikleri.



Şekil 4.26. MAS reseptörü için PCA analizleri. A) İnaktif benzeri durumda ve B) aktif benzeri durumda Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ait PC1-PC2, PC1-PC3, PC2-PC3 değişim grafikleri.

4.3. Aktivasyon Mekanizması

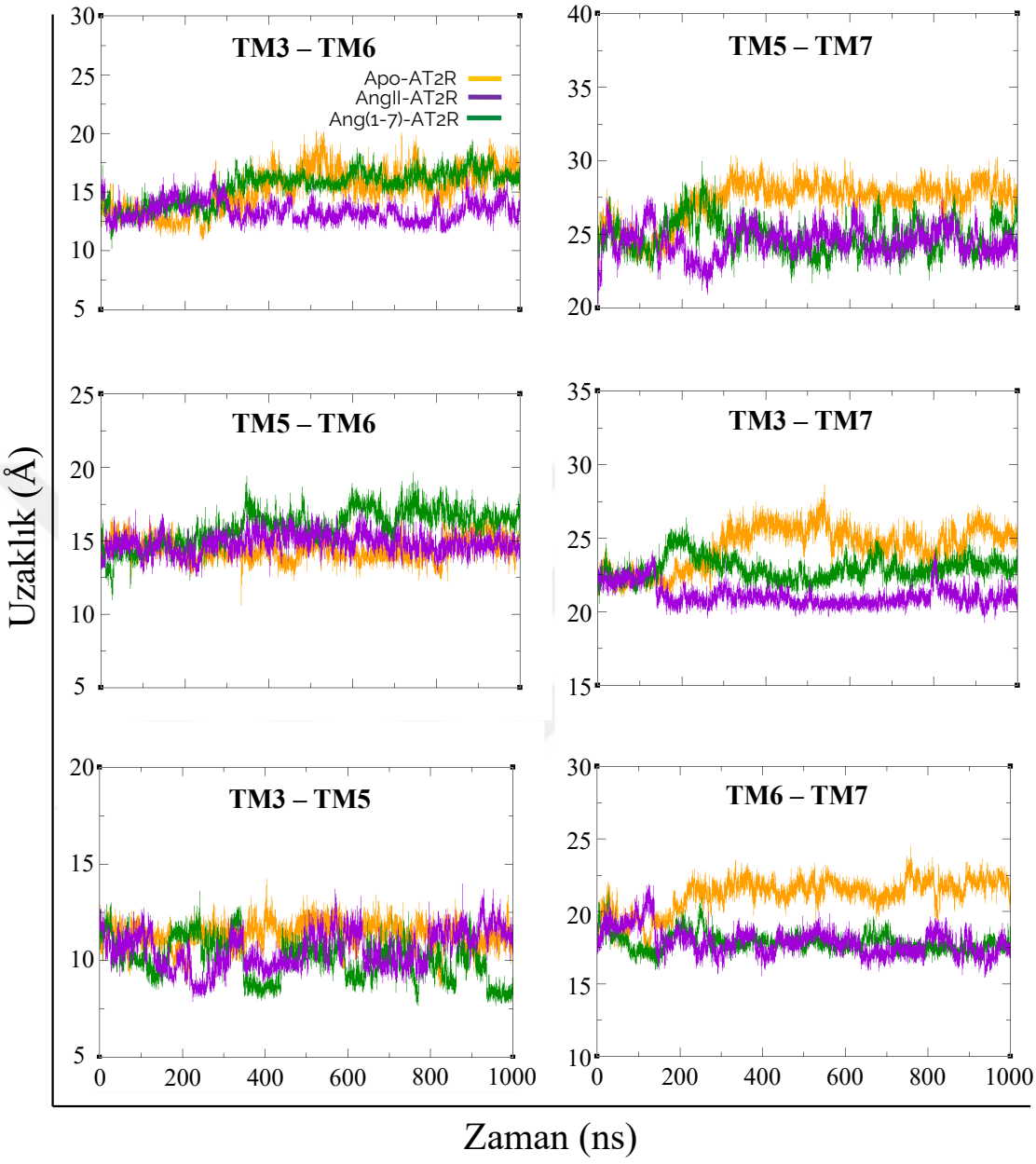
Ligand bağlanmasına dayalı A-sınıfı bir GPCR için genel kabul gören aktivasyon mekanizması, reseptör bileşenlerinin özellikle de hidrofobik kilit olarak adlandırılan TM3-TM6 sarmalları arasındaki hücre içi mesafe değişimleri ile ligand bağlanma bölgesinden başlayarak reseptör aktivasyonunda sinyalizasyona katkı sunan korunmuş mikro-anahtar rezidülerin açısal değişimleri ile açıklanmaktadır.

4.3.1. Hidrofobik-Kilit Analizleri

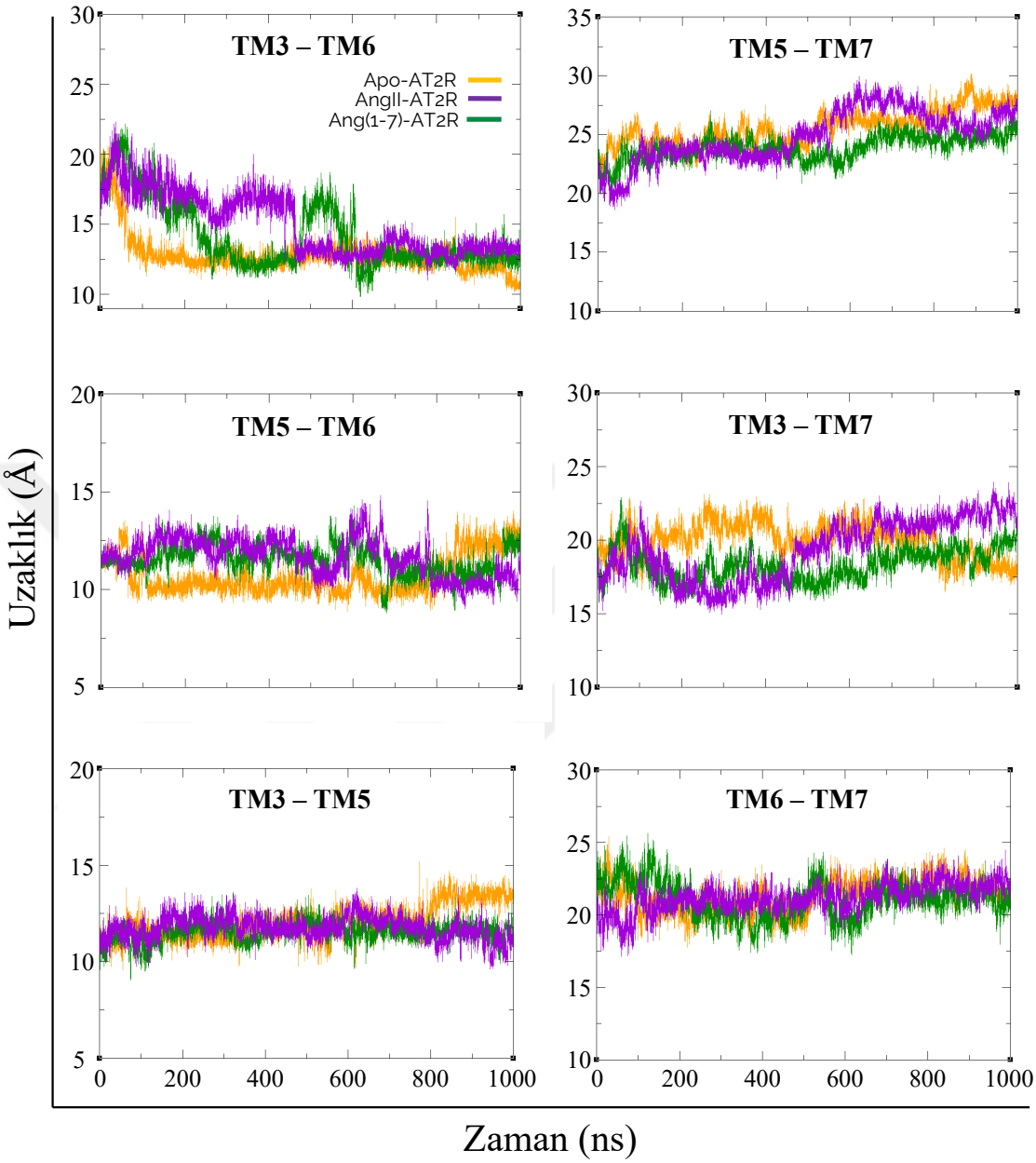
AT2R ve MAS reseptörlerinin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılara ligand bağlandığı ve bağlanmadığı durumlarda TM3, TM5, TM6 ve TM7 bileşenlerinin hücre içi kısımları arasındaki mesafe değişimlerinin analizlerine ait değişimler Şekil 4.27-4.30 grafiklerinde verilmiştir.

Apo durumdaki inaktif benzeri AT2R'ye Ang 1-7 ligandının bağlanmasıyla hücre içi kısımda TM3-TM6 sarmalları arasındaki mesafe ilk 250 ns MD simülasyon boyunca Apo durumdakiyle benzer bir değişim gösterirken 250 ns'den sonra yaklaşık 3 Å kadar bir mesafe artışı görülmüştür. TM3-TM6 arasındaki mesafe 250 ns MD simülasyon boyunca yaklaşık 15 Å civarındayken simülasyonun devamında yaklaşık 18 Å civarındadır ve önemli bir mesafe değişimi gözlenmemiştir. Ang II ligandının inaktif benzeri AT2R'ye bağlanması durumunda ise MD simülasyon boyunca TM3-TM6 sarmalları arasındaki mesafe değişmediği ve 15 Å civarında sabit kaldığı görülmüştür.

İnaktif yapıda diğer TM sarmalları arasındaki mesafe değişimleri incelendiğinde; TM5-TM7 arasında Apo durum için ilk 100 ns'den sonra yaklaşık 5 Å kadar bir mesafe artışı gözlenirken Ang 1-7 ve Ang II bağlı durumda önemli bir mesafe değişimi yoktur. TM5-TM6 arasında Ang II bağlı ve Apo durumda mesafenin değişmediği görülürken, Ang 1-7 bağlı durumda 600 ns'den sonra yaklaşık 2.5 Å kadar bir mesafe artışı görülmüştür. TM3-TM7 arasında ilk 100 ns'den sonra Apo durumda yaklaşık 2.5 Å kadar bir mesafe artışı ve Ang II bağlı durumda yaklaşık 2.5 Å kadar bir mesafe azalışı gözlenirken Ang 1-7 bağlı durumda simülasyon boyunca önemli bir mesafe değişimi görülmemiştir. TM3-TM5 arasında hem Ang 1-7 ve Ang II bağlı durumda hem de Apo durumda önemli bir mesafe değişimi yoktur. TM6-TM7 arasında ise ilk 100 ns'den sonra Apo duruma kıyasla Ang 1-7 ve Ang II bağlanmaları ile yaklaşık 5 Å kadar bir mesafe farkı görülmüştür.



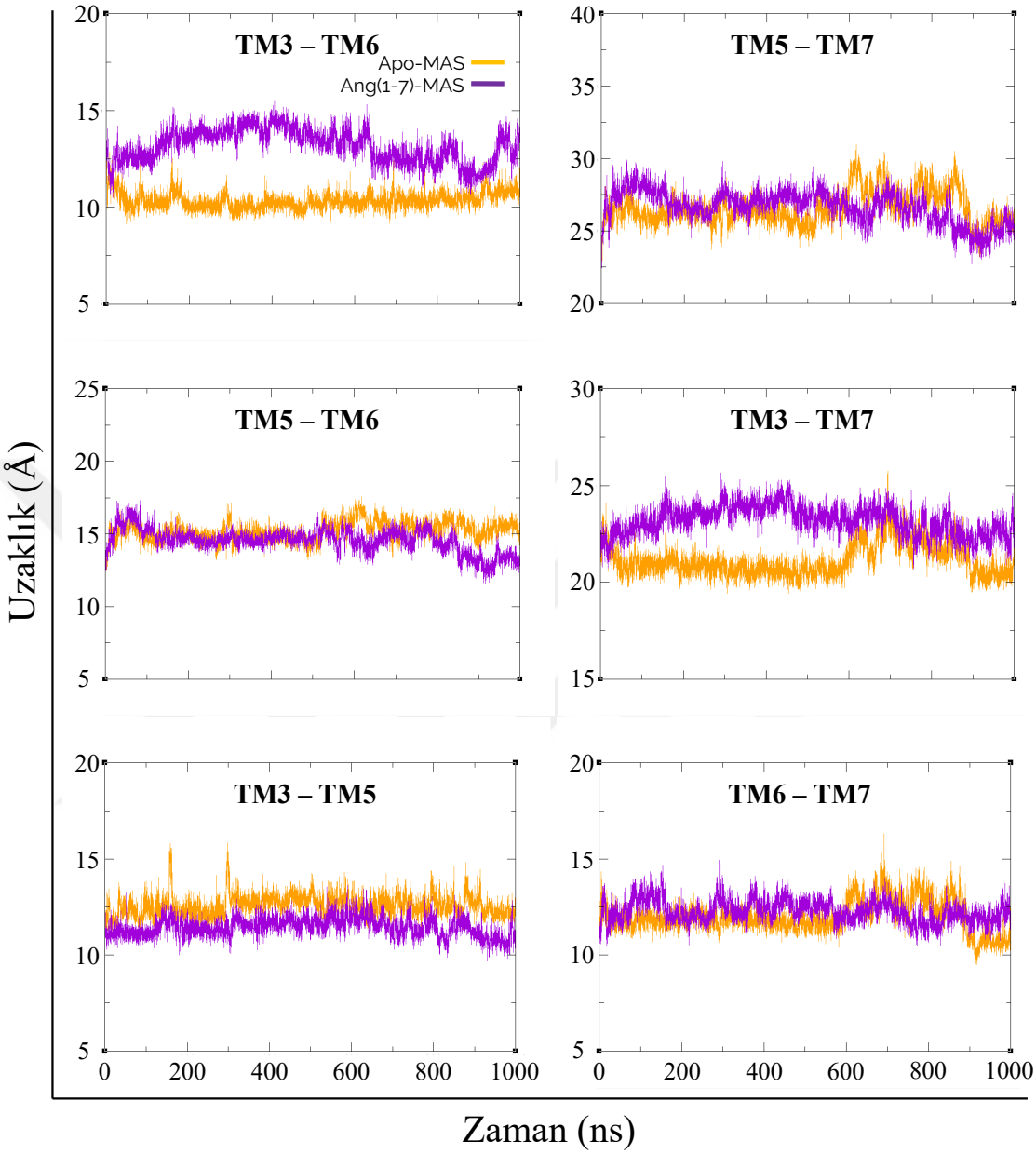
Şekil 4.27. İnaktif benzeri AT2R için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. İnaktif durumda, Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait TM3-TM6, TM5-TM7, TM5-TM6, TM3-TM7, TM3-TM5 ve TM6-TM7 arasındaki hücre içi mesafelerin MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.



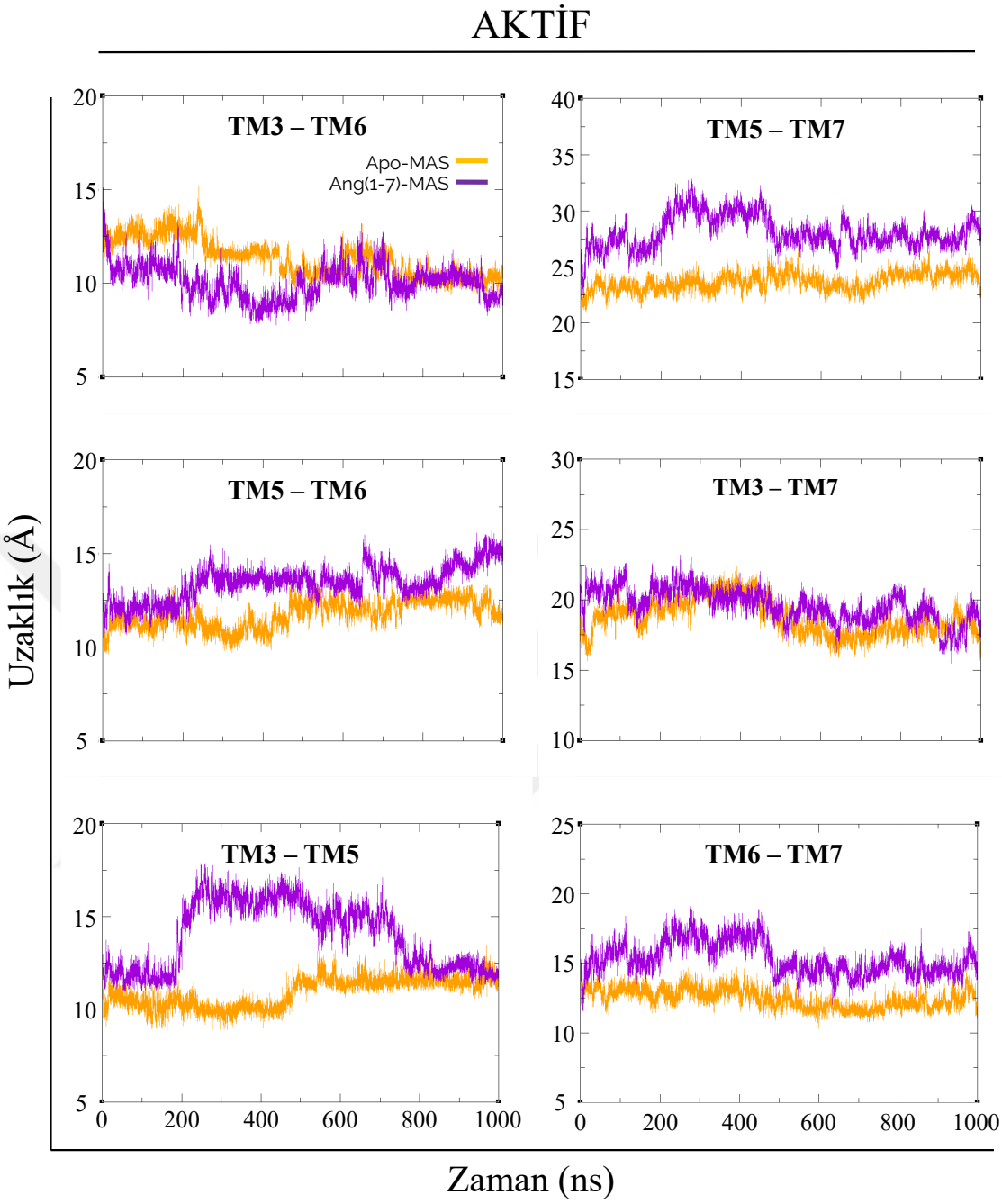
Şekil 4.28. Aktif benzeri AT2R için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. Aktif durumda, Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarına ait TM3-TM6, TM5-TM7, TM5-TM6, TM3-TM7, TM3-TM5 ve TM6-TM7 arasındaki hücre içi mesafelerin MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.

Apo durumdaki aktif benzeri AT2R'nin hücre içi kısımda TM3-TM6 sarmalları arasında ilk 60 ns MD simülasyondan sonra yaklaşık 7.5 Å kadar bir mesafe azalışı görülmüş ve 800 ns'den sonra bu mesafe 2.5 Å kadar daha azalmıştır. Apo durumdakiyle benzer şekilde Ang 1-7 bağlı durumda TM3-TM6 arasında bir mesafe azalışı görülmüş fakat bu azalış 300 ns'den sonra gerçekleşmiştir. 500-600 ns arasında yaklaşık 3-4 Å kadar bir mesafe artışı meydana gelse de simülasyonun devamında 300 ns'den sonraki 7.5 Å mesafeye tekrar ulaşarak bu mesafe değişmemiştir. Ang II bağlı durumda ise TM3-TM6 arasında 500 ns MD simülasyon boyunca başlangıçtaki mesafenin korunduğu görülmüş, 500 ns'den sonra bu mesafe yaklaşık 7.5 Å kadar azalmış ve simülasyonun sonuna kadar da bu mesafe (~12.5 Å) korunmuştur.

Aktif benzeri AT2R yapısında diğer TM sarmalları arasındaki mesafe değişimleri incelendiğinde; TM5-TM7, TM3-TM5 ve TM6-TM7 sarmalları arasında Apo duruma kıyasla Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanma durumlarında önemli bir mesafe değişimi görülmemiştir. TM5-TM6 arasında Apo duruma kıyasla Ang 1-7 ve Ang II ligandları bağlandığında 600 ns MD simülasyon boyunca yaklaşık 2.5 Å kadar bir mesafe artışı görülmüş fakat simülasyonun devamında bu fark ortadan kalkarak Apo durumdaki mesafeye tekrar geri dönmüştür. TM3-TM7 arasında ise 500 ns MD simülasyon boyunca ligand bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla yaklaşık 5 Å kadar bir mesafe azalışı görülmüş fakat simülasyonun devamında mesafe tekrar artmaya başlamış ve mesafe farkı ortadan kalkarak Apo durumdaki mesafeye tekrar geri dönmüştür.



Şekil 4.29. İnaktif benzeri MAS reseptörü için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. İnaktif durumda Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ait TM3-TM6, TM5-TM7, TM5-TM6, TM3-TM7, TM3-TM5 ve TM6-TM7 arasındaki hücre içi mesafelerin MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.



Şekil 4.30. Aktif benzeri MAS reseptörü için hidrofobik-kilit mesafe analizleri. Aktif durumda Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarına ait TM3-TM6, TM5-TM7, TM5-TM6, TM3-TM7, TM3-TM5 ve TM6-TM7 arasındaki hücre içi mesafelerin MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.

Apo durumdaki inaktif benzeri MAS reseptörüne Ang 1-7 ligandının bağlanmasıyla hücre içi kısımda TM3-TM6 sarmalları arasındaki mesafe Apo duruma kıyasla yaklaşık 5 Å kadar artmış ve 700 ns boyunca bu mesafe artışı korunmuştur fakat 700 ns'den sonra bu farkın azalarak Apo durumdaki mesafeye yaklaştığı görülmüştür.

İnaktif benzeri MAS yapısında diğer TM sarmalları arasındaki mesafe değişimleri incelendiğinde; TM5-TM7, TM5-TM6, TM3-TM5 ve TM6-TM7 sarmalları arasında Apo duruma kıyasla Ang 1-7 ligandının bağlanması durumunda önemli bir mesafe değişimi görülmemiştir. TM3-TM7 arasında ise 700 ns boyunca ligand bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla yaklaşık 5 Å kadar bir mesafe artışı görülmüş fakat simülasyonun devamında mesafe tekrar azalmaya başlamış ve mesafe farkı ortadan kalkarak Apo durumdaki mesafeye tekrar geri dönmüştür.

Apo durumdaki aktif benzeri MAS reseptörüne Ang 1-7 ligandının bağlanmasıyla hücre içi kısımda TM3-TM6 sarmalları arasındaki mesafe 600 ns boyunca Apo duruma kıyasla zamanla yaklaşık 7-8 Å kadar azalmış, 700 ns'den sonra bu fark azalarak Apo durumdaki mesafeye ulaşmıştır.

Aktif benzeri MAS yapısında diğer TM sarmalları arasındaki mesafe değişimleri incelendiğinde; TM5-TM7 arasındaki mesafe Apo duruma kıyasla 500 ns boyunca zamanla yaklaşık 7-8 Å kadar artmış, simülasyonun devamında bu fark azalsa bile yaklaşık 5 Å kadar bir mesafe farkı korunmaya devam etmiştir. TM5-TM6 arasında 200 ns MD simülasyon boyunca Apo duruma kıyasla ligand bağlanmasıyla bir mesafe değişimi yokken 200-500 ns arasında yaklaşık 300 ns boyunca yaklaşık 5 Å kadar bir mesafe artışı görülmüş fakat bu fark 500-800 ns arasında ortadan kalkmıştır. 800 ns'den sonra ise yaklaşık 4-5 Å kadar tekrar bir mesafe artışı görülmüştür. TM3-TM7 sarmalları arasında Apo duruma kıyasla Ang 1-7 ligandının bağlanması durumunda ise önemli bir mesafe değişimi görülmemiştir.

Apo durumda aktif benzeri yapı için hücre içi TM3-TM5 sarmalları arasındaki hücre içi mesafe (~10 Å) MD simülasyon boyunca değişmemiştir. Ang 1-7 ligandının bağlanması durumunda ise bu mesafe 200 ns boyunca değişmezken 200-800 ns arasında yaklaşık 5 Å kadar artmış 800 ns'den sonra da azalarak Apo durumdaki mesafeye ulaşmıştır. TM6-

TM7 arasındaki mesafe Apo duruma kıyasla 500 ns boyunca zamanla yaklaşık 5 Å kadar artmış, simülasyonun devamında bu fark azalsa bile yaklaşık 2-3 Å kadar bir mesafe farkı korunmaya devam etmiştir.

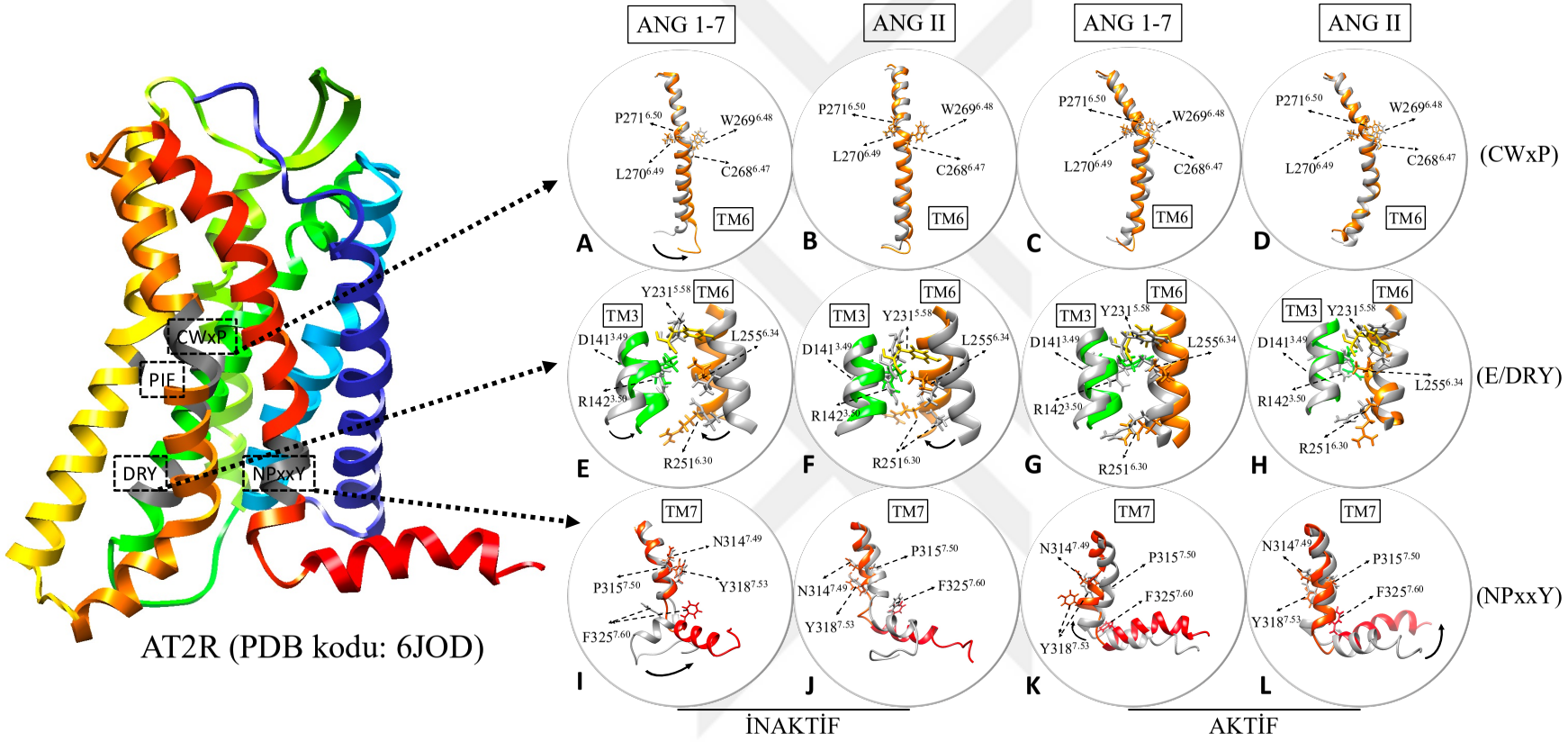
4.3.2. Mikro-Anahtar Motifler ve Dihedral Açıların Analizleri

AT2R'de meydana gelen yapısal dinamik değişimlere ve sinyal iletimiyle aktivasyon mekanizmasına katkıda bulunan, reseptörün korunmuş CWxP, DRY, PIF ve NPxxY gibi mikro-anahtar motiflerinde ligand bağlanmasına dayalı gerçekleşen açısal değişimler Şekil 4.31-4.35 ile gösterilmiştir. İnaktif ve aktif benzeri AT2R yapılarına Ang 1-7 ve Ang II ligandları bağlandığında aktivasyon mekanizmasına aracılık eden motiflerde yapısal bir değişim olup olmadığı MD simülasyonlar boyunca bu motiflerdeki rezidülerin phi (ϕ), psi (ψ) ve chi (χ) dihedral açılarında meydana gelen değişimler incelenerek belirlenmiştir. Şekil 4.31'de AT2R'ye ait mikro-anahtar motifler ile Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmaları durumunda CWxP, DRY ve NPxxY motiflerinde meydana gelen yapısal değişimler gösterilmiştir.

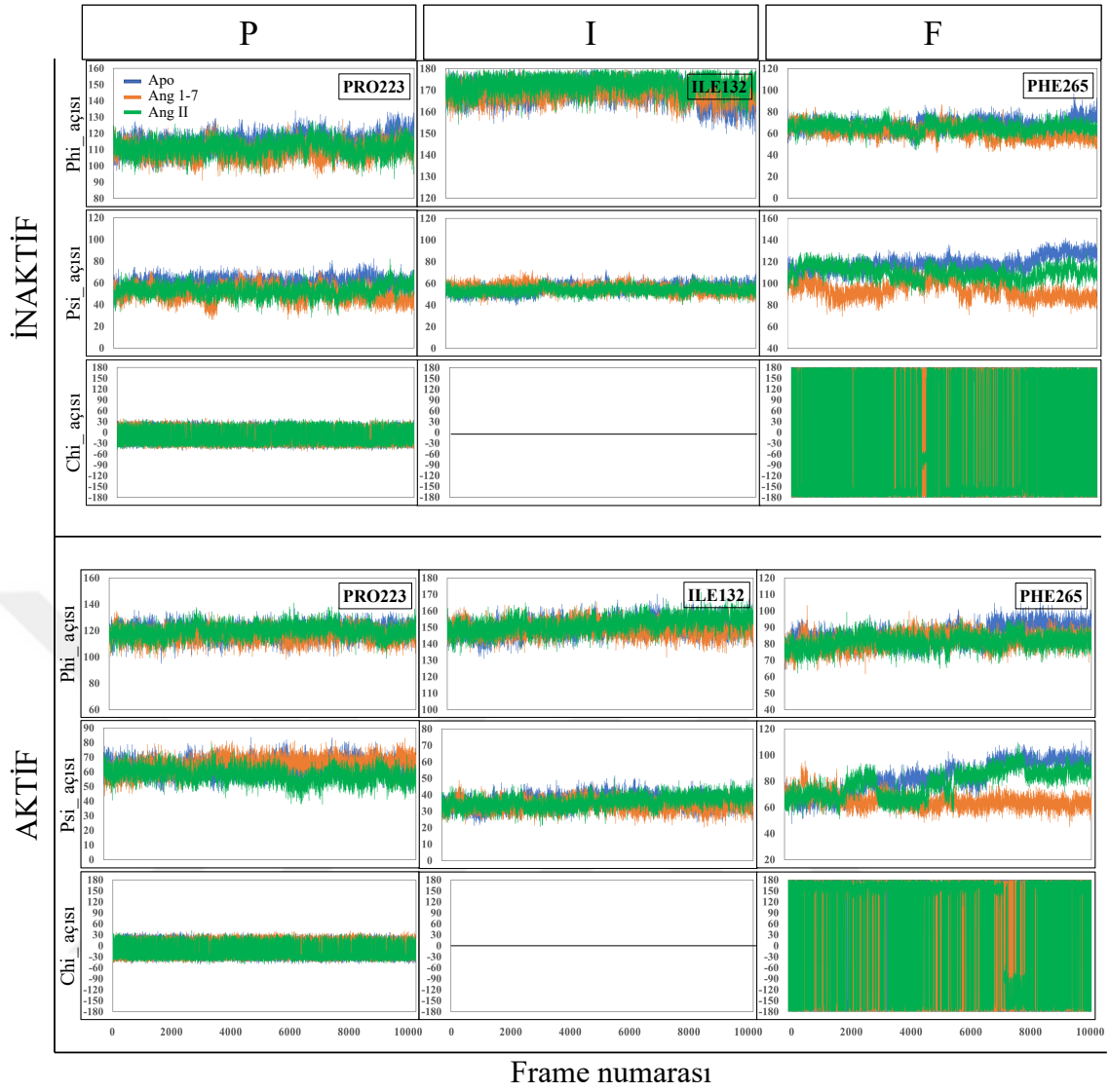
AT2R'deki PIF motifinin dihedral açıları Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlı olduğu durumda ve ligand bağlı olmayan Apo durumda incelendiğinde; PIF motifini oluşturan rezidülerden PRO223 ve ILE132'nin phi, psi ve chi açılarında MD simülasyon boyunca önemli bir açısal değişim görülmemiştir. PHE265 rezidüsünün ise phi ve chi açılarında hem aktif hem de inaktif benzeri yapılarda MD simülasyon boyunca açısal bir değişim görülmezken psi açısında inaktif benzeri yapıya Ang II bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla yaklaşık 10^{o} ve Ang 1-7 bağlanmasıyla da yaklaşık 30^{o}'lik bir açısal değişim meydana geldiği görülmüştür. PHE265 rezidüsünün psi açısında aktif benzeri yapıya Ang II bağlanmasıyla ise Apo durumla benzer bir açısal değişim görülmüş, simülasyon boyunca 70^{o}'den 90^{o}'ye kadar artarak değişmiş; Ang 1-7 bağlanmasıyla da psi açısı simülasyon boyunca yaklaşık 60^{o}'lik bir açı ile sabit kalmıştır.

AT2R'deki DRY motifinin dihedral açıları Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlı olduğu durumda ve ligand bağlı olmayan Apo durumda incelendiğinde; DRY motifini oluşturan rezidülerden ASP141, ARG142 ve TYR143'ün phi, psi ve chi açılarında simülasyon süresi boyunca önemli bir açısal değişim görülmemiştir.

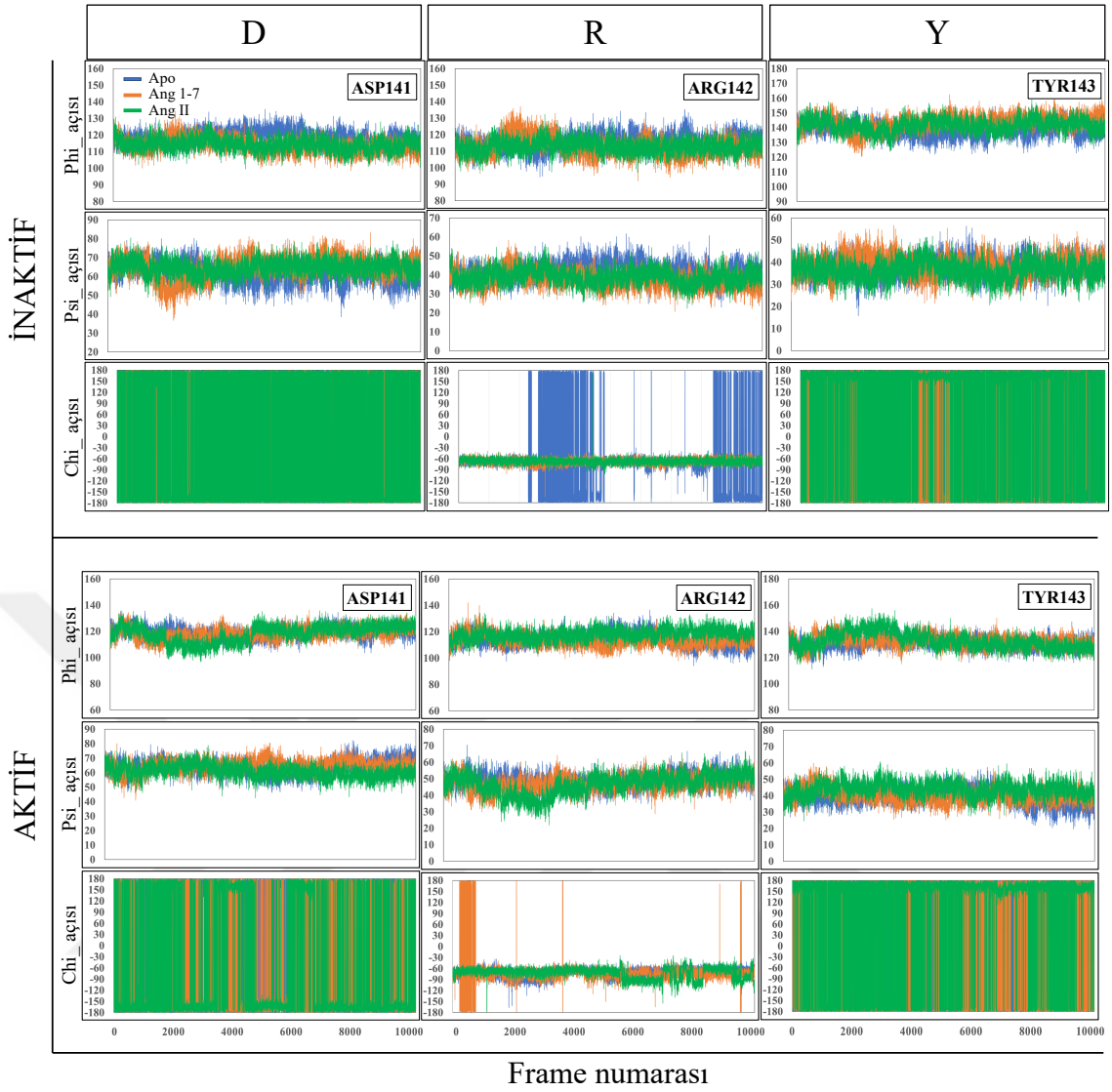
AT2R'deki CWxP motifinin dihedral açıları Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlı olduğu durumda ve ligand bağlı olmayan Apo durumda incelendiğinde; CWxP motifini oluşturan rezidülerden CYS268'in phi açısında inaktif benzeri yapıya ligand bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla açısal bir değişim görülmezken aktif benzeri yapıya Ang II bağlandığında Apo durumla benzer olarak ilk 400 ns boyunca değişim olmadığı, 400-700 ns arasında Apo duruma kıyasla 10^{o} ve 700 ns 'den sonra ise yaklaşık 20^{o}'lik bir değişim görülmüştür. Aynı şekilde aktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlandığında ise simülasyon boyunca CYS268'in phi açısında bir değişim görülmezken Apo duruma kıyasla 400-700 ns arasında yaklaşık 20^{o} ve 700 ns'den sonra ise yaklaşık 40^{o}'lik bir açısal değişim olduğu görülmektedir. CYS268'in psi açısında inaktif benzeri yapıya Ang II bağlanmasıyla bir açısal değişim görülmezken Ang 1-7 bağlanmasıyla 500 ns'den sonra yaklaşık 20^{o}'lik bir değişim gözlenmiştir. CYS268'in psi açısında aktif benzeri yapıya ligand bağlanmasıyla simülasyon süresi boyunca önemli bir açısal değişim görülmemiştir. Ayrıca CYS268'e ait bir chi açısı bulunmadığı için açısal değişim incelenmemiştir. CWxP motifini oluşturan rezidülerden TRP269'un phi açısında aktif benzeri yapıya ligand bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla bir değişim görülmezken inaktif yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla 500 ns'den sonra Apo duruma kıyasla 20^{o}'lik bir açısal fark gözlenmiş Ang II bağlanmasında ise bir değişim görülmemiştir. TRP269'un psi ve chi açılarında simülasyon boyunca önemli bir değişim görülmemiş yalnızca inaktif yapıya Ang 1-7 bağlandığı durumda psi açısında 500 ns'den sonra Apo duruma kıyasla 10^{o}'lik bir açısal fark gözlenmiştir. CWxP motifini oluşturan rezidülerden LEU270'in phi ve psi açılarında inaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla 500 ns'den sonra Apo duruma kıyasla yaklaşık 10^{o} ve aktif yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla da yine 500 ns'den sonra yaklaşık 20^{o}'lik bir açısal fark görülmüştür. İnaktif ve aktif benzeri yapılara Ang II bağlanmasıyla LEU270'in phi ve psi açılarında Apo duruma kıyasla simülasyon boyunca önemli bir değişim görülmemiştir. Ayrıca hem inaktif hem de aktif benzeri yapılara ligand bağlanmasıyla LEU270'in chi açısında Apo duruma kıyasla simülasyon boyunca önemli bir değişim görülmemiştir. CWxP motifini oluşturan rezidülerden PRO271'in phi, psi ve chi açılarında hem inaktif hem de aktif benzeri yapılara ligand bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla açısal bir değişim görülmezken yalnızca inaktif yapıya Ang 1-7 bağlandığında PRO271'in psi açısında simülasyon boyunca Apo duruma kıyasla yaklaşık 30^{o}'lik bir açısal fark görülmüştür.



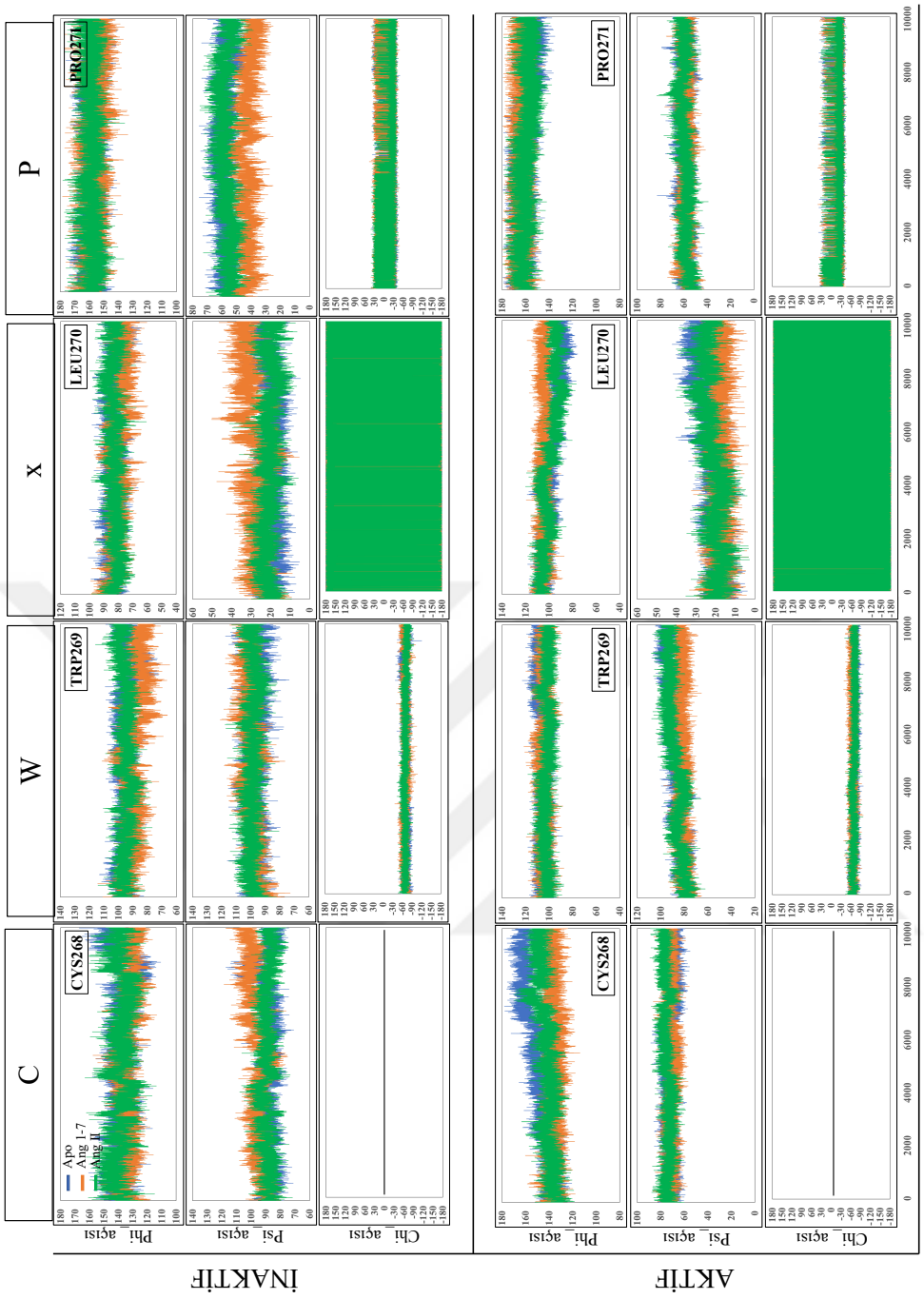
Şekil 4.31. AT2R için mikro-anahtar motiflerin yapıları. İnaktif ve aktif benzeri yapıdaki AT2R'ye Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanması durumunda Apo-AT2R durumuna kıyasla CWxP, DRY ve NPxxY motiflerindeki yapısal değişimler.



Şekil 4.32. AT2R için mikro-anahtar PIF motifinin dihedral açıları. İnaktif ve aktif durum için Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarında PIF motifini oluşturan PRO223, ILE132 ve PHE265 rezidülerinin Phi, Psi ve Chi dihedral açılarının MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.



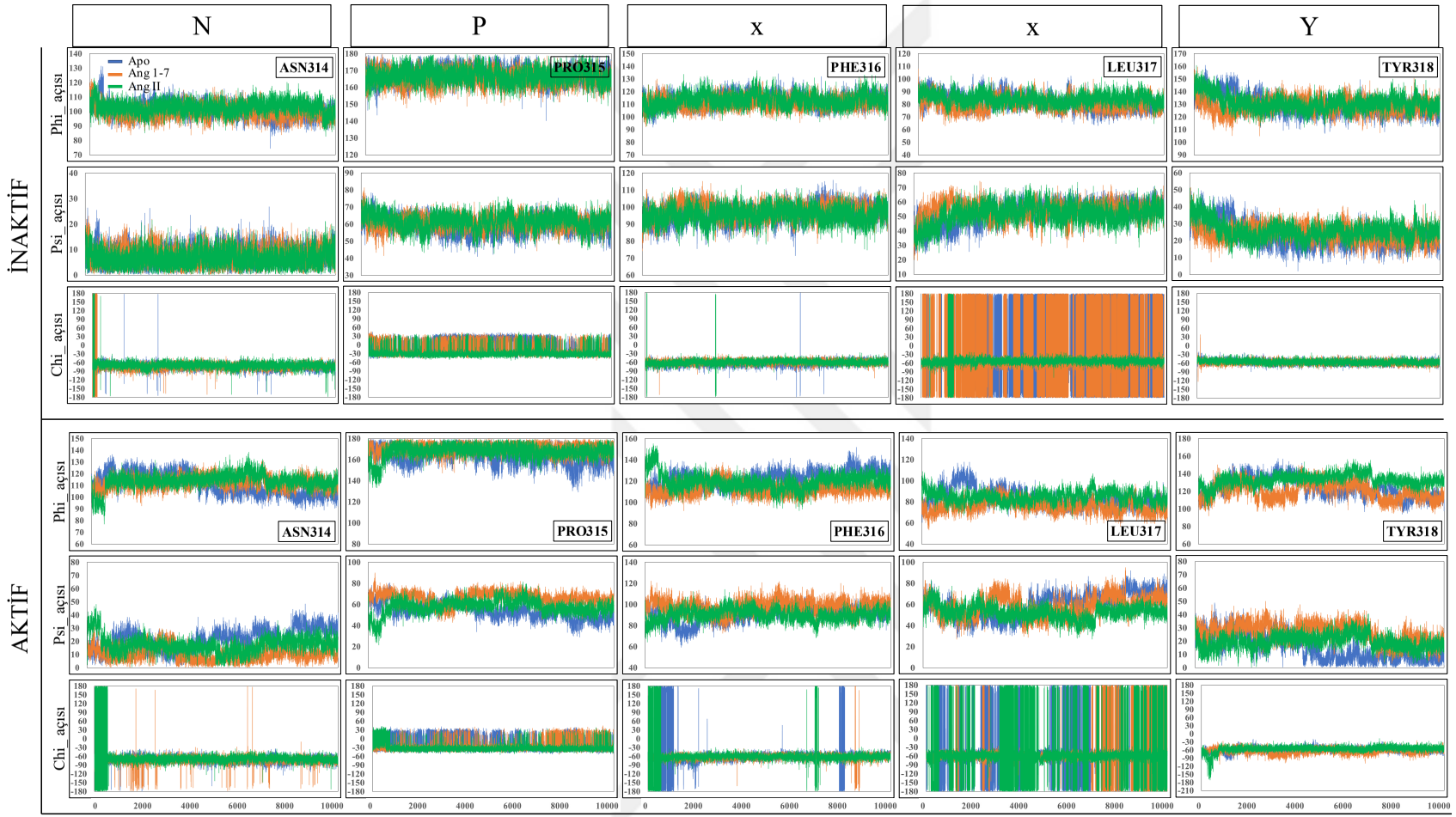
Şekil 4.33. AT2R için mikro-anahtar DRY motifinin dihedral açıları. İnaktif ve aktif durum için Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarında DRY motifini oluşturan ASP141, ARG142 ve TYR143 rezidülerinin Phi, Psi ve Chi dihedral açılarının MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.



Şekil 4.34. AT2R için mikro-anahtar CWxP motifinin dihedral açılarının analizleri. İnaktif ve aktif durum için Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarında CWxP motifini oluşturan CYS268, TRP269, LEU270 ve PRO271 rezidülerinin Phi, Psi ve Chi dihedral açılarının MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.

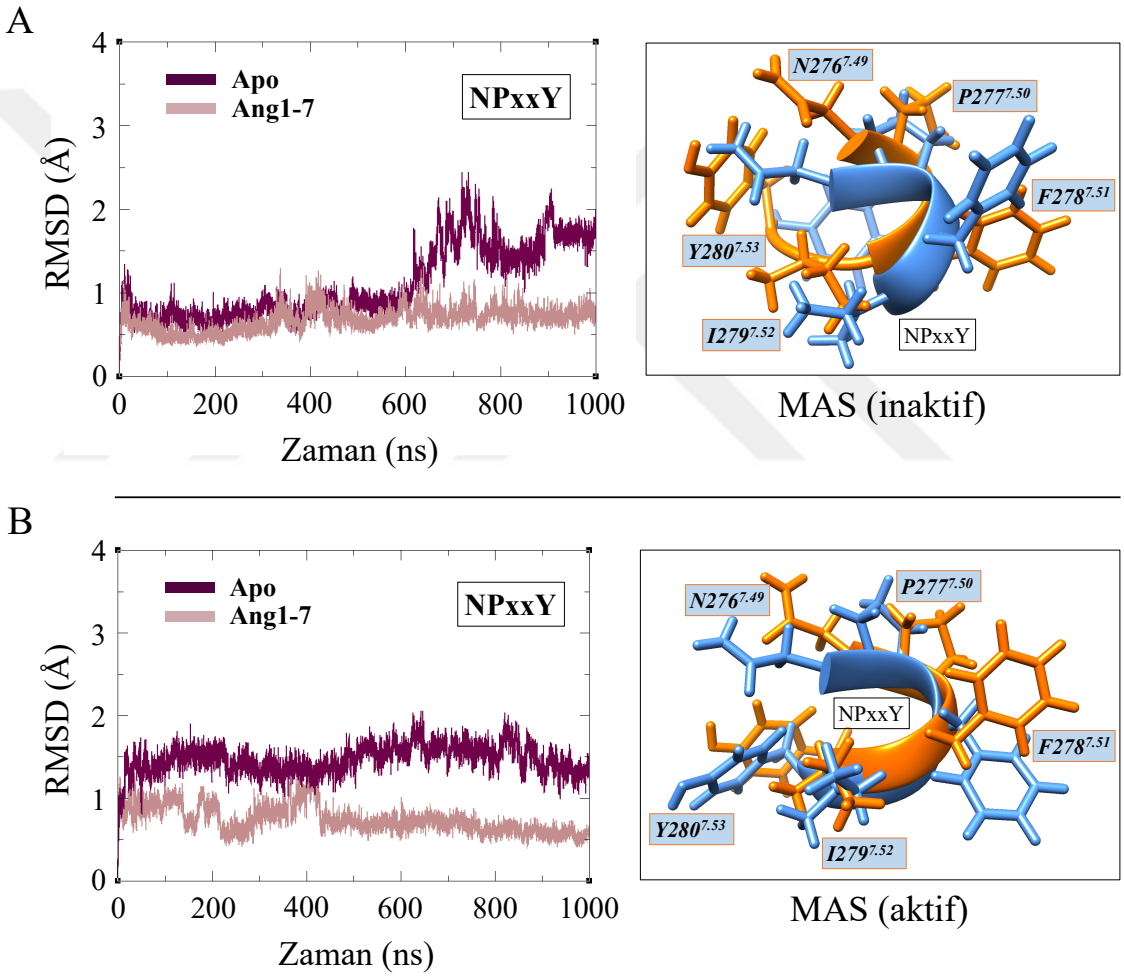
AT2R'deki NPxxY motifinin dihedral açıları Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlı olduğu durumda ve ligand bağlı olmayan Apo durumda incelendiğinde; NPxxY motifini oluşturan rezidülerden ASN314, PRO315, PHE316, LEU317 ve TYR318'in inaktif yapıya Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasıyla phi, psi ve chi açılarında, aktif yapıya ligandların bağlanmasıyla da yalnızca chi açılarında MD simülasyon süresi boyunca önemli bir açısal değişim görülmemiştir.

NPxxY motifini oluşturan rezidülerden ASN314'ün phi açısında aktif benzeri yapıya Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla ilk 500 ns MD simülasyon boyunca bir açısal değişim yokken 500 ns'den sonra yaklaşık 20°'lik açısal değişim görülmüştür. ASN314'ün phi açısında Apo duruma kıyasla ilk 400 ns'den sonra aktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla yaklaşık 20° ve Ang II bağlanmasıyla da yaklaşık 10°'lik bir açısal değişim görülmüştür. PRO315'in phi açısında aktif benzeri yapıya Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla simülasyon boyunca açısal bir değişim gözlenmezken, psi açısında ilk 400 ns'den sonra aktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla yaklaşık 20° ve Ang II bağlanmasıyla da yaklaşık 10°'lik bir açısal değişim görülmüştür. PHE316'nın phi açısında ilk 400 ns'den sonra aktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla yaklaşık 20° ve Ang II bağlanmasıyla da yaklaşık 10°'lik bir açısal değişim görülürken, psi açısında Ang 1-7 bağlanmasıyla yaklaşık 20°'lik bir değişim görülmüş fakat Ang II bağlanmasıyla önemli açısal bir değişim görülmemiştir. LEU317'nin phi açısında Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla yaklaşık 10°'lik bir değişim görülmüş fakat Ang II bağlanmasıyla önemli bir açısal değişim görülmemiştir. LEU317'nin psi açısında simülasyonun 200-400 ns arasında Ang 1-7 bağlanmasıyla 20° ve Ang II bağlanmasıyla 30°, 400-700 ns arasında Ang 1-7 bağlanmasıyla 10° ve Ang II bağlanmasıyla 20° ve son olarak 700 ns'den sonra tekrar Ang 1-7 bağlanmasıyla 20° ve Ang II bağlanmasıyla 30° bir açısal değişim görülmüştür. TYR318'in phi açısında simülasyonun 200-400 ns arasında Ang 1-7 bağlanmasıyla 40° ve Ang II bağlanmasıyla açısal değişim yok, 400-700 ns arasında Ang 1-7 bağlanmasıyla 40° ve Ang II bağlanmasıyla 20°, son olarak 700 ns'den sonra Ang 1-7 bağlanmasıyla açısal değişim yok ve Ang II bağlanmasıyla 30° bir açısal değişim görülmüştür. TYR318'in psi açısında simülasyonun ilk 700 ns boyunca Ang 1-7 bağlanmasıyla 10° ve Ang II bağlanmasıyla açısal değişim yok, 700 ns'den sonra ise Ang 1-7 ve Ang II bağlanmasıyla yaklaşık 10°'lik bir açısal değişim görülmüş ayrıca 400-700 ns arasında Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma göre açısal fark yaklaşık 20° olarak görünürken Ang II bağlanması 10°'lik açısal farkı korumuştur.



Şekil 4.35. AT2R için mikro-anahtar NPxxY motifinin dihedral açıları. İnaktif ve aktif durum için Apo-AT2R, Ang (1-7)-AT2R ve Ang II-AT2R kompleks yapılarında NPxxY motifini oluşturan ASN314, PRO315, PHE316, LEU317 ve TYR318 rezidülerinin Phi, Psi ve Chi dihedral açılarının MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.

MAS reseptöründe meydana gelen yapısal dinamik değişimlerine ve sinyal iletimiyle aktivasyon mekanizmasına katkıda bulunan reseptörün korunmuş NPxxY mikro-anahtar motifinde ligand bağlanmasına tepki olarak gerçekleşen açısal değişimler Şekil 4.37'de gösterilmiştir. İnaktif ve aktif benzeri MAS yapılarına Ang 1-7 ligandı bağlandığında aktivasyon mekanizmasına aracılık eden motiflerde yapısal bir değişim olup olmadığı MD simülasyonlar boyunca bu motiflerdeki rezidülerin phi (ϕ), psi (ψ) ve chi (χ) dihedral açılarında meydana gelen değişimler incelenerek belirlenmiştir. Şekil 4.36'da MAS reseptörüne ait mikro-anahtar motif ile Ang 1-7 ligandının bağlanması durumunda NPxxY motiflerinde meydana gelen RMSD ve yapısal değişimler gösterilmiştir.



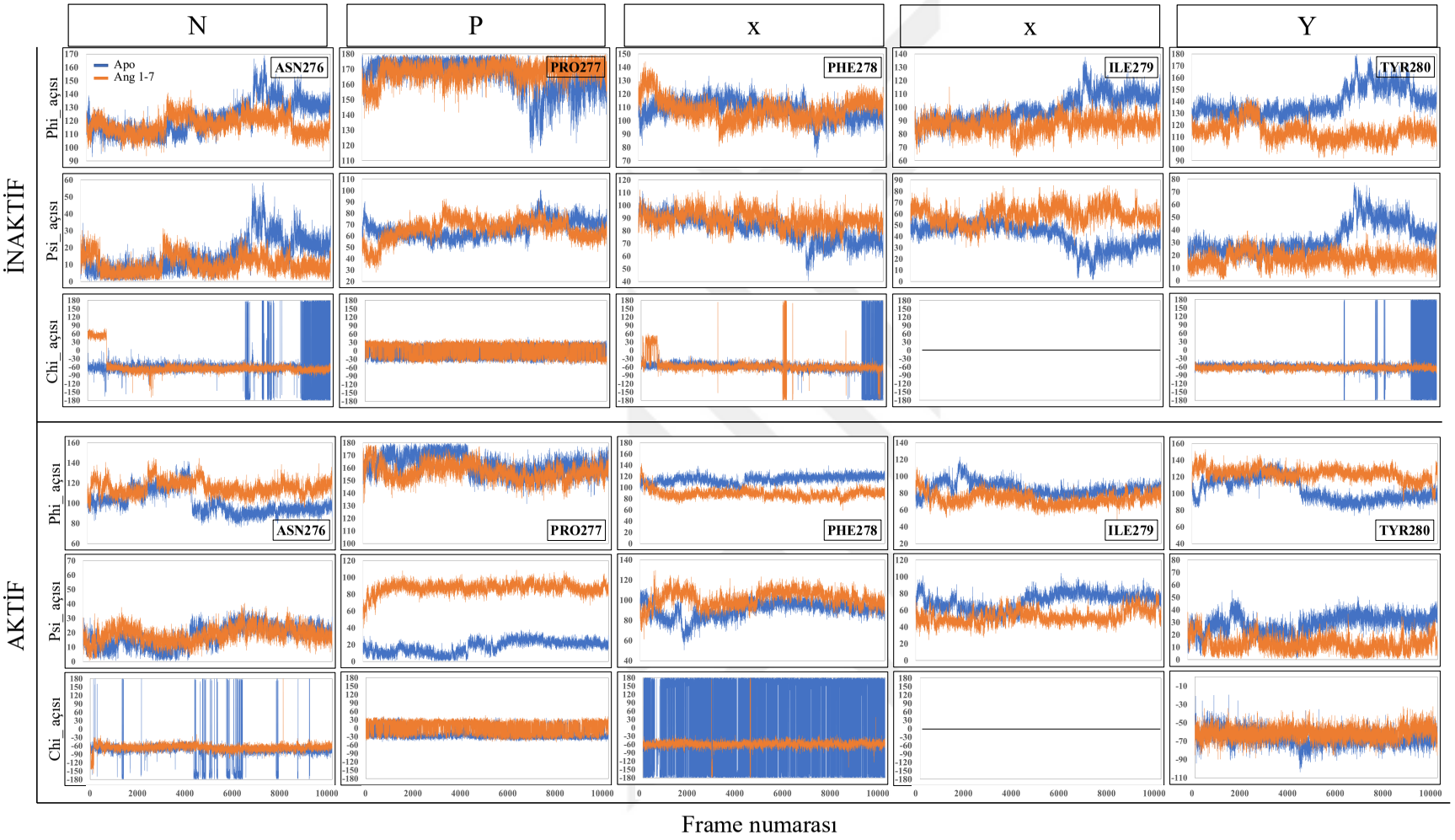
Şekil 4.36. MAS reseptörü için mikro-anahtar NPxxY motifi. A) İnaktif durumda ve B) aktif durumda MAS reseptörüne Ang 1-7 ligandının bağlanmasıyla Apo-MAS durumuna kıyasla NPxxY motifinin yapısal değişim grafikleri.

MAS reseptörünün bilinen mikro-anahtar motifi NPxxY rezidülerinin simülasyon boyunca reseptörün inaktif ve aktif benzeri yapılarının Apo ve Ang 1-7 ligand bağlı durumlarında meydana gelen RMSD değişimleri incelendiğinde; inaktif benzeri yapının Apo durumunda 600 ns MD simülasyon süresinden sonra NPxxY motifinin kararlı yapısının bozulduğu stabilite değişimiyle gözlenirken Ang 1-7 ligandının bağlanmasıyla 1000 ns simülasyon boyunca motifin Apo duruma kıyasla daha kararlı bir şekilde hareket ettiği gözlenmiştir. Aktif benzeri yapıda ise Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda stabilite değişimleri sabit olmasına rağmen ligand bağlı durumda NPxxY motifinin Apo duruma kıyasla daha kararlı bir şekilde hareket ettiği görülmektedir.

MAS reseptöründeki NPxxY motifinin dihedral açıları Ang 1-7 ligandının bağlı olduğu durumda ve ligand bağlı olmayan Apo durumda incelendiğinde; NPxxY motifini oluşturan rezidülerden ASN276, PRO277, PHE278, ILE279 ve TYR280'in simülasyon boyunca Apo duruma kıyasla ligand bağlanma durumunda gerçekleşen açısal değişimler gözlemlenmiştir. NPxxY motifini oluşturan rezidülerden ASN276'nın phi açısında inaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla 700 ns simülasyondan sonra yaklaşık 20^{o}'lik açısal değişim görülmüştür. ASN276'nın psi açısında ligand bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla ilk 100 ns boyunca yaklaşık 15^{o} ve 700 ns simülasyondan sonra yaklaşık 20^{o}'lik açısal değişim görülmüştür. ASN276'nın chi açısında ise ilk 100 ns boyunca Apo duruma kıyasla yaklaşık 120^{o}'lik bir açısal fark olduğu fakat simülasyonun devamında bu farkın ortadan kalktığı görülmüştür. Aktif benzeri yapıda ise ASN276'nın phi açısında Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla 400 ns simülasyondan sonra yaklaşık 20^{o}'lik bir açısal değişim görülmüş fakat psi ve chi açılarında simülasyon boyunca önemli bir açısal değişime rastlanmamıştır. PRO277'nin phi açısında inaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla ilk 100 ns ve son 300 ns simülasyon boyunca yaklaşık 20^{o}'lik bir açısal değişim görülmüştür. PRO277'nin psi açısında Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla ilk 100 ns boyunca 30^{o}, 300-500 ns arasında 20^{o} ve son 200 ns boyunca da 10^{o}'lik açısal bir fark belirlenmiştir. PRO277'nin phi açısında aktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla sadece 200-300 ns arasında yaklaşık 20^{o}'lik bir açısal fark olduğu bunun dışında önemli bir açısal değişim olmadığı belirlenmiştir. PRO277'nin psi açısında ilk 700 ns simülasyon boyunca yaklaşık 80^{o} ve 700 ns'den sonra ise Apo duruma kıyasla bu açısal

fark azalarak yaklaşık 70º'lik bir açısal değişim görülmüştür. PRO277'nin chi açısında ise hem inaktif hem de aktif MAS yapılarına Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla önemli bir açısal değişim görülmemiştir. PHE278'in phi açısında inaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla ilk 100 ns boyunca 30º, 300-500 ns arasında 20º ve son 200 ns boyunca da 10º'lik açısal bir fark belirlenmiştir. PHE278'in psi açısında 700 ns simülasyondan sonra yaklaşık 20º'lik açısal değişim görülmüş bunun dışında önemli bir açısal değişime rastlanmamıştır. PHE278'in chi açısında ise ilk 100 ns boyunca Apo duruma kıyasla yaklaşık 100º'lik bir açısal fark olduğu fakat simülasyonun devamında bu farkın ortadan kalktığı görülmüştür. Aktif benzeri yapıda ise PHE278'in phi açısında Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla 30º'lik bir açısal fark olduğu görülmüş ve bu fark 1000 ns simülasyon boyunca korunmuştur. PHE278'in psi açısında 100-300 ns arasında yaklaşık 50º'lik bir açısal değişim görülmüş bunun dışında önemli bir açısal değişime rastlanmamıştır. İnaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla simülasyonda 600 ns'den sonra ILE279'un phi açısında yaklaşık 30º ve psi açısında ise 30-50º'lik bir açısal fark olduğu gözlemlenmiştir. Aktif benzeri yapıda ise ILE279'un phi açısında 100-300 ns arasında yaklaşık 30º ve psi açısında 500-800 ns arasında yaklaşık 30º'lik bir açısal değişim görülmüş bunun dışında önemli bir açısal değişime rastlanmamıştır.

NPxxY motifini oluşturan rezidülerden TYR280'nin phi açısında inaktif benzeri yapıya Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla simülasyonda ilk 200 ns boyunca ve 300-500 ns arasında 20º, 500-600 ns arasında 30º, 600-900 ns arasında 60º ve son 100 ns'de 20º'lik bir açısal fark ile simülasyon boyunca açısal değişim gözlenmiştir. TYR280'nin psi açısında ise 600-900 ns arasında 50º ve son 100 ns'de 30º'lik bir açısal fark görülmüş bunun dışında önemli bir açısal değişime rastlanmamıştır. Aktif benzeri yapıda ise TYR280'nin phi açısında Ang 1-7 bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla simülasyonda ilk 100 ns boyunca 60º, 500-800 ns arasında 40º ve son 200 ns'de 20º'lik bir açısal fark ile simülasyon boyunca açısal değişim gözlenmiştir. TYR280'nin psi açısında ise 600 ns'den sonra 30º'lik bir açısal fark meydana gelmiş ve bu fark korunmuştur.



Şekil 4.37. MAS reseptörü için mikro-anahtar NPxxY motifinin dihedral açıları. İnaktif ve aktif durum için Apo-MAS ve Ang (1-7)-MAS kompleks yapılarında NPxxY motifini oluşturan ASN276, PRO277, PHE278, ILE279 ve TYR280 rezidülerinin Phi, Psi ve Chi dihedral açılarının MD simülasyonlar boyunca değişim grafikleri.

5. TARTIŞMA

RAS'taki düzenleyici mekanizma Ang peptitlerinin Ang reseptörleri üzerinden hücre içi sinyal mekanizmalarını etkilemesiyle sistemin düzgün bir şekilde çalışmasını sağlamaktadır. Fizyopatolojik durumlarda yıkıcı etkileri düzenlemek ve regüle etmek için özellikle Ang reseptörlerini bloke eden ilaçların tasarlanması ve kullanılması bu patolojilere neden olan mekanizmayı düzeltmek yerine yalnızca geçici bir çözüm sunmaktadır. RAS bileşenlerinin ve moleküler mekanizmalarının fizyolojik etkileriyle birlikte çalışma prensibinin tam olarak aydınlatılamamış olması RAS mekanizmasını anlamak ve yıkıcı etkilerin neden olduğu patolojilere çözüm üretmek açısından büyük bir eksikliktir. Bu nedenle RAS mekanizmasının çalışma prensibini aydınlatmak, RAS'ta gerçekleşen sinyal mekanizmaları ve moleküler etkileşimleri ortaya çıkarmak için farklı deneysel yöntemler kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar çoğunlukla deneysel çalışmalardan oluşurken son yıllarda hesaplamalı yaklaşımlarda meydana gelen gelişmeler ile RAS'ın bileşenleri ve etkileşimleriyle ilgili hesaplamalı çalışmalar da bu sistemin aydınlatılması adına önemli veriler sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında RAS'ın koruyucu kolu olarak bilinen, moleküler mekanizmaları düzenlediği ve özellikle yapıcı yönde rol oynadığı deneysel çalışmalarla belirlenen ACE2/Ang1-7/MAS ekseninde RAS'taki moleküler mekanizmaları ve biyofiziksel etkilerini araştırmayı amaçladık. Ang 1-7'nin RAS'ta çok önemli bir peptit olduğuna ve patolojik durumlarda yapıcı etkilerinin bulunduğuna dair giderek artan kanıtlar bulunmaktadır (Santos R. A. S. ve ark., 2017; Bader ve ark., 2018). Fakat Ang 1-7'nin RAS'taki Ang reseptörlerinden hangisi ile etkileşimde bulunduğu ve hücre içi sinyal mekanizmalarını düzenlediğine dair çelişkili yaklaşımlar da mevcuttur (Gaidarov ve ark., 2018). Şimdiye kadar yapılan yapısal çalışmalar ile RAS'ta yalnızca AT1R, AT2R ve MrgD reseptörleri, Ang 1-7 ve Ang II peptitleri ile ACE ve ACE2 enzimlerinin kristal yapıları X-ışını kristalografi, Kriyo-EM ve NMR spektroskopi yöntemleri kullanırak belirlenmiştir. Bu reseptörlerin yalnızca aktif benzeri yapıları elde edilmiş ve aktivasyon mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca hangi Ang peptitlerinin bu reseptörlerle etkileştiğine dair araştırmalar sürerken bu reseptörlerin hücre içerisinde hangi G-proteinleri ile nasıl bir etkileşimde bulunduğu da henüz aydınlatılmamıştır. Bu

nedenle yaptığımız bu tez çalışmasında özellikle RAS'ın koruyucu kolunda rol aldığı düşünülen Ang 1-7 peptidinin AT2R ve MAS reseptörleriyle etkileşimleri, bu etkileşimlere dayalı reseptör dinamiklerinde meydana gelen yapısal değişimler ve reseptörlerin aktivasyon mekanizmalarına dair yeni bilgiler elde etmek hedeflenmiştir. Ang II ligandının AT2R ile etkileşiminin olduğuna dair artan kanıtlar nedeniyle Ang II-AT2R reseptör ligand etkileşimleri de tez çalışmasına dahil edilmiş ve kontrol amacıyla kullanılmıştır.

5.1. Reseptör-Ligand Etkileşimleri

Çalışmamızda bulgular kısmında sunulan veriler üç ana başlıkta incelenerek verilmiştir. Öncelikle Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının AT2R ile, Ang 1-7'nin ise MAS reseptörü ile ligand-reseptör etkileşimleri MD simülasyonlar ile belirlenmiş; ligand bağlanmalarının reseptörlerin yapısal dinamik değişimlerine katkısı araştırılmış ve reseptörlerin ligand bağlanmasına dayalı aktivasyon mekanizmaları araştırılmıştır. Ligand reseptör etkileşimleri incelendiğinde MD simülasyonların ilk pozları olan kenetlenmiş yapılar dikkate alındığında inaktif ve aktif benzeri durumlarda AT2R ile Ang II ve Ang 1-7 ligandları arasında reseptöre ait TRP100, TYR103, TYR104, LEU124, MET128, ILE196, MET197 ve PHE272 rezidülerinin ligandlar ile hidrofobik etkileşimde oldukları, ayrıca bu hidrofobik etkileşimler dışında reseptöre ait rezidülerden polar yüklü THR125, pozitif yüklü ARG182 ve LYS215, negatif yüklü ASP279 ve ASP297'nin ligandlar ile ortak hidrojen bağları yaptığı tespit edilmiştir. İnaktif ve aktif benzeri durumlarda MAS reseptörü ile Ang 1-7 arasında reseptöre ait PHE112 ve TYR248 rezidülerinin ligandlar ile hidrofobik etkileşimde oldukları ve reseptöre ait rezidülerden polar yüklü ASN117, THR164 inaktif yapıda, SER109 ve THR257 aktif yapıda, pozitif yüklü ARG245 inaktif yapıda ve ARG174 aktif yapıda, negatif yüklü GLU167 inaktif yapıda ve ASP173 aktif yapıda ligand ile hidrojen bağları yaptığı tespit edilmiştir. MD simülasyonlar boyunca ligand-reseptör etkileşimine katkı yapan hidrojen bağları, tuz köprüleri ve hidrofobik kuvvetler incelendiğinde ise başlangıçtaki bu bağların korunup korunmadığı ve simülasyon sırasında bu bağlanmalara katkı sağlayan yeni bağların oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. Ligand-reseptör arasındaki hidrojen bağları MD simülasyonlar boyunca incelendiğinde; inaktif benzeri AT2R ile Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağlarının PRO7-THR125, ARG2-ASP297, ARG2-ASP279 ve PRO7-LYS215

amino asit çiftleri arasında, aktif benzeri AT2R ile Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağlarının ise ASP1-GLU188 amino asit çiftleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen bu hidrojen bağları başlangıçtaki kenetleme pozunda tespit edilen hidrojen bağlarından farklıdır. Bu bağlar Ang 1-7 ligandının AT2R'ye hem inaktif hem de aktif benzeri yapıda bağlanmasına katkı sağlamıştır. Ang II'nin inaktif benzeri AT2R'ye bağlanmasına PHE8-LYS215, PRO7-THR125, HIS6-ARG182, ASP1-ASP297 ve ARG2-ASP279 amino asit çiftleri arasında, aktif benzeri AT2R'ye bağlanmasına ise; TYR4-TYR204, PHE8-LYS215, ASP1-CYS35, ARG2-ASP279, ARG2-ASP297 ve HIS6-ARG182 amino asit çiftleri arasındaki hidrojen bağlarının katkı yaptığı tespit edilmiştir. Belirlenen bu hidrojen bağları da kenetleme pozundan farklı olarak simülasyon süresi içerisinde oluşmuş ve Ang II ligandının AT2R'ye hem inaktif hem de aktif benzeri yapıda bağlanmasına katkı sağlamıştır. Ayrıca bu hidrojen bağlarından PHE8-LYS215, ARG2-ASP279 ve HIS6-ARG182 arasındaki bağların Ang II'nin inaktif ve aktif yapılara bağlanmasına katkı sunan ortak bağlar olduğu belirlenmiştir. İnaktif benzeri AT2R ile Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasında ise PRO7-THR125 ve ARG2-ASP279 arasındaki hidrojen bağlarının ortak olduğu tespit edilmiştir. Burada en dikkat çekici bulgu aktif benzeri AT2R ile Ang 1-7 ligandının bağlanmasında LYS215 ile PRO7 arasında oluşan ve bağlanmaya katkı sunan hidrojen bağının Ang II bağlanmasında PHE8 ile sağlandığı bulgusudur. Bu bulgu aktif benzeri AT2R'ye bağlanan her iki ligandın da benzer bir role sahip olabileceği düşüncesi yönünden anlamlıdır. Bunun dışında inaktif benzeri MAS reseptörü ile Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağlarının PRO7-ARG245, PRO7-SER265, TYR4-TYR248, PRO7-TYR248, ASP1-GLY100 ve HIS6-THR164 amino asit çiftleri arasında, aktif benzeri MAS reseptörü ile Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı yapan hidrojen bağlarının ise PRO7-SER109, TYR4-ASP90, ARG2-TYR91 ve HIS6-ARG245 amino asit çiftleri arasında olduğu tespit edilmiştir.

MD simülasyonlar boyunca ligand-reseptör arasındaki tuz köprüleri incelendiğinde; hem inaktif hem de aktif benzeri AT2R yapıları ile Ang 1-7 ve Ang II bağlanmasına aracılık eden iki farklı tuz köprüsünün ortak olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen ARG2-ASP279 ve ARG2-ASP297 ligand-protein çifti arasındaki tuz köprülerinde AT2R'ye ait ASP279 ve ASP297 rezidülerinin hidrojen bağlarının oluşumunda da katkı sağladığı görülmüştür.

MAS reseptörünün inaktif benzeri yapısı ile Ang 1-7 bağlanmasına aracılık eden tuz köprülerinin ASP1-GLU175 ve ASP1-ASP173 arasında, aktif benzeri yapısı ile Ang 1-7 bağlanmasında ise ASP1-GLU175 ve ARG2-GLU175 ligand-protein çifti arasında olduğu belirlenmiştir. Burada ASP1-GLU175 tuz köprüsünün Ang 1-7'nin hem inaktif hem de aktif benzeri MAS reseptörüne bağlanmasında katkı sunan ortak bağ olduğu ve bu bağın inaktif benzeri yapı için MD simülasyonun 600 ns'den sonra oluştuğu, aktif benzeri yapıda ise MD simülasyonun ilk 150 ns boyunca oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu durumda ortak ASP1-GLU175 tuz köprüsünün ligand bağlanmasıyla MAS reseptörünün inaktif benzeri yapıdan aktif benzeri yapıya geçişte bir etkisinin olabileceği ihtimalini ortaya çıkarmıştır.

Ligand-reseptör arasındaki etkileşimlere katkı sağlayan hidrofobik kuvvetler MD simülasyonlar süresince incelendiğinde; inaktif benzeri AT2R ile Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı sağlayan hidrofobik kuvvetlerin ILE5-TRP100 ve PRO7-PHE272 arasında ve aktif benzeri AT2R ile Ang 1-7'nin bağlanmasına en çok katkı sağlayan hidrofobik kuvvetlerin ise ILE5-TYR108 ve PRO7-TRP100 arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca inaktif benzeri AT2R ile Ang II'nin bağlanmasına en çok katkı sağlayan hidrofobik kuvvetlerin ILE5-TRP100 ve TYR4-TYR108 arasında ve aktif benzeri AT2R ile Ang II'nin bağlanmasına en çok katkı sağlayan hidrofobik kuvvetlerin ise ARG2-TRP283 ve PRO7-TRP100 ligand-protein çifti arasında olduğu tespit edilmiştir. Buradaki en dikkate değer bulgu, AT2R'nin hem inaktif hem de aktif durumdaki yapılarına Ang 1-7 ve Ang II gibi farklı ligandlar bağlandığında reseptöre ait TRP100 rezidüsünün ortak olduğu ve MD simülasyonlar boyunca bu rezidü ile kurulan hidrofobik kuvvetlerin korunarak ligand-reseptör etkileşimlerine en büyük katkıyı sağladığı yönündedir. MAS reseptörünün inaktif benzeri yapısında Ang 1-7'nin bağlanmasına en fazla katkı yapan hidrofobik kuvvetlerin PRO7-TYR245 ve PRO7-PHE112 arasında, aktif benzeri yapısında Ang 1-7'nin bağlanmasına en fazla katkı yapan hidrofobik kuvvetlerin ise PRO7-PHE112 ve ILE5-TYR248 ligand-protein çifti arasında olduğu belirlenmiştir. MAS reseptörünün hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına Ang 1-7 ligandı bağlandığında bağlanmaya katkı sunan PRO7-PHE112 hidrofobik kuvvetinin ortak olduğu ve bu kuvvetin inaktif yapıya kıyasla aktif yapıya bağlanmada MD simülasyonlar süresince daha çok katkı sağladığı tespit edilmiştir. Bu durumda ortak

PRO7-PHE112 hidrofobik kuvvetinin ligand bağlanmasıyla MAS reseptörünün inaktif benzeri yapıdan aktif benzeri yapıya geçişte bir etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Ligand-reseptör etkileşimlerini belirlemek için yapılan tüm analizler dikkate alındığında; moleküler kenetleme ile MD simülasyonlar boyunca yapılan bağların analizleri Ang 1-7 ligandının AT2R'nin inaktif benzeri yapısına aktif benzeri yapısından daha iyi bir bağlanma durumu sergilediğini göstermiştir. İnaktif yapıdan aktif yapıya geçişte ise Ang 1-7 ile AT2R arasındaki bağ sayılarının azaldığı ve bağlanmanın zayıfladığı görülmüştür. Ang II bağlanması durumunda Ang 1-7 bağlanmasına kıyasla nispeten daha güçlü ve özellikle aktif benzeri yapıya geçişte bağlanmanın daha da güçlendiği yönünde bir etki olabileceği düşünülmektedir. Bağ analizleri dışında ligandlara ait RMSD ve ligandlar ile reseptör arasındaki mesafe değişim analizleri göstermiştir ki; AT2R'nin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına Ang 1-7 ve Ang II ligandları kararlı bir bağlanma göstermiş ve 1000 ns MD simülasyon süresi boyunca bu bağlanmalar korunmuştur. Bu bulgu özellikle RAS'ta AT2R üzerinden gerçekleşen hücre içi sinyal mekanizmalarını anlamada önemli bilgiler sunmaya aracılık etmekle beraber Ang 1-7 ve Ang II'nin AT2R aktivasyon ve/veya modülasyon mekanizmasında etkili olabileceği yönünde fikir vermektedir.

Ayrıca Ang 1-7'nin MAS reseptörünün hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarına kararlı bir bağlanma sergilediği ve 1000 ns MD simülasyon süresi boyunca bu bağlanmaların korunduğu belirlenmiştir. Ang 1-7 bağlanmasının oynadığı rol dikkate alınarak özellikle RAS'ın koruyucu kolundaki Ang 1-7 ile MAS bağlanması hakkında doğrudan bir etkileşimi ortaya koyan herhangi bir deneysel kanıt bulunmadığını ifade eden bazı deneysel çalışmalardaki (Gaidarov ve ark., 2018; Kemp ve ark., 2019) çelişkili yaklaşımları ortadan kaldırmaya adaydır.

5.2. Reseptörlerin Yapısal Dinamikleri

Ligand bağlanmasına dayalı reseptör dinamiklerinde meydana gelen yapısal değişimleri incelemek için birçok farklı analiz yöntemi kullanılmıştır. Ligand bağlanmasıyla reseptörün kararlı yapısını ve esnekliğini koruyup korumadığını, MD simülasyonlar boyunca rezidülerin etkileşimleriyle korelasyonlarının belirlenmesini ve sinyal iletim mekanizmalarını belirlemek için kullanılan bu analiz sonuçları ile reseptörlerin yapısal dinamiklerini açıklamaya yardımcı bulgular elde edilmiştir.

Reseptörlerin Apo durumlarına kıyasla ligand bağlanma durumlarında RMSD ve RMSF değişimleri ile hem reseptörlere ait TM sarmallarının hem de ligandların RMSD değişimleri incelenmiş ve ligandların bağlanma durumları ile bu bağlanma durumlarında reseptörlerin yapısal dinamik değişimleri belirlenmeye çalışılmıştır. İnaktif ve aktif benzeri AT2R'ye Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının 1000 ns MD simülasyonlar boyunca bağlanarak simülasyon boyunca kararlı bir şekilde bağlı kaldığı RMSD değişimleri ile belirlenmiş, her iki ligandın da RAS'ta AT2R için olası ligand bağlanma hedefi olabileceği düşünülmüştür. AT2R'ye bağlanan iki farklı ligandın reseptör dinamiğine etkileri için Şekil 4.14'teki RMSD ve RMSF grafikleri incelendiğinde özellikle Ang II'nin Ang 1-7'ye kıyasla AT2R bağlanmasında daha etkili olabileceği ve hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarda stabiliteyi artırmaya yönelik etkilere sahip olabileceği düşünülmüştür. Ang 1-7 bağlanmasının ise inaktif AT2R için aktif benzeri yapıya kıyasla daha etkin bir role sahip olabileceği ve RMSF değişimleri incelendiğinde inaktif benzeri yapıdaki reseptörün TM bağlayıcı kısımlarında dinamik değişimlere katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Ang 1-7 bağlanmasının MAS reseptör dinamiğindeki yapısal değişimleri incelendiğinde ise özellikle 600 ns'den sonra reseptörün stabilitesini etkilediği ve kararlı yapının ortadan kalktığı görülürken, aktif benzeri MAS yapısı için reseptörün TM sarmalları ve TM bağlayıcı kısımlarında dinamik değişimlere katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. RMSD ve RMSF değişimleri incelendiğinde dikkate değer en önemli bulgu MD simülasyonlar boyunca ligandların reseptörlere kararlı bir bağlanmaya sahip oldukları ve Ang 1-7'nin AT2R'ye kıyasla MAS reseptörünün yapısal dinamik değişimlerinde daha etkili olabileceği yönündedir.

AT2R'ye ve MAS reseptörüne inaktif ve aktif benzeri durumlarda ligand bağlanmadan önce ve sonra reseptöre ait rezidü çiftlerinin ikili etkileşimleri için yapılan iletişim eğilimi, dinamik çapraz korelasyon ve temel bileşen analizleri ile Ang 1-7 ve Ang II ligand bağlanmaları ile reseptörlerin yapısal dinamik değişimleri incelenmiştir. İletişim eğilimi analizleri ile ligand bağlandığı durumda Apo duruma kıyasla reseptörlere ait rezidü çiftlerinin ikili etkileşimleri değerlendirilmiş ve AT2R ve MAS reseptörlerine ait TM bağlayıcı kısımların iletişim eğilimlerinde azalma meydana geldiği görülmüştür. Ligand bağlı olmadığı durumda iletişim eğilimi daha fazlayken Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının AT2R'ye inaktif ve aktif benzeri yapılara bağlanması reseptörün daha stabil bir yapıya

geçmesine aracılık ettiği ve reseptörün yapısal dinamiğinde bir kararlı yapıya geçmesine katkı sağladığı düşünülmüştür. Benzer olarak Ang 1-7 ligandının MAS reseptörüne inaktif ve aktif benzeri durumlarda bağlanması da benzer etkiler göstermiştir. Buradaki en dikkat çekici bulgu ise AT2R için Ang 1-7 bağlanmasının Ang II bağlanmasına kıyasla iletişim eğiliminin azalmasına daha çok katkı sağladığı yönündedir. RMSD analizleri Ang II bağlanmasının AT2R'nin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılarında stabiliteyi artırmaya yardımcı olduğu ve iletişim eğilimi analizleri de özellikle hücre içi TM bağlayıcı kalıntıların iletişim eğilimlerini artırdığı yönündedir. Bunun yanı sıra Ang 1-7'nin özellikle inaktif benzeri yapıda AT2R için iletişim eğiliminin azalmasına katkı sunarken aktif benzeri yapıda katkısının daha az olduğunu göstermektedir.

Dinamik çapraz korelasyon analizleri değerlendirildiğinde reseptörün TM sarmalları ve bu sarmalları hücre içinde ve dışında bağlayan bileşenlerinin karşılıklı ve iç korelasyonlarının inaktif benzeri AT2R için Ang 1-7 bağlanmasına kıyasla Ang II bağlanmasıyla arttığı görülmüştür. Aktif benzeri yapıda ise Apo duruma kıyasla hem Ang 1-7 hem de Ang II bağlanmasıyla karşılıklı ve iç korelasyonların azaldığı fakat ang 1-7 bağlanmasında daha fazla bileşen için bu azalmanın varlığı söz konusudur. DCC analizleri kıyaslandığında AT2R için Ang II'nin ve MAS reseptörü için de Ang 1-7'nin Apo duruma kıyasla korelasyonlarda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Temel bileşen analizleri incelendiğinde ise; özellikle PC1-PC2 haritalarının ligand bağlanması durumunda reseptör bileşenlerinin kümelenmiş vektörel hareketlerini açıklamak için yeterli olduğu görülmektedir. AT2R'ye ait rezidülerin hem inaktif hem de aktif benzeri yapılar için Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketlerinin benzer, Ang II bağlı durumda ise farklı olduğu belirlenmiştir. MAS reseptörü için de Apo durumda ve Ang 1-7 ligand bağlı durumda özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketlerin farklı olduğu görülmüştür. Bu durumda Ang II'nin AT2R için Ang 1-7'nin de MAS reseptörü için vektörel hareketlerine daha fazla katkı sunduğu, AT2R için Ang 1-7'ye kıyasla Ang II'nin özvektör 1 ve özvektör 2 yönündeki hareketlerinin daha anlamlı olduğu düşünülmektedir. Buradaki en dikkat çekici düşünce Ang 1-7'nin özvektör yönündeki hareketlere katkıda bulunarak AT2R'den ziyade

MAS reseptörünün yapısal dinamiklerini daha fazla etkileme potansiyeline sahip olduğu yönündedir.

Ligand bağlanmasıyla hücre dışından hücre içine doğru reseptördeki sinyalizasyon mekanizmasını belirlemek için DRIN analizleri yapılmıştır. Ang 1-7 bağlanması AT2R için aktif durumdaki bağlanmaya kıyasla inaktif durumda pozitif BC değerlerinin, inaktif duruma kıyasla aktif durumda ise negatif BC değerlerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu pozitif BC değerleri reseptör aktivasyonuna katkı sağladığı düşünülen mikro-anahtarlardan DRY (ARG142), PIF (ILE132, PHE265) ve CWxP (CYS268) rezidülerini içermektedir (Tablo 4.5). Bunun yanı sıra Ang 1-7 bağlanması MAS reseptörü için aktif durumdaki bağlanmaya kıyasla inaktif durumda pozitif BC değerlerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durumda AT2R'ye Ang 1-7 bağlanması ile inaktif benzeri yapıda pozitif BC'lerin ve aktif benzeri yapıda ise negatif BC'lerin fazla olması nedeniyle sinyalizasyona katkı sunduğu görülmüştür. Aktif yapıya Ang 1-7 bağlanmasında mikro-anahtarlardan DRY (ARG142), PIF (PHE265) ve NPxxY (TYR318) rezidülerinin pozitif, CWxP (CYS268) ve NPxxY (PRO315) rezidülerinin ise negatif BC değerlerine sahip olması (Tablo 4.5) reseptör aktivasyonu için sinyalizasyona mikro-anahtarların katkı sunabileceği hipoteziyle örtüşmektedir.

MAS reseptörüne Ang 1-7 bağlanması ile de inaktif benzeri yapıda pozitif BC'lerin fazla olması nedeniyle sinyalizasyona katkı sunarken aktif benzeri yapıda pozitif ve negatif BC'lerin sayısının azaldığı görülmüştür. Ang II bağlanması durumunda ise hem inaktif hem de aktif benzeri AT2R yapıları için pozitif BC'lerin sayısının daha fazla olduğu ve sürekli bir sinyalizasyona neden olduğu belirlenmiştir. Ligand bağlanmalarında özellikle hücre dışındaki ligand bağlanma bölgesinden başlayan sinyalizasyon reseptör aktivasyon mekanizmasına aracılık eden mikro-anahtarları oluşturan rezidüler ile hücre içine doğru devam etmektedir. AT2R'ye inaktif benzeri durumda her iki ligandın da bağlanması bu mikro-anahtarlarda bir sinyalizasyon başlatmaya aracılık ederken özellikle aktif benzeri yapıda Ang 1-7 bağlanması sinyalizasyonun azalmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. MAS reseptörü için ise inaktif benzeri durumda Ang 1-7 bağlanmasının NPxxY mikro-anahtar motifindeki rezidüleri de içeren sinyalizasyonu önemli ölçüde artırdığı fakat aktif benzeri durumda sinyalizasyonun azalsa bile sürdüğü düşünülmektedir. Her ne kadar

reseptörlere ligand bağlanması sinyalizasyonu etkilese de reseptörlerin aktivasyonlarında bu sinyalizasyonların etkisi ayrı bir tartışma konusudur.

5.3. Reseptörlerin Aktivasyon Mekanizması

A sınıfı GPCR ailesinin RAS'taki üyelerinden AT2R ve MAS reseptörlerinin ligand bağlanmasına dayalı aktivasyon mekanizmaları hakkında yeni bilgiler elde etmek amacıyla genel aktivasyon mekanizması hipotezi üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Bu hipoteze göre reseptöre ligand bağlanmasıyla hücre dışı bağlanma bölgesinden başlayarak reseptöre ait mikro-anahtar olarak bilinen korunmuş rezidü gruplarından oluşan bölgelerde meydana gelen sinyal mekanizmasının devamında hücre içi kısımda özellikle hidrofobik kilit olarak bilinen TM3 ve TM6 sarmalları arasında inaktif-aktif geçişlerde bir mesafe değişimi meydana gelmektedir. Bu mesafenin artması ise reseptörün aktif benzeri yapıya ulaştığı durumu temsil etmekte ve hücre içi kısımda G-proteinin veya β-arrestin proteininin bağlanmasına aracılık etmektedir (Zhou Q. ve ark., 2019; Hauser ve ark., 2021). TM3-TM6 hidrofobik kilit için hücre içi TM sarmalları arasındaki mesafenin ligand bağlanmasına dayalı değişim analizleri dikkate alındığında Ang 1-7'nin AT2R'ye bağlanması durumunda inaktif benzeri yapıyla Apo durumun aynı mesafeye sahip olduğu ve önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür. İnaktif benzeri AT2R'ye Ang II bağlanması durumunda TM3-TM6 arasında 1000 ns simülasyon süresi boyunca herhangi bir mesafe değişimi olmadığı görülmüştür. AT2R'ye ait aktif benzeri kristal yapı mevcutken inaktif benzeri ve ara-durum yapılarına ait yalnızca model yapıları bilindiğinden mesafe değişimlerinin değerlendirilmesi oldukça zordur. Fakat elde edilen bulgular üzerinden inaktif benzeri Apo-AT2R ve Ang 1-7 bağlı AT2R yapılarında TM3-TM6 arasındaki yaklaşık 3-4 Å kadar mesafe artışı gözlenmiş (Şekil 4.27) ve reseptörün aktivasyon mekanizmasını açıklamaya aday olmadığı düşünülmüştür. Ang II bağlı durumda ise 1000 ns simülasyon boyunca başlangıç mesafesinin değişmediği görülmüş bu nedenle de reseptörün inaktif-aktif geçişini açıklamaya yönelik anlamlı bir veri sunmamıştır. Bu durumun açıklanması için AT2R aktivasyonu konusunda iki olası yorum değerlendirilebilir: ilk olarak simülasyon süresinin ligand bağlanmasıyla konformasyonel bir geçiş için yeterli olmadığıdır (Bruce ve ark., 2018). İkinci olarak farklı iki ligand bağlanması durumunda ligandlardan bağımsız olarak AT2R'nin yapısal dinamik değişimlerine ve sinyalleşmeye sahip olmasına rağmen inaktif-aktif geçişlerinin

dimerleşmeyle gerçekleşebileceği düşüncesidir (Patel S. ve ark., 2018; Townsend-Nicholson ve ark., 2019; Rukavina Mikusic ve ark., 2020; Lazim ve ark., 2021). Aktif benzeri AT2R yapısında ise durum biraz daha farklı görünmektedir. Apo durumda aktif benzeri AT2R yapısında simülasyonun ilk 60 ns'den sonra TM3-TM6 arasındaki mesafe yaklaşık 7.5 Å kadar azalmış ve ara-durum yapısına veya inaktif benzeri yapıya doğru aktif-inaktif geçişi temsil edebileceği düşünülmüştür (Şekil 4.28). Simülasyonun son 50 ns'de bu mesafenin yaklaşık 2.5 Å kadar daha azalarak toplamda aktif yapıdaki TM3-TM6 mesafesinden yaklaşık 10 Å kadar bir azalma gözlenmesi nedeniyle Apo-AT2R'nin aktif-inaktif geçişi için ilk 60 ve son 50 ns arasında simülasyon boyunca ara-durum yapısına sahip olabileceği ihtimali ileri sürülebilir. Apo-duruma kıyasla Ang 1-7 bağlanmasıyla simülasyonun başlangıcından itibaren ilk 200-300 ns ve Ang II bağlanmasıyla da ilk 500 ns boyunca TM3-TM6 mesafesi aktif benzeri yapıdaki mesafeyi korumuş daha sonra bu mesafe azalarak Apo duruma yaklaşmıştır. Buradaki en dikkat çekici olgu ligand bağlanmasının reseptörün aktif benzeri yapıda kalma süresini uzatmaya aracılık ederek hücre içi kısımda G-proteinin veya β-arrestin proteininin bağlanma ihtimalini artırmaya yardımcı olabileceği yönündedir. Ang 1-7'nin MAS reseptörüne bağlanması durumunda ise TM3-TM6 mesafe değişimleri ile inaktif-aktif geçiş düşüncesi AT2R'ye kıyasla daha açıktır. Apo-MAS yapısına kıyasla inaktif benzeri yapıda Ang 1-7 bağlanması ile simülasyonun ilk 700 ns boyunca TM3-TM6 mesafesinde yaklaşık 5 Å kadar bir artış gözlenirken (Şekil 4.29), aktif benzeri yapıya bağlanması ile yaklaşık 7-8 Å kadar bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.30). Elde edilen bu bulgular Ang 1-7'nin MAS reseptörü aktivasyonunda aracılık edebileceğine yönelik bir düşünce oluşturmuştur. Fakat MAS reseptörünün inaktif, ara-durum ve aktif durumlarındaki kristal yapıları henüz bilinmediğinden ve ayrıca GPCR ailesinin Orphan reseptörlerinin bir üyesi olması nedeniyle henüz tüm mikro-anahtarlarının tanımlanmamış olması nedeniyle MAS reseptörünün aktivasyon mekanizmasına dair daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

A sınıfı GPCR genel aktivasyon mekanizmasını açıklamak için önerilen hipotezde değerlendirilen bir diğer parametre ise reseptörlere ait mikro-anahtar motiflerde meydana gelen yapısal değişimlerdir (Zhou Q. ve ark., 2019). Çalışmamızda AT2R ve MAS reseptörlerinin hidrofobik-kilit TM3-TM6 mesafe değişimlerinin yanı sıra DRIN

analizleriyle ligand bağlanmasına dayalı sinyal mekanizmasına ait elde edilen bulgular reseptörlere ait mikro-anahtar motiflerde pozitif ve negatif BC değerlerine sahip bir sinyalleşme olduğunu göstermiştir. AT2R ve MAS reseptörleri RAS'ta A sınıfı birer GPCR olsa da yapısal farklılıkları nedeniyle özellikle MAS reseptörünün mikro-anahtar motifleri AT2R ve genel GPCR'ler ile benzerlik göstermemektedir. MAS reseptörünün yalnızca NPxxY mikro-anahtar motifi benzerlik gösterdiği için bu çalışmada MAS aktivasyonu için sadece bu motifin yapısal değişimleri incelenmiştir. CWxP, DRY, PIF ve NPxxY mikro-anahtar motiflerini oluşturan rezidülerin dihedral açılarının MD simülasyonlar boyunca değişimleri incelendiğinde Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının AT2R'ye bağlanmasıyla Apo-duruma kıyasla bu motiflerde açısal değişimler görülse de bu değişimlerin AT2R'nin aktivasyonunu açıklamada yeterli düzeyde olmadığı düşünülmektedir. CWxP motifi AT2R'de ligand bağlanma bölgesinde bulunduğu için Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasıyla hem inaktif hem de aktif benzeri yapılar için dihedral açılarında bir değişim olacağı yönündeki düşüncemizle uyumlu olarak yaklaşık 10^{o}-30^{o}'lik bir açısal değişim görülmüştür. Sinyalizasyonu takip eden PIF motifinde ise yalnızca PHE265 rezidüsünün dihedral açılarında bir değişim görülmüş, Ang 1-7 bağlanması sadece inaktif yapıda bu değişime neden olurken Ang II bağlanması hem inaktif hem de aktif benzeri yapıda bu açısal değişime neden olmuş gibi görünmektedir. Takip eden bir diğer motif olan DRY motifinde her iki ligandın inaktif ve aktif yapılara bağlanmasıyla Apo duruma kıyasla dihedral açılarında önemli bir değişim görülmemiş ve bu durum AT2R'nin inaktif-aktif geçişlerinin gerçekleşmesinde sinyalizasyonun yetersiz kaldığı düşüncesini doğurmuştur. AT2R'de MAS reseptörü ile ortak olan NPxxY motifinde ise özellikle TM7 sarmalı üzerinde bulunan ve Na^{+} paket bölgesiyle etkileşimi sağlayan TYR318 rezidüsü ile motifin diğer rezidülerinde sadece aktif benzeri yapıda ligand bağlanmasıyla bir açısal değişim mevcut iken inaktif benzeri yapıda herhangi bir açısal değişim gerçekleşmemiştir. Bu durum da yine AT2R'nin inaktif-aktif geçişlerinin gerçekleşmesinde ligand bağlanmasıyla sinyalizasyonun yetersiz kaldığı düşüncesi hâkim olmuştur. MAS reseptöründe ise NPxxY motifinin dihedral açıları Ang 1-7 ligandının bağlanmasıyla hem inaktif hem de aktif benzeri durumlarda yaklaşık 30^{o}-120^{o}'lik önemli derecede açısal farklılıklar gözlenmiş ve MAS reseptör aktivasyonunda Ang 1-7 bağlanmasının önemli olduğu düşünülmüştür.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ang 1-7 ligandının RAS'ın koruyucu kolundaki rolü ACE2/Ang 1-7/MAS ekseninde deneysel yöntemlerle yapılan çalışmalar neticesinde belirlenmeye çalışılmıştır. Özellikle MAS reseptörüne ait kristal yapıların henüz belirlenmiş olmaması ve Ang 1-7'nin MAS reseptörüne bağlanma durumlarının araştırılması yakın zamanda ilgi çekici bir çalışma konusu olmuştur. Ayrıca AT2R'nin koruyucu kolda MAS reseptörü ile benzer role sahip olduğuna dair artan kanıtlar Ang 1-7'nin bu koruyucu kolda hangi reseptör üzerinden nasıl bir etkiye sahip olduğuna dair rolünün araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda hem Ang 1-7 hem de Ang II ligandlarının AT2R'nin inaktif ve aktif benzeri yapılarına bağlandığı ve 1 μs süreli tekrarlı MD simülasyonlar boyunca kararlı bir şekilde bağlanmayı sürdürdüğü belirlenmiştir. Bu sonuç RAS'ta her iki ligandın da AT2R'ye bağlanabileceği ve hücre içi moleküler mekanizmasına aracılık edebileceği düşüncesini doğursa bile AT2R'nin inaktif-aktif yapısal geçişlerine dair elde ettiğimiz bulgular bu iki ligandın reseptöre bağlanmasıyla yapısal dinamiklerini etkilemesine rağmen net yapısal geçişleri göstermek için henüz yeterli seviyede değildir. Buradaki en önemli sonuç aktif benzeri AT2R'ye Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanması ile reseptörün aktif benzeri yapıyı koruma, reseptörün aktif durumda kalma süresinin uzamasına yardımcı olabileceği ihtimalidir. Ang II ligandı Ang 1-7'ye kıyasla bu süreyi daha da uzatmakta ve aktif benzeri yapıya sahip reseptöre hücre içi G-protein veya β-arrestin bağlanma ihtimalini artıracak yönde reseptörün aktif benzeri yapıda kalma süresini artırmaya aracılık edebileceği yönünde bir düşünce doğurmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular AT2R'nin çalışma prensibini anlamaya yönelik katkılar sunmasına rağmen 1 μs'den daha uzun süreli MD simülasyonların çalışılması ve özellikle inaktif benzeri bir kristal yapıya sahip olmayan AT2R için deneysel yöntemler kullanılarak bu yapının elde edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Ang 1-7 ligandının AT2R ve MAS reseptörüne bağlanma durumları değerlendirildiğinde; Ang 1-7'nin aktif benzeri yapısına kıyasla inaktif benzeri AT2R'ye daha güçlü bir bağlanma sergilediği, aktif benzeri yapıda ligand bağlanmasına katkı sunan moleküler bağların sayısında önemli derece bir azalmanın meydana geldiği görülmüş ve AT2R için

inaktif-aktif yapısal geçişlerde önemli bir etkiye sahip olmadığı düşünülmüştür. Ang 1-7'nin MAS reseptörünün inaktif ve aktif benzeri yapılarına bağlandığı ve 1 μs MD simülasyonlar boyunca kararlı bir bağlanma sergilediği belirlenmiştir. Bu sonuç literatürde Ang 1-7'nin MAS reseptörüne bağlanıp bağlanmadığına dair var olan çelişkili yaklaşımları ortadan kaldırmaya adaydır. Elde edilen bulgular MAS reseptörünün inaktif-aktif geçişlerinde Ang 1-7 ligand bağlanmasının önemli bir etkiye sahip olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir.

Her ne kadar Ang 1-7 bağlanmasının MAS reseptörü aktivasyonunda rol oynadığına dair veriler elde edilmiş olsa da AT2R'nin aktivasyon mekanizmasında önemli bir role sahip olmadığına dair kesin olmayan bulgular nedeniyle RAS'ın moleküler çalışma mekanizmasını tam anlamıyla ortaya çıkarmak için henüz yetersizdir. Ayrıca literatürde AT2R ve MAS reseptörlerinin hetero-dimerleşmesiyle RAS'ta fonksiyonlarını gösterdiğine dair mevcut bulgular (Patel S. ve ark., 2018) bu iki reseptörün homo-dimer ve hetero-dimer yapılarının araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda ligand bağlanmasıyla reseptör aktivasyonunu belirlemek için A sınıfı GPCR'lerin kabul gören genel aktivasyon mekanizması ile AT2R ve MAS reseptörlerinin inaktif-aktif benzeri yapılarına Ang 1-7 ve Ang II ligandlarının bağlanmasıyla gerçekleşmesi beklenen aktivasyon mekanizmaları için elde edilen bulgular kıyaslanmıştır. AT2R, genel A sınıfı GPCR aktivasyonuna katkıda bulunan korunmuş tüm mikro-anahtarlara sahipken MAS reseptörü bu korunmuş mikro-anahtarlardan yalnızca bir tanesine sahiptir. Bu nedenle MAS reseptörü için ligand bağlanmasıyla gerçekleşen aktivasyon mekanizmasına katkı sağlayan başka mikro-anahtarların varlığının da araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

RAS moleküler mekanizmalarının belirlenmesi için tüm RAS bileşenlerinin yapılarının ve birbirleriyle olan etkileşimlerinin belirlenmesine, hücre içi G-protein ve β-arrestin bağlı yapıları ile etkileşimlerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca GPCR aktivasyon mekanizmalarına katkı sunan Na^+ paket bölgesine Na^+ bağlanması ve su moleküllerinin reseptör aktivasyonlarına katkıları ile ligand bağlanmasına dayalı enerji değişimlerinin de araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B , ve ark. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015; 1: 19-25.

Alenina N, Bader M. Ace2 in brain physiology and pathophysiology: Evidence from transgenic animal models. Neurochemical research. 2019; 44: 1323-1329.

Amamuddy OS, Glenister M, Tastan Bishop Ö. Mdm-task-web: A web platform for protein dynamic residue networks and modal analysis. bioRxiv. 2021; 19: 5059-5071.

Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. H++ 3.0: Automating p k prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. Nucleic acids research. 2012; 40: W537-W541.

Asada H, Horita S, Hirata K, Shiroishi M, Shiimura Y, Iwanari H , ve ark. Crystal structure of the human angiotensin ii type 2 receptor bound to an angiotensin ii analog. Nature structural & molecular biology. 2018; 25: 570-576.

Asada H, Inoue A, Kadji FMN, Hirata K, Shiimura Y, Im D , ve ark. The crystal structure of angiotensin ii type 2 receptor with endogenous peptide hormone. Structure. 2020; 28: 418-425. e414.

Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro MA, Santos RA. Mas and its related g protein–coupled receptors, mrgprs. Pharmacological reviews. 2014; 66: 1080-1105.

Bader M, Alenina N, Young D, Santos RA, Touyz RM. The meaning of mas. Hypertension. 2018; 72: 1072-1075.

Balakumar P, Jagadeesh G. Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin at1 receptor. Journal of molecular endocrinology. 2014; 53: R71-R92.

Barri YM. Hypertension and kidney disease: A deadly connection. Current hypertension reports. 2008; 10: 39-45.

Bekassy Z, Lopatko Fagerström I, Bader M, Karpman D. Crosstalk between the renin–angiotensin, complement and kallikrein–kinin systems in inflammation. Nature Reviews Immunology. 2022; 22: 411-428.

Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1–7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2007; 292: H666-H672.

Berendsen HJ, Postma Jv, Van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of chemical physics. 1984; 81: 3684-3690.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H , ve ark. The protein data bank. Nucleic acids research. 2000; 28: 235-242.

Bouley R, Pérodin J, Plante H, Řihakova L, Bernier SG, Maletínská L , ve ark. N-and c-terminal structure–activity study of angiotensin ii on the angiotensin at2 receptor. European journal of pharmacology. 1998; 343: 323-331.

Bowerman S, Wereszczynski J. Detecting allosteric networks using molecular dynamics simulation. Methods in enzymology. 2016; 578: 429-447.

Brown DK, Penkler DL, Sheik Amamuddy O, Ross C, Atilgan AR, Atilgan C , ve ark. Md-task: A software suite for analyzing molecular dynamics trajectories. Bioinformatics. 2017; 33: 2768-2771.

Bruce NJ, Ganotra GK, Kokh DB, Sadiq SK, Wade RC. New approaches for computing ligand–receptor binding kinetics. Current opinion in structural biology. 2018; 49: 1-10.

Capelli I, Gasperoni L, Ruggeri M, Donati G, Baraldi O, Sorrenti G , ve ark. New mineralocorticoid receptor antagonists: Update on their use in chronic kidney disease and heart failure. Journal of Nephrology. 2020; 33: 37-48.

Capote LA, Perez RM, Lymperopoulos A. Gpcr signaling and cardiac function. European journal of pharmacology. 2015; 763: 143-148.

Carey RM. The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. Advances in chronic kidney disease. 2015; 22: 204-210.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocrine reviews. 2003; 24: 261-271.

Carey RM, Wang Z-Q, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. Hypertension. 2000; 35: 155-163.

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1–7) receptor mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. Life sciences. 2006; 80: 264-268.

Chan HS, Li Y, Dahoun T, Vogel H, Yuan S. New binding sites, new opportunities for gpcr drug discovery. Trends in biochemical sciences. 2019; 44: 312-330.

Chelvanayagam G, Knecht L, Jenny T, Benner SA, Gonnet GH. A combinatorial distance-constraint approach to predicting protein tertiary models from known secondary structure. Folding and Design. 1998; 3: 149-160.

Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin ii and vascular inflammation. Med Sci Monit. 2005; 11: 194-205.

Chennubhotla C, Bahar I. Signal propagation in proteins and relation to equilibrium fluctuations. PLoS computational biology. 2007; 3: e172.

Chow BS, Allen TJ. Angiotensin ii type 2 receptor (at2r) in renal and cardiovascular disease. Clinical science. 2016; 130: 1307-1326.

Ciccarelli M, Santulli G, Pascale V, Trimarco B, Iaccarino G. Adrenergic receptors and metabolism: Role in development of cardiovascular disease. Frontiers in physiology. 2013; 4: 265.

Clayton D, Hanchapola I, Thomas WG, Widdop RE, Smith AI, Perlmutter P , ve ark. Structural determinants for binding to angiotensin converting enzyme 2 (ace2) and angiotensin receptors 1 and 2. Frontiers in Pharmacology. 2015; 6: 5.

Congreve M, de Graaf C, Swain NA, Tate CG. Impact of gpcr structures on drug discovery. Cell. 2020; 181: 81-91.

Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh ewald: An n· log (n) method for ewald sums in large systems. The Journal of chemical physics. 1993; 98: 10089-10092.

Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin ii receptors and drug discovery in cardiovascular disease. Drug discovery today. 2011; 16: 22-34.

David CC, Jacobs DJ. Principal component analysis: A method for determining the essential dynamics of proteins. Protein dynamics: Methods and protocols. 2014: 193-226.
Davies MN, Secker A, Halling-Brown M, Moss DS, Freitas AA, Timmis J , ve ark. Gpcrtree: Online hierarchical classification of gpcr function. BMC Research Notes. 2008; 1: 1-5.
Devi LA. Heterodimerization of g-protein-coupled receptors: Pharmacology, signaling and trafficking. Trends in pharmacological sciences. 2001; 22: 532-537.
Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L , ve ark. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/mas signaling pathway in cardiomyocytes. Hypertension. 2008; 52: 542-548.
Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, FABIANI ME. Angiotensin receptors: Distribution, signalling and function. Clinical science. 2001; 100: 481-492.
Dong X, Han S-k, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of gpcrs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. Cell. 2001; 106: 619-632.
Edward Zhou X, Melcher K, Eric Xu H. Structural biology of g protein-coupled receptor signaling complexes. Protein Science. 2019; 28: 487-501.
Esteban V, Heringer-Walther S, Sterner-Kock A, de Bruin R, van den Engel S, Wang Y , ve ark. Angiotensin-(1–7) and the g protein-coupled receptor mas are key players in renal inflammation. PloS one. 2009; 4: e5406.
Evans DJ, Holian BL. The nose–hoover thermostat. The Journal of chemical physics. 1985; 83: 4069-4074.
Faria-Costa G, Leite-Moreira A, Henriques-Coelho T. Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition). 2014; 33: 439-449.
Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, H Lazarus L, Xia Y. Current research on opioid receptor function. Current drug targets. 2012; 13: 230-246.
Ferrario CM. The renin-angiotensin system: Importance in physiology and pathology. Journal of cardiovascular pharmacology. 1990; 15: S1-5.
Ferreira A, Santos R. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2005; 38: 499-507.
Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. Hypertension. 2001; 38: 665-668.
Filipek S. Molecular switches in gpcrs. Current Opinion in Structural Biology. 2019; 55: 114-120.
Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. Hypertension. 1996; 28: 104-108.
Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. Journal of internal medicine. 2008; 264: 224-236.
Gaidarov I, Adams J, Frazer J, Anthony T, Chen X, Gatlin J , ve ark. Angiotensin (1–7) does not interact directly with mas1, but can potently antagonize signaling from the at1 receptor. Cellular Signalling. 2018; 50: 9-24.
Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N , ve ark. Angiotensin-(1-7) receptor mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. Regulatory peptides. 2012; 175: 30-42.

Gembardt F, Grajewski S, Vahl M, Schultheiss H-P, Walther T. Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the mas-related genes family. Molecular and cellular biochemistry. 2008; 319: 115-123.

Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong J-C, Turner AJ , ve ark. Angiotensin-converting enzyme 2: Sars-cov-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: Celebrating the 20th anniversary of the discovery of ace2. Circulation research. 2020; 126: 1456-1474.

Gironacci MM, Adamo HP, Corradi G, Santos RA, Ortiz P, Carretero OA. Angiotensin (1-7) induces mas receptor internalization. Hypertension. 2011; 58: 176-181.

Gomes ER, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. International Journal of Hypertension. 2012; 2012.

Gowers RJ, Linke M, Barnoud J, Reddy TJ, Melo MN, Seyler SL , ve ark. (2016). *Mdanalysis: A python package for the rapid analysis of molecular dynamics simulations.* Paper presented at the Proceedings of the 15th python in science conference.

Granier S, Kobilka B. A new era of gpcr structural and chemical biology. Nature chemical biology. 2012; 8: 670-673.

Hall J. Control of sodium excretion by angiotensin ii: Intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1986; 250: R960-R972.

Hall JE, Guyton AC, Brands MW. Pressure-volume regulation in hypertension. Kidney International Supplement. 1996.

Hauser AS, Kooistra AJ, Munk C, Heydenreich FM, Veprintsev DB, Bouvier M , ve ark. Gpcr activation mechanisms across classes and macro/microscales. Nature structural & molecular biology. 2021; 28: 879-888.

Heringer-Walther S, Gembardt F, Perschel FH, Katz N, Schultheiss H-P, Walther T. The genetic deletion of mas abolishes salt induced hypertension in mice. European journal of pharmacology. 2012; 689: 147-153.

Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of gpcr signaling complexes. Nature structural & molecular biology. 2018; 25: 4-12.

Hu G-M, Mai T-L, Chen C-M. Visualizing the gpcr network: Classification and evolution. Scientific reports. 2017; 7: 15495.

Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, De Groot BL , ve ark. Charmm36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. Nature methods. 2017; 14: 71-73.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. Vmd: Visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics. 1996; 14: 33-38.

Hunter JD. Matplotlib: A 2d graphics environment. Computing in science & engineering. 2007; 9: 90-95.

Ibrahim MM. Ras inhibition in hypertension. Journal of Human Hypertension. 2006; 20: 101-108.

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A , ve ark. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin ii type-2 receptor. Nature. 1995; 377: 748-750.

Isberg V, Mordalski S, Munk C, Rataj K, Harpsøe K, Hauser AS , ve ark. Gpcrdb: An information system for g protein-coupled receptors. Nucleic acids research. 2016; 44: D356-D364.

Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O , ve ark. Regulation of blood pressure by the type 1a angiotensin ii receptor gene. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995; 92: 3521-3525.
Jackson T, Blair L, Marshall J, Goedert M, Hanley M. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. Nature. 1988; 335: 437-440.
Jan Danser A, Batenburg WW, van Esch JH. Prorenin and the (pro) renin receptor—an update. Nephrology Dialysis Transplantation. 2007; 22: 1288-1292.
Jo S, Kim T, Im W. Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations. PloS one. 2007; 2: e880.
Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. Charmm-gui: A web-based graphical user interface for charmm. Journal of computational chemistry. 2008; 29: 1859-1865.
Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. The Journal of chemical physics. 1983; 79: 926-935.
Karnik SS, Singh KD, Tirupula K, Unal H. Significance of angiotensin 1–7 coupling with mas1 receptor and other gpcrs to the renin-angiotensin system: Iuphar review 22. British journal of pharmacology. 2017; 174: 737-753.
Kasahara K, Fukuda I, Nakamura H. A novel approach of dynamic cross correlation analysis on molecular dynamics simulations and its application to ets1 dimer–DNA complex. PloS one. 2014; 9: e112419.
Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the g protein–coupled receptor superfamily. Annual review of pharmacology and toxicology. 2013; 53: 531-556.
Kemp BA, Howell NL, Keller SR, Gildea JJ, Shao W, Navar LG , ve ark. Defective renal angiotensin iii and at2 receptor signaling in prehypertensive spontaneously hypertensive rats. Journal of the American Heart Association. 2019; 8: e012016.
Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacological reviews. 2007; 59: 251-287.
Kooistra AJ, Mordalski S, Pándy-Szekeres G, Esguerra M, Mamyrbekov A, Munk C , ve ark. Gpcrdb in 2021: Integrating gpcr sequence, structure and function. Nucleic Acids Research. 2021; 49: D335-D343.
Lazard D, Villageois P, BRIEND-SUTREN MM, Cavaille F, Bottari S, Strosberg AD , ve ark. Characterization of a membrane glycoprotein having pharmacological and biochemical properties of an at2 angiotensin ii receptor from human myometrium. European journal of biochemistry. 1994; 220: 919-926.
Lazim R, Suh D, Lee JW, Vu TNL, Yoon S, Choi S. Structural characterization of receptor–receptor interactions in the allosteric modulation of g protein-coupled receptor (gpcr) dimers. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22: 3241.
Leung PS. The peptide hormone angiotensin ii: Its new functions in tissues and organs. Current Protein and Peptide Science. 2004; 5: 267-273.
Leung PS. The renin-angiotensin system: Current research progress in the pancreas: The ras in the pancreas. 2010.
Li Y, Li X-h, Yuan H. Angiotensin ii type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. Cardiovascular diagnosis and therapy. 2012; 2: 56.

Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. Opm database and ppm web server: Resources for positioning of proteins in membranes. Nucleic acids research. 2012; 40: D370-D376.

Lula I, Denadai ÂL, Resende JM, de Sousa FB, de Lima GF, Pilo-Veloso D , ve ark. Study of angiotensin-(1–7) vasoactive peptide and its β-cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific nmr assignments and structural studies. Peptides. 2007; 28: 2199-2210.

Maestro S. Maestro. Schrödinger, LLC, New York, NY. 2020; 2020.

Mario ÉG, Santos SHS, Ferreira AVM, Bader M, Santos RAS, Botion LM. Angiotensin-(1–7) mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. Peptides. 2012; 33: 174-177.

Martínez L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. PloS one. 2015; 10: e0119264.

Mendoza-Torres E, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE , ve ark. Ace2 and vasoactive peptides: Novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. Therapeutic advances in cardiovascular disease. 2015; 9: 217-237.

Michaud-Agrawal N, Denning EJ, Woolf TB, Beckstein O. Mdanalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. Journal of computational chemistry. 2011; 32: 2319-2327.

Miura S-i, Karnik SS. Angiotensin ii type 1 and type 2 receptors bind angiotensin ii through different types of epitope recognition. Journal of hypertension. 1999; 17: 397-404.

Morales R, Watier Y, Böcskei Z. Human prorenin structure sheds light on a novel mechanism of its autoinhibition and on its non-proteolytic activation by the (pro) renin receptor. Journal of molecular biology. 2012; 421: 100-111.

Morra G, Verkhivker G, Colombo G. Modeling signal propagation mechanisms and ligand-based conformational dynamics of the hsp90 molecular chaperone full-length dimer. PLoS computational biology. 2009; 5: e1000323.

Murray E, Tomaszewski M, Guzik TJ. Binding of sars-cov-2 and angiotensin-converting enzyme 2: Clinical implications. Cardiovascular Research. 2020; 116: e87-e89.

Musial DC, Miranda-Ferreira R, Padin JF, Arranz-Tagarro JA, Parra-Vitela AJ, Jurkiewicz A , ve ark. Function of at1 and at2 receptors in atrial contractions from spontaneous hypertensive and diabetic-induced streptozotocin rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2018; 45: 1274-1285.

Nehme A, Zouein FA, Deris Zayeri Z, Zibara K. An update on the tissue renin angiotensin system and its role in physiology and pathology. Journal of cardiovascular development and disease. 2019; 6: 14.

Ng K, Vane J. Conversion of angiotensin i to angiotensin ii. Nature. 1967; 216: 762-766.

Pándy-Szekeres G, Munk C, Tsonkov TM, Mordalski S, Harpsøe K, Hauser AS , ve ark. Gpcrdb in 2018: Adding gpcr structure models and ligands. Nucleic acids research. 2018; 46: D440-D446.

Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. Journal of Applied physics. 1981; 52: 7182-7190.

Patel S, Hussain T. Dimerization of at 2 and mas receptors in control of blood pressure. Current hypertension reports. 2018; 20: 1-9.

Patel VB, Zhong J-C, Grant MB, Oudit GY. Role of the ace2/angiotensin 1–7 axis of the renin–angiotensin system in heart failure. Circulation research. 2016; 118: 1313-1326.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. Physiological reviews. 2006; 86: 747-803.

Penkler DL, Tastan Bishop Ö. Modulation of human hsp90α conformational dynamics by allosteric ligand interaction at the c-terminal domain. Scientific Reports. 2019; 9: 1600.

Pinheiro SV, Ferreira AJ, Kitten GT, Da Silveira KD, Da Silva DA, Santos SH , ve ark. Genetic deletion of the angiotensin-(1–7) receptor mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. Kidney international. 2009; 75: 1184-1193.

Prokop JW, Petri V, Shimoyama ME, Watanabe IK, Casarini DE, Leeper TC , ve ark. Structural libraries of protein models for multiple species to understand evolution of the renin-angiotensin system. General and comparative endocrinology. 2015; 215: 106-116.

Prokop JW, Santos RA, Milsted A. Differential mechanisms of activation of the ang peptide receptors at1, at2, and mas: Using in silico techniques to differentiate the three receptors. PLoS One. 2013; 8: e65307.

Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgereit J, Bader M , ve ark. Ablation of angiotensin (1-7) receptor mas in c57bl/6 mice causes endothelial dysfunction. Journal of the American Society of Hypertension. 2008; 2: 418-424.

Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, Warnecke C, Fleck E. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. Journal of molecular medicine. 1996; 74: 233-251.

Rodrigues Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL, Simoes-e-Silva AC. The anti-inflammatory potential of ace2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis: Evidence from basic and clinical research. Current Drug Targets. 2017; 18: 1301-1313.

Ross C, Nizami B, Glenister M, Sheik Amamuddy O, Atilgan AR, Atilgan C , ve ark. Mode-task: Large-scale protein motion tools. Bioinformatics. 2018; 34: 3759-3763.

Rukavina Mikusic NL, Silva MG, Pineda AM, Gironacci MM. Angiotensin receptors heterodimerization and trafficking: How much do they influence their biological function? Frontiers in Pharmacology. 2020; 11: 1179.

Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJ. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. Journal of computational physics. 1977; 23: 327-341.

Saavedra JM. Covid-19, angiotensin receptor blockers, and the brain. Cellular and Molecular Neurobiology. 2020; 40: 667-674.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via akt-dependent pathways. Hypertension. 2007; 49: 185-192.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SlP. Angiotensin-(1–7): An update. Regulatory peptides. 2000; 91: 45-62.

Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, de Paula RD , ve ark. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor mas knockout mice. Hypertension. 2006; 47: 996-1002.

Santos RA, e Silva ACS, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I , ve ark. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the g protein-coupled receptor mas. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003; 100: 8258-8263.

Santos RA, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2–angiotensin (1–7)–mas axis. Experimental physiology. 2008a; 93: 519-527.

Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M , ve ark. The ace2/angiotensin-(1–7)/mas axis of the renin-angiotensin system: Focus on angiotensin-(1–7). Physiological reviews. 2017.

Santos SHS, Andrade JMO. Angiotensin 1–7: A peptide for preventing and treating metabolic syndrome. Peptides. 2014; 59: 34-41.

Santos SHS, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AVM, Pôrto LCJ, Alvarez-Leite JI , ve ark. Mas deficiency in fvb/n mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. Diabetes. 2008b; 57: 340-347.

Savoia C, Touyz RM, Volpe M, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. Hypertension. 2007; 49: 341-346.

Schneider J, Korshunova K, Musiani F, Alfonso-Prieto M, Giorgetti A, Carloni P. Predicting ligand binding poses for low-resolution membrane protein models: Perspectives from multiscale simulations. Biochemical and biophysical research communications. 2018; 498: 366-374.

Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1998; 274: R263-R279.

Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM. Angiotensin ii is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. Circulation research. 1993; 72: 1245-1254.

Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G. The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of n-glycosylation. Molecular pharmacology. 1994; 45: 1112-1118.

Sethi A, Eargle J, Black AA, Luthey-Schulten Z. Dynamical networks in trna: Protein complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009; 106: 6620-6625.

Seyedabadi M, Gharghabi M, Gurevich EV, Gurevich VV. Structural basis of gpcr coupling to distinct signal transducers: Implications for biased signaling. Trends in biochemical sciences. 2022.

Simões e Silva A, Silveira K, Ferreira A, Teixeira M. Ace2, angiotensin-(1-7) and m as receptor axis in inflammation and fibrosis. British journal of pharmacology. 2013; 169: 477-492.

Singh KD, Karnik SS. Angiotensin receptors: Structure, function, signaling and clinical applications. Journal of cell signaling. 2016; 1.

Singh KD, Karnik SS. Angiotensin type 1 receptor blockers in heart failure. Current drug targets. 2020; 21: 125-131.

Sköld C, Nikiforovich G, Karlén A. Modeling binding modes of angiotensin ii and pseudopeptide analogues to the at2 receptor. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2008; 26: 991-1003.

Sobrino A, Vallejo S, Novella S, Lázaro-Franco M, Mompeón A, Bueno-Betí C , ve ark. Mas receptor is involved in the estrogen-receptor induced nitric oxide-dependent vasorelaxation. Biochemical Pharmacology. 2017; 129: 67-72.

Solinski HJ, Gudermann T, Breit A. Pharmacology and signaling of mas-related g protein–coupled receptors. Pharmacological reviews. 2014; 66: 570-597.

Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsou M, Coffman TM. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. Comprehensive Physiology. 2014; 4: 1201.

Spyroulias GA, Nikolakopoulou P, Tzakos A, Gerothanassis IP, Magafa V, Manessi-Zoupa E , ve ark. Comparison of the solution structures of angiotensin i & ii: Implication for structure-function relationship. European journal of biochemistry. 2003; 270: 2163-2173.

Stevens RC, Cherezov V, Katritch V, Abagyan R, Kuhn P, Rosen H , ve ark. The gpcr network: A large-scale collaboration to determine human gpcr structure and function. Nature reviews Drug discovery. 2013; 12: 25-34.

Stroth U, Unger T. The renin-angiotensin system and its receptors. Journal of cardiovascular pharmacology. 1999; 33: S21-S28.

Sumners C, de Kloet AD, Krause EG, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin type 2 receptors: Blood pressure regulation and end organ damage. Current opinion in pharmacology. 2015; 21: 115-121.

Suzuki S, Iida M, Hiroaki Y, Tanaka K, Kawamoto A, Kato T , ve ark. Structural insight into the activation mechanism of mrgd with heterotrimeric gi-protein revealed by cryo-em. Communications Biology. 2022; 5: 707.

Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. American journal of physiology-heart and circulatory physiology. 2005; 289: H1560-H1566.

Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, Klein S, Uhlich A, Trebicka J , ve ark. G-protein–coupled receptor mrgd is a receptor for angiotensin-(1–7) involving adenylyl cyclase, camp, and phosphokinase a. Hypertension. 2016; 68: 185-194.

Thomas WG, Qian H. Arresting angiotensin type 1 receptors. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2003; 14: 130-136.

Tirupula KC, Desnoyer R, Speth RC, Karnik SS. Atypical signaling and functional desensitization response of mas receptor to peptide ligands. PLoS One. 2014; 9: e103520.

Townsend-Nicholson A, Altwaijry N, Potterton A, Morao I, Heifetz A. Computational prediction of gpcr oligomerization. Current opinion in structural biology. 2019; 55: 178-184.

Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. The American journal of cardiology. 2002; 89: 3-9.

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P , ve ark. Angiotensin receptors. Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension. 1996; 14: S95-103.

Vallotton M. The renin-angiotensin system. Trends in Pharmacological Sciences. 1987; 8: 69-74.

Vyas VK, Ghate M, Patel K, Qureshi G, Shah S. Homology modeling, binding site identification and docking study of human angiotensin ii type i (ang ii-at1) receptor. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2015; 74: 42-48.

Wang J, Gareri C, Rockman HA. G-protein–coupled receptors in heart disease. Circulation research. 2018; 123: 716-735.
Wang Y, Shoemaker R, Powell D, Su W, Thatcher S, Cassis L. Differential effects of mas receptor deficiency on cardiac function and blood pressure in obese male and female mice. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2017; 312: H459-H468.
Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using modeller. Current protocols in bioinformatics. 2016; 54: 5.6. 1-5.6. 37.
White KL, Eddy MT, Gao Z-G, Han GW, Lian T, Deary A , ve ark. Structural connection between activation microswitch and allosteric sodium site in gpcr signaling. Structure. 2018; 26: 259-269. e255.
Wong MK-S. Angiotensin converting enzyme. In Handbook of hormones. Elsevier; 2021, p. 505-508.
Wu C-H, Mohammadmoradi S, Chen JZ, Sawada H, Daugherty A, Lu HS. Renin-angiotensin system and cardiovascular functions. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2018; 38: e108-e116.
Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM , ve ark. (2014). Charmm-gui membrane builder toward realistic biological membrane simulations. In: Wiley Online Library.
Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM , ve ark. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in mas gene-deleted mice. Hypertension. 2008; 51: 574-580.
Xu X, Yan C, Zou X. Mdockpep: An ab-initio protein–peptide docking server. Journal of computational chemistry. 2018; 39: 2409-2413.
Yamaguchi H, Gomez RA, Sequeira-Lopez MLS. Renin cells, from vascular development to blood pressure sensing. Hypertension. 2023.
Yan C, Xu X, Zou X. Fully blind docking at the atomic level for protein-peptide complex structure prediction. Structure. 2016; 24: 1842-1853.
Yasar E, Yasar MM, Dogru S, Yaras N, Eroglu E. Effects of angiotensin 1-7 binding on the dynamics of human mas proto-oncogene, gpcr: A molecular dynamics study. Journal of Computational Biophysics and Chemistry. 2023.
Yi W, Chen F, Zhang H, Tang P, Yuan M, Wen J , ve ark. Role of angiotensin ii in aging. Frontiers in Aging Neuroscience. 2022; 14: 1002138.
Young D, O'Neill K, Jessell T, Wigler M. Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988; 85: 5339-5342.
Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. Cell. 1986; 45: 711-719.
Zhang D, Liu Y, Zaidi SA, Xu L, Zhan Y, Chen A , ve ark. Structural insights into angiotensin receptor signaling modulation by balanced and biased agonists. The EMBO Journal. 2023: e112940.
Zhang H, Han GW, Batyuk A, Ishchenko A, White KL, Patel N , ve ark. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin ii receptors. Nature. 2017; 544: 327-332.

Zhang H, Luginina A, Mishin A, Baidya M, Shukla AK, Cherezov V. Structural insights into ligand recognition and activation of angiotensin receptors. Trends in pharmacological sciences. 2021; 42: 577-587.
Zhang H, Unal H, Desnoyer R, Han GW, Patel N, Katritch V , ve ark. Structural basis for ligand recognition and functional selectivity at angiotensin receptor*♦. Journal of Biological Chemistry. 2015; 290: 29127-29139.
Zhang T, Li Z, Dang H, Chen R, Liaw C, Tran T-A , ve ark. Inhibition of mas g-protein signaling improves coronary blood flow, reduces myocardial infarct size, and provides long-term cardioprotection. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2012; 302: H299-H311.
Zhou A, Carrell RW, Murphy MP, Wei Z, Yan Y, Stanley PL , ve ark. A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release. Nature. 2010; 468: 108-111.
Zhou Q, Yang D, Wu M, Guo Y, Guo W, Zhong L , ve ark. Common activation mechanism of class a gpcrs. Elife. 2019; 8: e50279.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ekrem	**Uyruğu**	T.C.
Soyadı	YAŞAR	**Tel no**	
Doğum tarihi		**e-posta**	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		**Mezuniyet yılı**
Lisans	Atatürk Üniversitesi – Fizik Atatürk Üniversitesi – Matematik (Çift Anadal)	2008 2008
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi – Astrofizik	2012
Yüksek Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi – Fizik Müh. *	2010-
Doktora	Atatürk Üniversitesi – Astronomi ve Astrofizik *	2012-2014
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi – Biyofizik *	2015-
Doktora	Akdeniz Üniversitesi – Biyofizik	2023

***Devamsız, İlişik kesildi**

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (yıl-yıl)**
Öğr. Gör.	Avrasya Üniversitesi	2013-2014
Araş. Gör.	Erzincan Üniversitesi	2014-2016
Araş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2016-2023

Yabancı Dilleri	**Sınav türü**	**Puanı**
İngilizce	YDS	66,50
İngilizce	YÖKDİL	73,50

Proje Deneyimi

Proje Adı	**Destekleyen kurum**	**Süre (Yıl-Yıl)**
FGF Receptor Structure, Dynamics and Function **(Araştırmacı)**	New York University Medical Chemistry (Manhattan, USA) NIH Project	02-08.2022
Understanding Role of Calcium Ions in Cardiac Muscle Contraction **(Yürütücü)**	University of Helsinki Biophysical Chemistry (Helsinki, Finland) HPC-Europa3 HORIZON2020 (Project ID: HPC17GL2UO)	05-08.2021

Anjiyotensin 1-7 Peptidinin Anjiyotensin Tip2 Reseptör ve Proto-Onkogen MAS Reseptörüyle Etkileşimlerinin in-silico Yöntemlerle İncelenmesi **(Araştırmacı)**	Akdeniz Üniversitesi (Antalya, Türkiye) BAP (Proje No: TDK-2021-5449)	2021-2023
Küçük İletkenlikli Mekanosensitif İyon Kanalı (MscS)'nın Antibakteriyel İlaç Hedefi Olarak Yapısal Değişimlerinin İncelenmesi **(Araştırmacı)**	Akdeniz Üniversitesi (Antalya, Türkiye) BAP (Proje No: TDK-2021-5602)	2021-2023

Burslar-Ödüller:

1. **EBSA Scholarship,** XXIV School of Pure and Applied Biophysics, Instituto Veneto di Scienze Lettere and Arti, Italy 2020
2. **HPC-Europa3,** HORIZON2020 Project Bursary, CSC-Finland Computation Grant, Finland 2021
3. **Internship,** New York University International Fellowship, USA 2022
4. **Erasmus+ Staff Mobility,** Medical University of Warsaw, Poland 2022

Yayınlar ve Bildiriler:

1. **Yasar E**, Yasar MM, Dogru S, Yaras N, Eroglu E. "Effects of Angiotensin 1-7 Binding on the Dynamics of Human MAS Proto-oncogene, GPCR: A Molecular Dynamics Study." *Journal of Computational Biophysics and Chemistry* (2023): 1-18.
2. Yasar MM, **Yasar E**, Yorulmaz N, Tenekeci E, Sarpun İH, Eroglu E. "An in silico investigation of allosteric inhibition potential of Dihydroergotamine against Sars-CoV-2 Main Protease (MPro)." *Turkish Computational and Theoretical Chemistry* 7.1 (2023): 14-36.
3. Dogru S, **Yasar E**, Yesilkaya A. "Uric acid can enhance MAPK pathway-mediated proliferation in rat primary vascular smooth muscle cells via controlling of mitochondria and caspase-dependent cell death." *Journal of Receptors and Signal Transduction* 42.3 (2022): 293-301.

4. Yaras N, Dalaman U, **Yasar E**. “Angiotensin 1-7 Prevents Ventricular Diastolic Dysfunction in Diabetic Cardiomyopathy.” *4th International 33rd National Biophysics Congress* 156 (2022).
5. **Yasar E**, Eroglu E, Yaras N. “An Investigation Effect of Ang II and Ang (1-7) Binding on The Dynamics of AT2 Receptor by Micro-Second MD Simulations.” *4th International 33rd National Biophysics Congress* 77 (2022).
6. Dogru S, **Yasar E**, Yesilkaya A. “Uric Acid may Induce Proliferation of Rat Primary Vascular Smooth Muscle Cells Through Mapk Signaling Pathways via Triggers Inhibition of Apoptosis via Mitochondrial and Caspase-Dependently.” *Turkish Journal of Biochemistry* 46.3 (2021): 45.
7. **Yasar E**, Savas K, Yaras N. “Rat Caudal Nerve Conduction Block Using High Frequency Sinusoidal Current.” *28-29th 33rd National Biophysics Congress (2017).*