

**İNSAN MUTANT AQUAPORIN-2 (AQP2)
PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK
SİMÜLASYONLARI İLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE HUMAN MUTANT
AQUAPORIN-2 (AQP2) PROTEINS WITH MOLECULAR
DYNAMICS SIMULATIONS**

EMİNE DENİZ TEKİN

PROF. DR. HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

İNSAN MUTANT AQUAPORIN-2 (AQP2) PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI İLE İNCELENMESİ

Emine Deniz TEKİN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Eylül 2023, 72 sayfa

Aquaporin-2 böbrek toplama kanalındaki hücrelerin apikal membranında yer alan, suyun geri emilimini ve idrar konsantrasyonunu düzenlemek için vazopressin tarafından aktive edilen bir kanal proteindir. Aquaporin-2 proteini üzerindeki mutasyonlar, proteinin yapısını ve fonksiyonunu bozarak böbreklerde suyun geri emilimini etkileyebilir; bu da aşırı idrara çıkma ile karakterize “Nefrojenik Diabetes İnsipidus” isimli nadir böbrek hastalığına yol açabilir.

Bu çalışmanın amacı, “Nefrojenik Diabetes İnsipidus” tanısı konmuş hastaların Aquaporin-2 geninde tanımlanmış ve fonksiyon analizleri yapılmış A45T, R85X ve A147T mutasyonlarının modellenerek, moleküler dinamik simülasyonlarının yapılması ve sonuçların deneysel veriler ve diğer simülasyon sonuçları ile karşılaştırılmasıdır. Yapılan moleküler dinamik simülasyonları yardımıyla, suyun hücre membranından geçişi moleküler düzeyde gösterilerek, yabancıl tip Aquaporin-2 ve mutantlarının kanal yapısı incelenmiştir. Sonuç olarak tez kapsamında modellenen mutant proteinlerin yabancıl tip Aquaporin-2’ye göre farklı oranlarda su moleküllerini geçirdiği, dolayısıyla farklı oranlarda fonksiyon değişiklikleri gösterdikleri bulunmuştur. Tez çalışmasından elde edilen bütün sonuçların su dengesi ile ilgili hastalıkların anlaşılmasına, ilgili tedavi-ilaç yöntemlerinin bulunmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nefrojenik Diabetes İnsipidus, Aquaporin-2, Moleküler Dinamik

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE HUMAN MUTANT AQUAPORIN-2 (AQP2) PROTEINS WITH MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS

Emine Deniz TEKİN

Master of Sciences, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

September 2023, 72 pages

Aquaporin-2 is a channel protein located in the apical membrane of cells in the renal collecting duct, activated by vasopressin to regulate water reabsorption and urine concentration. Mutations on the Aquaporin-2 protein may affect the reabsorption of water in the kidneys disrupting the structure and function of the protein; leading to a rare kidney disease characterized by excessive urination known as Nephrogenic Diabetes Insipidus.

This study aims to model and perform molecular dynamics simulations of the A45T, R85X, and A147T mutations identified and functionally analyzed in the Aquaporin-2 gene of patients diagnosed with Nephrogenic Diabetes Insipidus and to compare the results with experimental and other simulation results. Through the use of molecular dynamics simulations, the passage of water through the cell membrane has been demonstrated at the molecular level, and the channel structure of wild-type Aquaporin-2 and its mutants has been investigated. As a result, it has been observed that the modeled mutant proteins within the scope of the thesis allow the passage of water molecules at different rates compared to wild-type Aquaporin-2, and thus show varying degrees of functional changes. It is believed that all the results obtained from the thesis study will contribute to understanding the diseases related to water balance and the development of relevant treatment-drug methods.

Keywords: Nephrogenic Diabetes Insipidus, Aquaporin-2, Molecular Dynamics

TEŞEKKÜR

Fiziğin temel kanunlarını kullanarak modellediğim biyolojik sistemleri daha iyi anlayabilmek için bu yüksek lisans programına başvurduğum. Beni öğrenci olarak kabul eden, dünyanın en pozitif, güler yüzlü, enerji dolu insanlarından kıymetli hocam Prof. Dr. Hatice Mergen'e ne kadar teşekkür etsem azdır. Doktora tezi ile yüksek lisans tezi sıralamasını karıştırmış benim gibi bir öğrencinin danışmanlığını kabul etti ve ben bu programdan çok şey öğrendim. Üzerinde çalıştığımız araştırma problemi de son derece keyifliydi ve sonuçta bu teze dönüştü. Arkadaşım Dr. Ömer Toprak ile proje öğrencilerim Begüm ve Berkan'a bu çalışmadaki yardımları için ayrıca teşekkür ediyorum.

Yeniden öğrenci olmak her ne kadar heyecanlı olsa da evde kızım Elif Ada, oğlum Hüseyin Çınar ve eşim Bayram bu süreçte bana destek olmak durumunda kaldılar. Onlara da teşekkür ediyorum ve çok seviyorum.

Bu tezi yazarken içtiğim kahvelerin sponsoru olan Volkan'a ve soğuk görüntüsü altında yaptığı müthiş esprileriyle beni hep güldüren eşi Özibuzi'ne hayatıma renk kattığı için... İpek'ime her zaman kendisine güvenebildiğim için...

Sevinç'ime, benim gönüllü psikoloğum olup, bıkmadan-usanmadan dinlediği ve gözlerinden fişkıran güzel enerji için...

Dünyalar güzeli diyetisyenim Nazlı Koşar Başaran'a, bana hem kötü beslenmeye hem de insanlara karşı "hayır" diyebilmeyi öğrettiği için...

Seher Abla'm ve Mahmut Abi'ne evlerini, gönüllerini açtıkları için...

Erkam, Zeynep, Eşref ve Müşerref'e geçirdiğimiz ve geçireceğimiz Hollanda gezilerimiz için...

Tezimin önemli bir kısmını yazdığım Bilkent 2 Park Sitesi Starbucks'ın güler yüzlü personeline, özellikle Ayşe Demir'e mükemmel kahveleri ve sıcak sohbeti için...

Annem, babam, kardeşim Metin, Gülten ve Emine'ye manevi destekleri için...

Sonsuz teşekkür ediyorum...

Ayrıca 2023 Şubat ayında ailemi ziyaret için gittiğim Adıyaman'da bölgede yıkıma yol açan büyük depremi yaşadım. Yakınlarımdan 14 kişi göçük altında kaldı ve hayatlarını kaybettiler. Bu tezi onlara adıyorum.

E. Deniz TEKİN
Eylül 2023, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akuaporinler.....	3
2.2. Aquaporin-2 ve Nefrojenik Diabetes İnsipidus (NDI).....	5
2.3. Moleküler Dinamik Simulasyonlarının Kullanım Amaçları.....	7
3. HESAPLAMALI ÇALIŞMALAR.....	9
3.1. Sistemlerin Hazırlanması.....	9
3.1.1. Eksik Residülerin Tamamlanması.....	9
3.1.2. Nokta Mutasyonların Yapılması.....	10
3.1.3. wt-AQP2 ve Mutantlarının Model Böbrek Zarına Gömülmesi.....	11
3.2. Moleküler Dinamik Simulasyonları.....	13
3.2.1. Moleküler Dinamiğin Temel Fikri.....	13
3.2.2. Simulasyon Detayları.....	14
3.2.2.1. AQP2 ve Mutantlarının MD Simulasyonları.....	14
3.2.2.2. Membrana Gömülü AQP2 ve Mutantlarının MD Simulasyonları.....	15
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	17

4.1. Kök-Ortalama-Kare Sapmaları (Root Mean Square Deviation: RMSD).....	17
4.2. Kök-Ortalama-Kare Dalgalanmaları (Root Mean Square Deviation: RMSF)....	20
4.3. Hidrojen Bağları	23
4.4. Su Dinamiği: Python	32
5. YORUM.....	37
KAYNAKLAR	39
EKLER.....	45
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	45
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	AQP proteinlerinin a) ikincil, b) üçüncül ve c) dördüncül yapıları.....	5
Şekil 2.2.	AQP2 proteininin a) hücre dışı görünümü b) yandan görünümü.....	6
Şekil 3.1.	Heterojen membran protein kompleksi.	13
Şekil 4.1.	İnsan AQP2 proteini ve mutantlarının denge MD simülasyon süresinin bir fonksiyonu olarak a) membran varlığında b) membran yokluğunda RMSD grafikleri.....	19
Şekil 4.2.	Membran varlığında, wt-AQP2 ve mutantlarına ait monomerlerin a) Monomer A b) Monomer B c) Monomer C d) Monomer D rezidü başına RMSF değerleri.	21
Şekil 4.3.	a) wt-AQP2 b) A45T-AQP2 c) A147T-AQP2 ait her bir monomerin moleküler hizalaması (Monomer A: Mavi, Monomer B: Kırmızı, Monomer C: Sarı, Monomer D: Yeşil).	22
Şekil 4.4.	200ns'lık üretim MD simülasyonları boyunca wt-AQP2 ve mutantlarının her birinin ana zincirleri arasında oluşan toplam H-bağı sayısının zamana göre değişimi.	23
Şekil 4.5.	wt-AQP2 proteini ve A45T-AQP2 mutant proteininin mutasyon bölgelerinin a) 200 ns'lık simülasyon süresi boyunca ana zincir ile yaptığı H-bağı sayıları b) wt-AQP2 c) A45T-AQP2 için 200 ns sonundaki yapının H-bağlarını gösteren anlık resim (kesikli kırmızı çizgiler H-bağlarını temsil etmektedir).....	24
Şekil 4.6.	wt-AQP2 proteini ve A147T-AQP2 mutant proteininin mutasyon bölgelerinin a) 200 ns'lık simülasyon süresi boyunca ana zincir ile yaptığı H-bağı sayıları b) wt-AQP2 c) A147T-AQP2 için 200 ns sonundaki yapının H-bağlarını gösteren anlık resim (kesikli kırmızı çizgiler H-bağlarını temsil etmektedir).....	25
Şekil 4.7.	a) wt-AQP2 ve A45T-AQP2 ile b) wt-AQP2 ve A147T-AQP2 proteinlerinin mutasyon bölgelerinin 200 ns'lık simülasyon süresi boyunca su molekülleri ile yaptığı H-bağı sayıları.	26

Şekil 4.8.	a) NPA bölgesindeki N68 (Yeşil), N184 (Mavi) ve her iki rezidünün NH ₂ uçları (Kırmızı), b) NPA'nın su molekülleri ile etkileşimi (68-69-70: Yeşil ve 184-185-186: Mavi) c) ar/R SF bölgesindeki F48 (Mor), H172 (Açık Mavi) ve R187 (Beyaz) d) ar/R SF bölgesinin su molekülleri ile etkileşimi.....	28
Şekil 4.9.	200 ns'lık MD üretim simülasyonu boyunca a) wt-AQP2, b) AQP2-A45T ve c) AQP2-A147T proteinlerinin her bir monomeri için ar/R SF bölgesindeki His172'nin NE2 nitrojen atomu ile Arg187'nin NE nitrojen atomu arasındaki mesafe.....	30
Şekil 4.10.	SF bölgesinde bulunan His172'nin NE2 nitrojen atomu ile Arg187'nin NE nitrojen atomu arasındaki mesafenin a) wt-AQP2 (45A: Yeşil) b) A45T-AQP2 (45T: Magenta) ve c) A147T-AQP2 (147T: Mor) yapıları için yakından görünümü.	31
Şekil 4.11.	200 ns üretim MD simülasyonları boyunca kanal proteinlerden geçen su molekülü sayıları.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 4nef.pdb yapısındaki eksik rezidüler.	10
Çizelge 3.2. a) wt-AQP2, AQP2-A45T ve AQP2-A147T mutantlarının b) AQP2-R85 mutantının oturtulduğu membranların lipid tipi ve sayıları.	12
Çizelge 4.1. 200 ns üretim MD simülasyonları sonunda kanal proteinlerinden geçen toplam su molekülü sayıları.	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A°	Angstrom
nm	Nanometre

Kısaltmalar

ADH	Vazopressin
AQP	Aquaporin
AQP2	Aquaporin 2
AVPR2	Vasopressin type-2 receptor gene
ER	Endoplazmik Retikulum
MD	Moleküler Dinamik
NDI	Nefrojenik Diyabet İnsipidus
RMSD	Kök-Ortalama-Kare Sapmaları
RMSF	Kök-Ortalama-Kare Dalgalanmaları
wt-AQP2	Yabanıl tip AQP2

1. GİRİŞ

Aquaporin 2 (AQP2), suyun hücre zarından geçişini düzenleyen su kanalı proteinleri olarak bilinen “aquaporin (AQP)” ailesine ait bir protein olup, temel işlevi su homeostazını korumak için böbreklerde suyun hücre içine geri emilimini kolaylaştırmaktır. AQP2 proteini böbrek tübüllerinde bulunan hücrelerde üretilir ve vazopressin (ADH) hormonunun etkisiyle aktive edilerek hücre zarına getirilir. Vücuttaki su dengesi ile idrar yoğunluğunun düzenlenmesinde dolayısıyla da elektrolit dengesinin korunmasında önemli rolü vardır. Diğer AQP’ lerde olduğu gibi, AQP2’de her biri kendi içerisinde kanal görevi gören dört tane özdeş alt birimden oluşur. Her birim, hücre zarında bulunan 6 tane transmembran heliks ile hücre içi ve dışı bölgelerde bulunan 5 tane döngüden oluşmaktadır [1, 2].

AQP2 genindeki mutasyonların çoğu, AQP2 proteininin normal işlevini etkileyecek şekilde yanlış 3-boyutlu şekle katlanmasına neden olmaktadır ki bu da böbreklerin idrarı düzgün şekilde konsantre edememesiyle karakterize, aşırı idrara çıkma ve su kaybına neden olan Nefrojenik Diyabet İnsipidus (NDI) olarak adlandırılan nadir bir hastalığa yol açmaktadır [3-12]. Mergen ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada [13] santral ya da nefrojenik diyabet insipidus tanısı konmuş 15 Türk hastaya ait AVPR2, AVP-NPII ve AQP2 genlerinde 12 mutasyon tespit edilmiştir. NDI’lı hastaların 4’ünün AQP2 geninde A147T ve R85X mutasyonları tespit edilmiştir. Aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada [14] ise NDI’lı bir erkek Türk hastada AQP2 geninde A45T mutasyonu tespit edilmiştir. Sonrasında, Karaduman [14, 15] tarafından yazılan doktora tezinde, AQP2 geninde tespit edilen A45T, A147T ve R85X mutasyonlarının *Xenopus laevis* oosit ifade sisteminde gerçekleştirilecek fonksiyon analiz çalışmaları için hazırlıklar yapılmıştır. Bu bağlamda, oosit ifade vektörlerinden elde edilen tamamlayıcı RNA'ların (cRNA) oosit sitoplazmasına mikroenjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve immüblot analizi ile yabancı tip AQP2 ile mutantlarının membranlardaki oranları karşılaştırılmıştır. Ayrıca, mutant proteinlerin su iletim mekanizması üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla oositlere su geçirgenlik testi yapılmıştır. Sonuç olarak, mutant proteinlerin fonksiyonlarının wt-AQP2 proteinine göre farklı oranlarda değişiklik gösterdiği bulunmuştur.

Bu tezin amacı, NDI’lı hastaların AQP2 geninde tanımlanan A45T, A147T ve R85X mutasyonları ile ilgili mutant proteinlerin ve wt-AQP2 proteininin moleküler dinamik

(MD) simülasyonlarının yapılarak mutasyonların kanal proteinlerinin yapısında dolayısıyla fonksiyonunda meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi ve bu sonuçların hücre kültürü çalışmalarıyla elde edilmiş mutasyon-fonksiyon analizi sonuçlarıyla kıyaslanmasıdır.

Genel olarak, biyolojik moleküllerin ya da proteinlerin MD simülasyonları ile modellenmesi, onların moleküler yapılarının ve zaman içindeki davranışlarının anlaşılmasına olanak sağlar. Bu sayede proteinlerin işlevleri ve etkileşimleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. wt-AQP2 ve mutantlarının MD simülasyonlarının sonuçlarında ise kanalın içyapısı ve su moleküllerinin nasıl ya da ne kadarının taşındığı gibi bilgilere erişmemize yardımcı olur. Bu bağlamda, yaptığımız simülasyonlar sonucunda, R85X-AQP2 mutant proteinin bir su kanalı oluşturamayacağı, A45T-AQP2 mutant proteinin işlevsiz bir su kanalı oluşturabileceği, A147T-AQP2 mutant proteinin ise yarı-işlevsel bir su kanalı oluşturabileceği yönünde deneyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akuaporinler

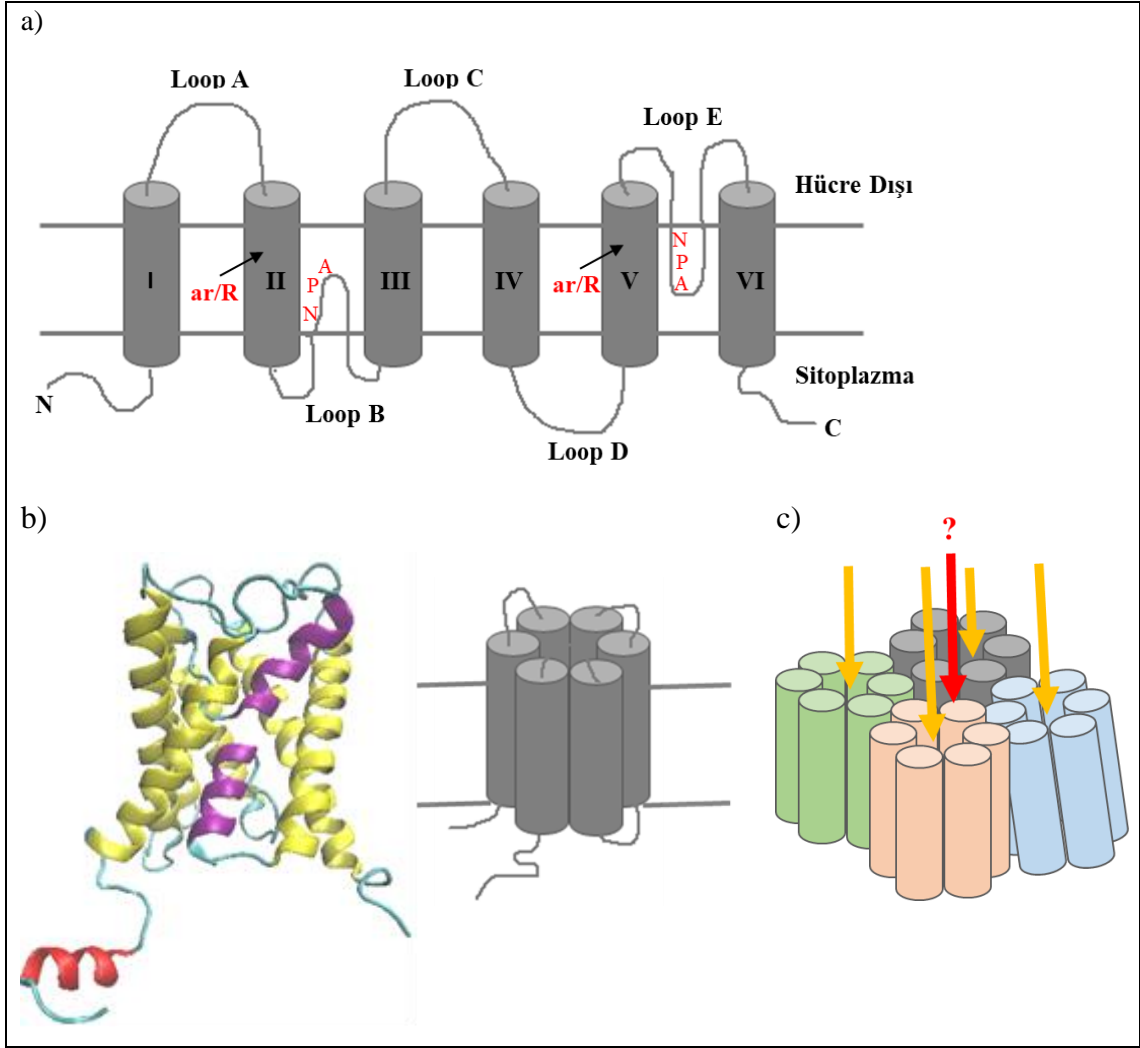
Su kanalları olarak da bilinen AQP'ler biyolojik hücrelerin zarlarında gözenekler oluşturan, temelde hücreler arasında suyun taşınmasını kolaylaştıran integral zar proteinleridir [16]. Çeşitli bakteri, mantar, hayvan ve bitki hücrelerinin hücre zarlarında bulunurlar [17-22]. Orijinal ismi CHIP28 olan, sonradan AQP1 olarak adlandırılan ilk su kanalının 1992 yılında keşfedilmesinden bu yana [23], 13 farklı insan AQP izoformu (AQP0–12) tanımlanmıştır. Bu AQP'ler, homolojileri ve gözenek seçiciliği gibi biyofiziksel özelliklerine göre genel olarak üç ana gruba ayrılırlar [24, 25]:

- Sadece su taşıyan *klasik (ortodoks) akuaporinler* (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 ve AQP8),
- suyun yanında gliserol de taşıyabilen *akuagliseroporinler* (AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10) ve
- *süper (ortodoks-olmayan) aquaporinler* (AQP11 and AQP12).

İşlevsel olarak birbirinden farklı olan insan AQP'leri kanser, böbrek fonksiyonu bozuklukları, epilepsi, nörolojik bozukluklar, değişik cilt hastalıkları ve kalp hastalıkları dâhil olmak üzere çeşitli bulaşıcı olmayan hastalıklarda rol oynamaktadırlar [26-34].

DeneySEL çalışmalar ve dizi hizalaması çalışmaları AQP'lerin bazı korunmuş özellikleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Her bir AQP monomeri, üç tane hücre dışı (A, C ve E döngüleri) ve iki tane hücre içi (sitoplazmik) (B ve D döngüleri) olmak üzere toplam beş döngüyle birbirine bağlanan altı transmembran α -sarmalından (I-VI) oluşmuştur (Şekil 2.1-a ve Şekil 2.1-b'deki sarı renkli sarmallar). Ayrıca, B ve E döngülerinden oluşan iki yarım sarmal yedinci bir psödo-transmembran segmentini oluşturmaktadır (Şekil 2.1-b'deki mor renkli sarmallar). Amino ve karboksil (Şekil 2.1-b'deki turkuaz renkli düzensiz sarmal ve kırmızı renkli sarmal) uçları hücrenin içine bakacak şekilde, yani stoplazmada, hücre zarına gömülü halde bulunmaktadır [35, 36, 3]. Tüm monomerlerin bir daralma görevi gören ve su iletim kanallarının ortasında yer alan, iki adet korunmuş Asn-Pro-Ala (NPA) motifi içerdiği bulunmuştur (Şekil 2.1-a). NPA motifi, çoğunlukla

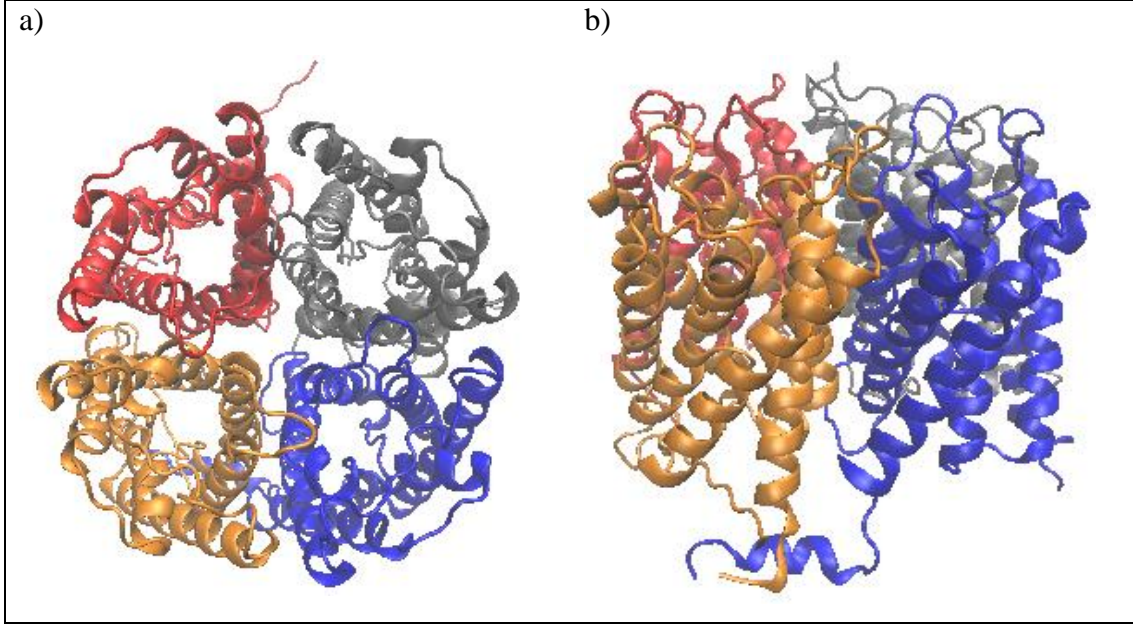
AQP su kanallarının transmembran alanlarında bulunsa da, kesin yeri AQP izoformuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca, kanal içinde aromatik/Arginin (ar/R) seçicilik filtresi (SF) olarak bilinen başka bir önemli daralma bölgesi daha vardır. SF, AQP kanallarının en dar kısmını oluşturur. Bu bölgedeki arginin rezidüsü, su moleküllerinin SF'den geçmesine neden olan hidrojen bağlarını (H-bağlarını) oluşturur. SF, bir tane arginin ve klasik (ortodoks) AQP'leri akuagliseroporinlerden ayıran, yalnızca her bir alt aile içinde korunan üç tane farklı amino asitten oluşur. Bu bölge, klasik (su geçiren) AQP'lerde daha polar olup, korunmuş bir histidin içerir. Akuagliseroporinlerde ise bu bölge daha hidrofobik olup genellikle triptofan ve tirozin olmak üzere iki korunmuş aromatik rezidü içerir. SF'nin yapı ve aktivitesi (işlevi) arasındaki ilişki nedeniyle daha büyük, hidrofobik kanallar çözünen maddeleri iletirken, daha küçük, hidrofilik kanallar suyu iletirler; bu da SF'nin AQP'lerde substrat seçiciliği için temel oluşturduğunu göstermektedir. Örneğin, Tajkhorshid ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [37] GlpF'deki (Glycerol facilitator) korunmuş aromatik rezidülerden birinin çıkarılması, su geçirgenliğinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Beitz ve arkadaşları [38] tarafından yapılan başka bir çalışmada ise AQP1'in SF bölgesindeki Ala mutasyonları, bölgenin genişlemesine neden olmuş, bu da üre, gliserol, amonyak ve protonların geçişine olanak sağlamıştır. MD simülasyonları ile de SF bölgesinin seçicilik için önemini açıklayan çalışmalar bulunmaktadır [39, 40]. İkinci (B) ve beşinci döngüde (E) bulunan NPA dizileri, birbirleriyle eşleşmek ve su kanalını oluşturmak için molekülün üzerine doğru bükülürler (Şekil 2.1-b); yani her AQP monomeri bağımsız bir su kanalıdır. Her biri 26 ile 34 kDa (yaklaşık 240-300 rezidü) arasında olan AQP monomerleri merkezi bir gözenek oluşturmak için hücre zarında dört parçalı kümeler (homotetramerler) olarak birleşirler (Şekil 2.1-c). Dört monomerin her biri su kanalı görevi görürken (Şekil 2.1-c'deki sarı oklar), onların arasındaki boşluk tarafından oluşturulan merkezi gözeneğin işlevi ise büyük ölçüde bilinmemektedir. İnsan AQP kanalları 4 Å'dan daha küçük çapa (su taşıyan AQP'ler yaklaşık olarak 2.8 Å olurken, iyon taşıyan AQP'ler 3 Å dan daha büyüktür) ve 2-3 nanometre uzunluğuna sahiptirler.



Şekil 2.1. AQP proteinlerinin a) ikincil, b) üçüncül ve c) dördüncül yapıları.

2.2. Aquaporin-2 ve Nefrojenik Diabetes İnsipidus (NDI)

Bu tezin konusu olan insan AQP2 (Şekil 2.2), böbreklerin ana toplayıcı kanal hücrelerinde suyun yeniden emilmesinden sorumlu ve idrar konsantrasyonu için gerekli, ADH ile düzenlenen, homotetramerik bir su kanalı olarak işlev görmektedir. Sasaki ve arkadaşları [1] tarafından 1993 yılında insan AQP2'si için cDNA klonlanmış ve 1994 yılında Deen ve arkadaşları [41] tarafından da insan AQP2'si izole edilmiştir. 29 kDa'lık moleküler kütleyle sahip AQP2, hidrofobik ve zar bütünleyici bir proteindir. Yani, yaklaşık olarak son yirmi yılda AQP2 geni klonlanmış ve idrar konsantrasyonunun moleküler mekanizmaları yavaş yavaş aydınlatılmaya başlanmıştır [42-46].



Şekil 2.2. AQP2 proteininin a) hücre dışı görünümü b) yandan görünümü.

Literatürde, AQP2'yi kodlayan gen üzerinde yapılan mutasyonların NDI'a neden olduğunu destekleyen çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar bulunmaktadır [3-12]. NDI, bir çeşit su dengesi bozukluğudur. Şöyle ki; vücut sıvı alımını, idrarla sıvı atılımı şeklinde dengelerken, NDI hastalığına sahip kişiler çok fazla idrar üretirler. Yani NDI hastalığı, büyük miktarlarda seyreltik idrar üretimi ile karakterize edilir ve böbreğin idrarı konsantre edememesinden kaynaklanır [41]. Bu hastalık sonradan edinilmiş ya da doğuştan (konjenital) olabilir. Konjenital NDI hastalığı AVPR2 (vasopressin type-2 receptor gene) veya AQP2 genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Mergen ve arkadaşları NDI'lı 9 hasta üzerine yaptıkları bir çalışmada [13], hastaların 4'ünde AVPR2 mutasyonu, 5'inde ise AQP2 mutasyonu tanımlamışlardır. NDI'ye neden olan AQP2 mutasyonları, AQP2'nin ya depo veziküllerinden apikal membrana taşınmasına engel olur ya da yanlış katlanmaya ve bu yüzden de endoplazmik retikulumda (ER) tutulmasına neden olur [11, 47, 48]. Örneğin, [13] no'lu referansın devamı olarak yapılan çalışmada [49], AQP2 kanal proteinindeki L137P mutasyonunun, proteinin yanlış katlanması nedeniyle, hem proteasomal bozulmadaki artışa hem de AQP2'nin hücre içi tutulmasına neden olacağını ileri sürmüşlerdir. Mergen ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise [14, 15], NDI hastalarında tanımlanan üç mutasyon (A45T, R85X [50] ve A147T [51]) wt-AQP2 ile değişik deneysel yöntemler kullanılarak, karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak;

- A45T-AQP2 mutant proteininin azaltılmış yarı ömür ve hedefleme kusurları ile karakterize edilip, işlevsiz bir su kanalının oluşmasına neden olduğunu;
- R85X-AQP2 mutant proteininin fonksiyonel bir su kanalı oluşturamayacağını;
- A147T-AQP2 mutant proteininin ise kısmi yanlış hedefleme ve yarılanma ömrünün azalması gibi özelliklerinin olmasına rağmen yarı fonksiyonel bir su kanalı oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Mutant su kanallarının hücre içi fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar, bu çalışmaların hastalık fenotipine yol açan mekanizmaları aydınlatması ve patolojik mekanizmalarla ilgili farmakolojik stratejilerin gelişimini desteklemesi nedeniyle önemlidir.

2.3. Moleküler Dinamik Simülasyonlarının Kullanım Amaçları

Suyun AQP'ler yoluyla hücrelere taşınması, su moleküllerinin AQP gözeneklerinden hızlı geçiş hareketini içeren dinamik bir süreçtir. X-ışını kristalografisi kullanılarak akuaporinlerin yapıları çözülmüş ve suyun bu kanallardan nasıl taşındığı, gözenekteki belirli yapısal özelliklerin diğer çözünen maddelerin gözenekten geçmesini engellemeye nasıl yardımcı olabileceği konusunda önemli bilgiler sağlamıştır. Fakat bu tür teknikler de makromolekül kristalize edildiğinden böyle bir dinamik yapının sadece statik bir resmi elde edilir. Dolayısıyla akuaporinler gibi taşıma ve seçicilik mekanizmasının önemli olduğu dinamik yapıların zaman içerisindeki yörüngelerini elde edebilmek için yani dinamik bir resim elde edebilmek için MD benzetimleri gereklidir. MD benzetimlerinde, bir sistemdeki farklı atomlar arasındaki kuvvetler Newton'un ikinci hareket denklemi ($F=ma$) ile hesaplanır ve daha sonra atomların bu kuvvetlerin etkisi altında hareket etmesine izin verilir. Bu da, üzerinde çalışılan molekülün değişik konformasyonlarının örneklenmesine müsaade ederek farklı özelliklerini elde etmemizi sağlar.

wt-AQP2 ve mutantlarının su-taşıma mekanizmalarının MD simülasyonları ile incelenmesi, moleküler seviyede bilgiler vereceği için, deneysel yöntemler ile anlaşılabilen ya da eksik kalan detayları tamamlamaktadır. Ayrıca bu mekanizmaların doğru bir şekilde anlaşılması, geçirgenliği modüle etmeye çalışan deneylere yön verebileceği gibi, NDI'nın oluşum mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağından terapötik amaçlar için de yararlı olabilir. Bu bağlamda, AQP'ler aracılığıyla su geçirgenliği mekanizmalarının MD benzetimleriyle incelenmesi ile alakalı değişik

çalışmalar bulunsa da [52-57], AQP2'ler ile alakalı literatür çok geniş değildir [40, 58-60]. AQP2 üzerine yapılan ilk MD çalışmasında [58], insan böbreğindeki su geçirgenliği ve idrar konsantrasyonu mekanizmaları hakkında bilgiler verilmiş, difüzyon geçirgenliği ve ozmotik geçirgenlikler ölçülmüştür. Bu çalışmanın devamı niteliğinde, başka bir grup tarafından yapılan mikrosaniye zaman ölçekli MD simülasyonlarında ise [59], geçirgenliğin ölçülmesine ek olarak, kanal boyunca su taşınması ile ilişkili serbest enerji profili ortaya çıkarılmış, seçicilik mekanizmaları ile ilgili bilgiler verilip AQP2'nin taşıma özellikleri açıklanmıştır. Ayrıca her iki çalışmada AQP2'deki ar/R bölgesinin sadece bir SF olarak davranmadığı, aynı zamanda bir geçiş bölgesi olarak da hareket ettiği gösterilmiştir. Hadidi ve arkadaşları tarafından yapılan MD çalışmasında [40] AQP2 üzerine H172G mutasyonu yapılmış, His172'nin su geçirgenliğini düzenlemedeki kritik rolü açıklığa kavuşturulmuştur. Aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada ise [60] AQP2-V168M ve AQP2-G64R mutasyonları yapılmış ve mutasyonların su geçirgenliğin mekanizması ve dinamiklerini nasıl değiştirdiği incelenmiştir.

Bu tezde wt-AQP2 ve mutantlarının (A45T, A147T ve R85X) her biri için membran varlığında 250'şer ns, yokluğunda ise 100'er ns üretim MD simülasyonları yapılmış, Mergen ve arkadaşları [14, 15] tarafından yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarını destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Şöyle ki; AQP2'de 45 numaralı Ala'nın Thr ile yer değiştirmesi, wt- AQP2'ye oranla işlevsiz bir su kanalının oluşumuna neden olurken, 147 numaralı Ala'nın Thr ile yer değiştirmesi yarı-fonksiyonel bir su kanalına sebebiyet vermiştir. R85X mutasyonu sonucunda ise bir su kanalından bahsedilememektedir.

3. HESAPLAMALI ÇALIŞMALAR

3.1. Sistemlerin Hazırlanması

3.1.1. Eksik Residülerin Tamamlanması

İnsan AQP2 proteininin X-ışını yapısı Törnroth-Horsefield [3] ve arkadaşları tarafından belirlenmiş ve atomik koordinatlar, Protein Veri Bankasında [61] 4NEF pdb kodu ile depolanmıştır. Ancak, pdb dosyasında, REMARK 465 kayıtlarına göre eksik rezidülerin olduğu görülmüş ve bu rezidüler Çizelge 3.1.1’de listelenmiştir. MD simülasyonlarının başarısı, önemli ölçüde başlangıç yapısına bağlı olduğu için, simülasyona başlamadan önce eksik rezidülerin tamamlanması gerekmektedir. Deneysel yöntemlerin yanı sıra, birçok hesaplamalı yaklaşım ile de proteinlerin üç boyutlu moleküler yapısı amino asit dizisinden tahmin edilebilir [62-66]. Böylece, eksik yapısal özellikler yeniden oluşturulup, daha fazla yapısal iyileştirme yaparak eksiksiz başlangıç modelleri sağlanabilir. Bu bağlamda, bu tezde eksik rezidülerin tamamlanmasında Modeller programı [62] kullanılmıştır. Program orijinal yapıyı (eksik rezidüler olmadan) bir şablon olarak ele alıp, karşılaştırmalı bir model oluşturmaktadır. Sonuç olarak, Modeller programı kullanarak eksik rezidülerin tamamlandığı model (wt-AQP2) elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. 4nef.pdb yapısındaki eksik rezidüler.

Rezidü İsmi	Monomer İsmi	Sıra Numarası	Elektrik Yüğü
GLY	A	1	
GLU	A	241	-1
PRO	A	242	
GLY	B	1	
SER	B	2	
GLU	B	3	-1
LEU	B	4	
ARG	B	5	+1
GLY	B	239	
LEU	B	240	
GLU	B	241	-1
PRO	B	242	
GLY	C	1	
SER	C	2	
GLU	C	3	-1
LEU	C	4	
ARG	C	5	+1
PRO	C	242	
GLY	D	1	
LEU	D	234	
ALA	D	235	
VAL	D	236	
LEU	D	237	
LYS	D	238	+1
GLY	D	239	
LEU	D	240	
GLU	D	241	-1
PRO	D	242	

3.1.2. Nokta Mutasyonların Yapılması

wt-AQP2 modeli üzerine, daha önce NDI hastalığında tanımlanmış üç ayrı nokta mutasyon; A45T [14, 67], R85X ve A147T [13] HADDOC [68] programı ile yapılmıştır. Nokta mutasyonlar öncelikle Python programlama dilinde yazılmış pdb_mutate.py betiği ile [69] mutasyon yapılacak amino asidin adının değişmesiyle başlamakta ve sonrasında HADDOC eksik yan zincir atomlarını doldurmaktadır. Sonuç olarak; bir tane wt-AQP2

ve 3 tane de mutant (A45T-AQP2, A147T-AQP2, R85X-AQP2) olmak üzere toplam 4 tane model oluşturulmuştur.

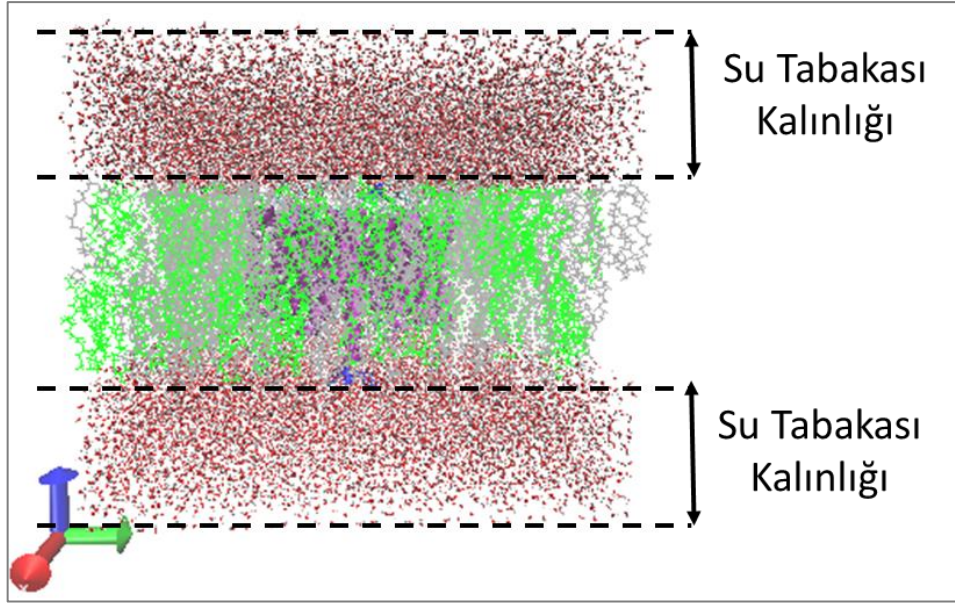
3.1.3. wt-AQP2 ve Mutantlarının Model Böbrek Zarına Gömülmesi

Kritcevsy ve arkadaşları [70] insan, sığır, sıçan, fare ve kurbağa gibi omurgalıların böbrek, karaciğer ve dalaklarının fosfolipid sınıfı dağılımlarını belirlemişlerdir. Böbrek ve karaciğer için elde edilen değerler, türler arasında çok az değişiklik olduğunu ya da hiç olmadığını gösterirken, dalak için elde edilen değerler, hücresel bileşimde farklılık gösteren iki grup olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmaya göre, insan böbreğinin fosfolipid dağılımı “fosfatidil kolin (PC), fosfatidil etanolamin (PE), fosfatidil serin, fosfatidil inositol, fosfatidik asit, difosfatidil gliserol, fosfatidil gliserol, lizobifosfatidik asit, lizofosfatidil kolin, lizofosfatidil etanolamin, sfingomyelin (SM)” den oluşmaktadır. Bu lipid çeşitleri içerisinde yüzdeliği en fazla olan ilk üç lipid çeşidi (%31.6 - %34.6 oranında PC, %26.5 - %28.2 oranında PE ve %11.1 - %12.9 % oranında SM) Charmm-Gui [71, 72] programı ile model membran oluşumu için kullanılmıştır. Bu program, MD benzetimleri için, protein-membran kompleksleri oluşturmak üzere tasarlanmış web tabanlı bir grafik kullanıcı ara yüzüdür. Kompleksin oluşumu için öncelikle protein yapısının okunması gerekmektedir. Bu adımda, kullanıcılar kendi protein yapılarını yükleyebilecekleri gibi “Protein Veri Bankası (Protein Data Bank (PDB))” ya da “Membranlardaki Proteinlerin Yönelimleri (Orientations of Proteins in Membranes (OPM))” [73] gibi veri tabanlarını kullanabilirler. POPC, POPE ve SMP lipid membran boyutları, proteinlerin uygun şekilde gömülebilmesi için XY uzunluğu wt-AQP2, A45T-AQP2, A147T-AQP2 için 120 Å ve R85X-AQP2 için 100 Å olacak şekilde oluşturulmuştur. Charmm-Gui, z-eksenini membran normali olarak alıp, z = 0 noktasını da membran çift tabakasının merkezi olarak tanımladığı için, veri tabanından okunan protein yapısının z-ekseni boyunca hizalanması ve hidrofobik bölgesinin z=0 civarına yerleştirilmesi gerekmektedir. OPM veri tabanındaki protein yapıları, membran normaline (z-ekseni) göre hali-hazırda yönlendirilmiş olduğundan, bu tezde OPM veri tabanından alınan 4nef.pdb yönlendirilmiş yapı kullanılmıştır. z-ekseninin uzunluğu ise su kalınlığı ve hidrasyon sayısına (bir lipid molekülü başına su molekülü sayısı) göre belirlenir. Bu tezde, su kalınlığı 18 Å ve hidrasyon sayısı 50 olacak şekilde tanımlanmıştır. CHARMM GUI, membranın alt ve üst katmanlarının farklı çeşit ve sayılarda lipid moleküllerine sahip olmasına izin vermektedir. Fakat bu şekilde

oluşturulan lipit çift tabakasında, alt ve üst katman için farklı sistem boyutlarının ortaya çıkmasını önlemek için alt ve üst katmanların alanları arasındaki fark, lipit çift tabakası için kullanılan lipit molekülleri arasındaki en küçük yüzey alanından daha az olana kadar bir sonraki adıma geçilmesine izin verilmez. Bu bağlamda, wt-AQP2, A45T-AQP2 ve A147T-AQP2 proteinlerinin oturtulduğu membranların lipit sayıları Çizelge 3.1.3-a'daki gibi olurken, R85X için bu sayılar Çizelge 3.1.3-b'deki gibidir. Burada önemli olan bir nokta şudur: AQP2 ve mutantlarının kanal benzeri yapılarından dolayı gözenek bölgesi içinde su molekülleri oluşturmak için "Gözenek Suyu Üretimi (Pore Water Generation)" seçeneğinin seçilmesi gerekmektedir. Bu durumda, sisteme su molekülleri eklenirken, gözeneğe dolan su, gözeneğin dışında da kalabilir; yani, zarın hidrofobik çekirdek bölgesinde, proteinin dışında su molekülleri kalmış olabilir. Bu yüzden, bu noktada oluşan sistemi Visual Molecular Dynamics (VMD) [VMD] programında açarak, su moleküllerinin gözeneğin içinde olduğundan, proteinin dışındaki su moleküllerinin çıkardığından emin olduk. Sistemler, "yer değiştirme (replacement) yöntemi" kullanılarak, dikdörtgen kutular içerisinde oluşturuldu. Sistemleri 0.15 M konsantrasyonunda nötr hale getirmek için uygun sayıda Na⁺ ve Cl⁻ iyonları sisteme eklenmiştir. İyonların ilk konfigürasyonları Monte Carlo simülasyonları aracılığıyla belirlenmektedir. Sonuç olarak, Şekil 3.1.3'de görülen heterojen membran protein kompleksini elde ettik.

Çizelge 3.2. a) wt-AQP2, AQP2-A45T ve AQP2-A147T mutantlarının b) AQP2-R85 mutantının oturtulduğu membranların lipit tipi ve sayıları.

a)			b)		
Lipid Tipi	Üst Tabakadaki Lipid Sayısı	Alt Tabakadaki Lipid Sayısı	Lipid Tipi	Üst Tabakadaki Lipid Sayısı	Alt Tabakadaki Lipid Sayısı
POPC	90	90	POPC	70	54
POPE	70	72	POPE	56	42
PSM	10	9	PSM	7	6



Şekil 3.1. Heterojen membran protein kompleksi.

3.2. Moleküler Dinamik Simulasyonları

3.2.1. Moleküler Dinamiğin Temel Fikri

MD benzetimi ideal gazlardan ve sıvılardan biyolojik moleküllere kadar değişik sistemlerin davranışlarını, özelliklerini zamana bağlı olarak inceleyen deterministik bir yaklaşımdır [74]. Deterministik benzetim yöntemlerinde, teorik olarak incelenecek sistemin başlangıç koşullarının bilinmesi gerekmektedir. MD yöntemi, N tane etkileşen parçacığın yörüngesini hesaplamak için Newton' un ikinci yasasını (1) kullanır. Başka bir deyişle, bir proteindeki veya bir moleküler sistemdeki her bir atomun zaman içinde nasıl hareket edeceğini tahmin etmektedir. Dolayısıyla, femtosaniye zaman ölçeğinde yapısal değişiklik, ligand bağlanması/çıkarılması ve protein katlanması önemli biyomoleküler süreçleri aydınlatılabilir. Ayrıca, biyolojik moleküllerin mutasyon, fosforilasyon, ya da protonasyon gibi atomik düzeydeki perturbasyonlara nasıl tepki vereceğini de tahmin edebilmektedir.

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) = -\vec{\nabla}_i V_i(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad (3.1)$$

Bu denklemin çözülebilmesi için kuvvet ya da potansiyel enerjinin yanı sıra başlangıç koordinatlarının ve hızlarının da verilmesi gerekmektedir. Başlangıç pozisyonları için

önceki deneysel ya da simülasyon sonuçları kullanılabilceği gibi, Protein Veri Bankası'ndan da ilk pozisyonlar alınabilir. İlk hızlar Gaussian veya Maxwell-Boltzman gibi istatistiksel dağılım yöntemleri ile atanmaktadır. Potansiyel enerji fonksiyonu ise kuvvet alanlarından gelmektedir. Kuvvet alanı ya da diğer adıyla potansiyel enerji fonksiyonu, moleküler bir sistemin atomları ve molekülleri arasındaki etkileşimleri tanımlamak için kullanılan matematiksel ifadelerdir. Bir kuvvet alanı; potansiyel enerji, türevleri ve kuvvetlerin hesaplanması için gerekli bir denklem (kuvvet alanı fonksiyonu) ile bu denklemlerde kullanılacak parametre setlerinden oluşur. Bu parametre setleri deneysel veriler ve kuantum-kimyasal hesaplamalar (ab-initio, yoğunluk fonksiyonel teorisi vb.) ile türetilmektedir. MD hesaplamaların en önemli bileşenlerinden birisi benzetimde kullanılacak olan kuvvet alanının seçimidir. Çünkü yapılacak hesaplamanın kaliteli ve güvenilir olması, bu seçime bağlıdır. Literatürde pek çok kuvvet alanı olmakla beraber, bu seçim çalışılacak sisteme ve hesaplamanın amacına bağlı olarak yapılmaktadır. Atomların başlangıç pozisyonları, hızları ve kuvvetler verildikten sonra, Newton denkleminin kısa zaman adımlarında entegrasyon çözümü yapılarak sistemin bir sonraki zaman adımında nerede olacağı belirlenir. Bu entegrasyonu yapmanın birçok farklı yolu olmakla beraber, genellikle en yaygın kullanılan entegratörlerden biri olan Verlet algoritması [75] kullanılır. Sonrasında, basınç ve sıcaklık gibi makroskopik özelliklerin nasıl sabit tutulacağı ve hangi termodinamik topluluğun kullanılması gerektiğine karar verilir. Sonuç olarak, MD benzetimleri sistemin 3-boyutlu yapısının değişiklikleri hakkında ayrıntılı bilgi vermektedir. Bu yöntemler, biyolojik moleküllerin yapı, dinamik ve termodinamik özelliklerinin araştırılmasında rutin olarak kullanılmaktadır. Bu tezdeki bütün MD simülasyonları Gromacs program paketi kullanılarak yapılmıştır [76].

3.2.2. Simulasyon Detayları

3.2.2.1. AQP2 ve Mutantlarının MD Simulasyonları

Her bir yapı (wt-AQP2, A45T-AQP2, A147T-AQP2 ve R85X-AQP2), eşkenar dörtgenel onikiyüzlü (rhombic dodecahedron) bir kutunun merkezine, kutunun kenarlarından 1.0 nm uzakta olacak şekilde konulmuştur. Sistemlerdeki su molekülleri arasındaki etkileşimi temsil etmek için basit nokta yükü tipi (Simple Point Charge, SPC) [77], diğer moleküller arasındaki etkileşimi temsil etmek için ise GROMOS96 54a7 kuvvet alanı [78] kullanılmıştır. Her bir sistemi elektriksel olarak nötr hale getirmek için

karşıt iyonlar (Na^+) eklenmiştir. Minimum görüntü kuralı (minimum image convention) altında her yönde periyodik sınır koşulları uygulanmıştır. Sistemlerin uygun bir geometriye sahip olmasını sağlamak için, en dik iniş (Steepest Descent) algoritması ile 50.000 adımlık bir enerji minimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra, enerjisi en aza indirilmiş her bir sistemin sıcaklığını 300K, basıncını ise 1 bar' da stabilize etmek için 100 ps NVT (kanonik; sabit parçacık sayısı, hacim ve sıcaklık) ve ardından 100 ps NPT (izotermal-izobarik; sabit parçacık sayısı, basınç ve sıcaklık) topluluklarıyla dengeleme (equilibration) MD simülasyonları yapılmıştır. Üretim (production) simülasyonları sırasında ise, her bir sistem için NPT topluluğu ile 100 ns MD simülasyonları yapılmıştır. Basınç izotropik Berendsen barostatı [79] kullanılarak 2.0 ps'lik çiftlenim (coupling) zaman sabiti ile 1 bar da, sıcaklık ise hız yeniden ölçekleme (velocity rescale) termostatı [80] kullanılarak, 0.1 ps'lik çiftlenim zaman sabiti ile 300 K'de sabit tutulmuştur. Her bir moleküler sistemin yörüngesi (zaman içinde atomların pozisyonundaki değişiklikler), Newton'un 2. hareket yasasının, Leap-Frog algoritması kullanılarak 2 fs'lik zaman adımları ile sayısal olarak çözülerek elde edilmiştir. İlk hızlar, 300 K'de Maxwell-Boltzmann dağılımı kullanılarak rastgele dağıtılmıştır. Lincs (a linear constraint solver) [81] algoritması kullanılarak, H-bağları sınırlandırılmıştır. Uzun menzilli (long-range) elektrostatik etkileşimleri hesaplamak için 0,16 nm grid genişliği ve dördüncü dereceden kübik enterpolasyon ile Particle Mesh Ewald (PME) [82] yöntemi uygulanmıştır. Kısa menzilli elektrostatik etkileşimler ve van der Waals etkileşimlerini hesaplamak için 1.4 nm kesim mesafesi (cut-off) ile Verlet algoritması [75] kullanılmıştır.

3.2.2.2. Membrana Gömülü AQP2 ve Mutantlarının MD Simülasyonları

Şekil 3.1'de görülen heterojen membran-protein komplekslerinin her birisi için 5000 adımlık enerji minimizasyonu, ardından 6 ayrı adımdan oluşan (125'er ps'lik 2 tane NVT, 125 ps'lik 1 tane NPT ve 500'er ps'lik 3 tane NPT) dengeleme MD ve 200 ns lık üretim MD simülasyonları yapılmıştır. Dengeleme MD simülasyonlarında adımlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Hepsinde “konum kısıtlaması” vardır; ancak ilk dengeleme en yüksek kısıtlama sabitine sahip olup bu sabit her adımda azalmaktadır. Artarda gelen dengeleme simülasyonlarının adımları arasındaki önemli farklılıkları ve benzerlikleri şöyle sıralayabiliriz:

- İkinci dengeleme simülasyonu birincinin devamı olacağı için [continuation = yes] olması ve [gen_vel = no] olması gerekmektedir. Her iki simülasyonda da yalnızca sıcaklık çiftlenimi olup, sistemler 303.15 K'e referans sıcaklığıyla (ref_t) Berendsen thermostatına bağlanmıştır; yani NVT topluluğu kullanılmıştır.
- Fakat üçüncü dengeleme itibariye NPT topluluğu ile simülasyona devam edildiği için sistemler 1.0 bar referans basıncıyla (ref_p) Berendsen barostatına [79] bağlanmıştır. Membrandaki basınç çiftlenimi için en önemli parametre [pcoupltype = semiisotropic]'dır. Bu parametre, basınç çiftleniminin tamamen izotropik olmadığı, bunun yerine, kutu vektörlerinden z- bileşeni bağımsızken, x ve y bileşenlerinin tekdüze (uniform) ölçeklendirildiği anlamına gelmektedir. Dolayısıyla ikinci ve üçüncü dengelemeler arasındaki en önemli fark NPT topluluğu ile simülasyona devam edilmesidir. Üçüncü dengeleme ve dördüncü dengeleme arasındaki fark ise zaman adımının değişmesidir. Bu aşamada, zaman adımı 1 femtosaniyeden standart zaman adımı olan 2 femtosaniye'ye geçecek kadar kararlıdır. Adım sayısı da iki katına çıkarılmıştır.
- Dördüncü, beşinci ve altıncı dengelemeler arasındaki tek fark ise kısıtlamaların azaltılmasıdır.
- Son (altıncı) dengelemeden üretim simülasyonuna geçerken durum değişmektedir. Şöyle ki; konum kısıtlaması kaldırılmıştır. Berendsen thermostatı yerine kanonik topluluğu daha doğru bir şekilde örnekleyen Nose-Hoover [83, 84] thermostatı kullanılmıştır. Berendsen barostatının yerine ise izotermal-izobarik topluluğu doğru bir şekilde örnekleyen Parrinello-Rhman [85] basınç bağlantısı kullanılmıştır. Hidrojen atomları üzerindeki kısıtlamalar bütün simülasyonlarda mevcuttur [constraints = h-bonds].

Proteinler ve fosfolipidler CHARMM36 kuvvet alanı ile [86, 87], su molekülleri ise TIP3P modeli [88] ile modellenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı wt-AQP2 ve mutantlarının (A45T, A147T ve R85X) her biri için membran varlığında ve yokluğunda MD simülasyonlarını yaparak, sistemlerin yapısal ve dinamik özelliklerini anlamak ve yapılan nokta mutasyonların kanal proteinlerinin yapısını dolayısıyla su moleküllerinin geçişini nasıl etkilediği belirlemeye çalışmaktır. Bu bağlamda wt-AQP2 ve mutantlarının her biri için membran varlığında 250'şer ns, yokluğunda ise 100'er ns üretim MD simülasyonları yapılmıştır. Simülasyonlar sonucunda elde edilen yörüngeler kullanılarak proteinlerin simülasyon boyunca;

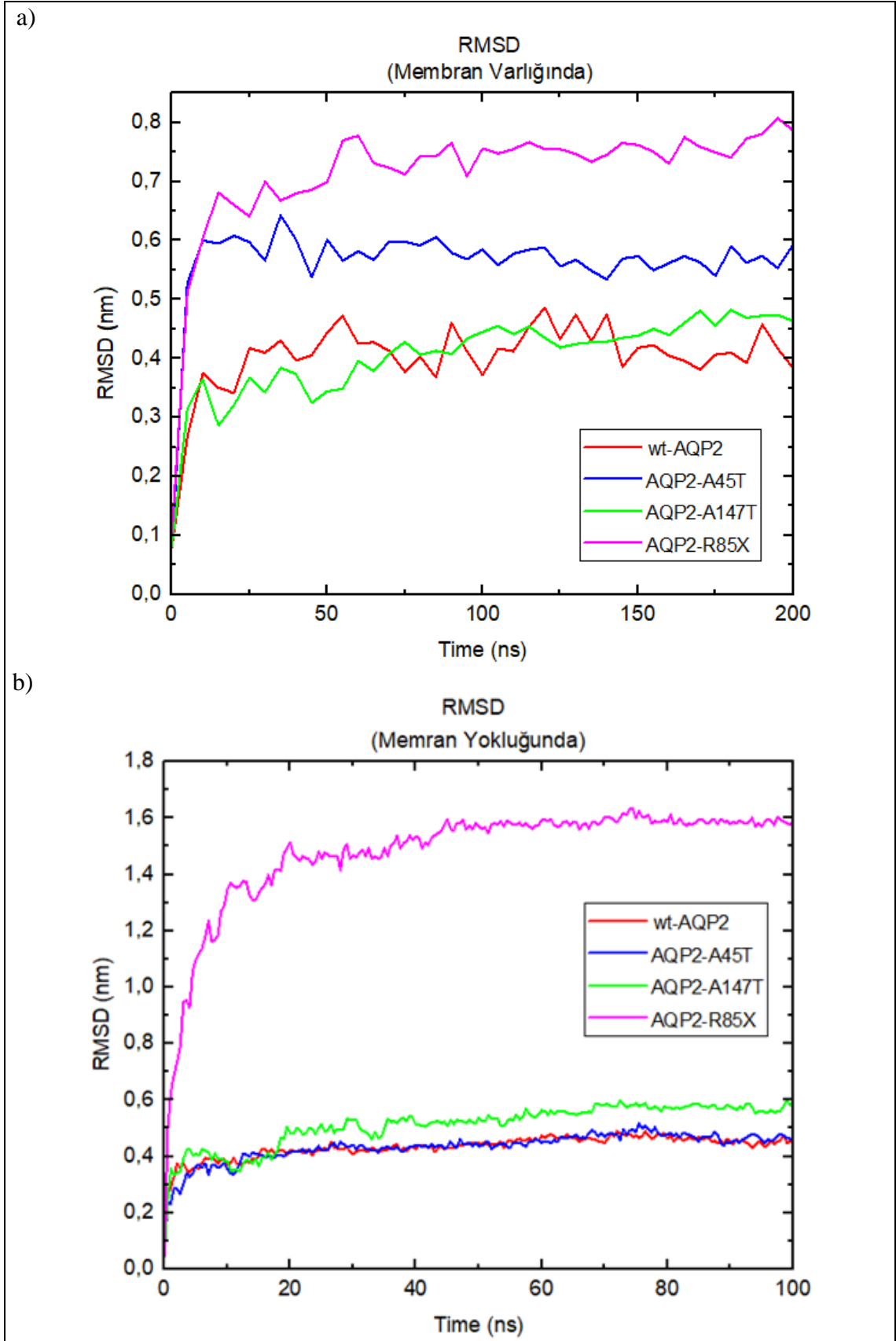
- kök-ortalama-kare sapma (root mean square deviation; RMSD) değerleri,
- kök-ortalama-kare dalgalanma (root mean square fluctuation; RMSF) değerleri,
- H-bağı sayıları ve
- kanaldan geçen su sayıları incelenmiştir.

4.1. Kök-Ortalama-Kare Sapmaları (Root Mean Square Deviation: RMSD)

RMSD'nin en genel tanımı, iki veri seti arasındaki farkların karelerinin ortalamasının karakökünün ölçülmesidir. Düşük RMSD değerleri, veri setlerinin birbirine daha benzer olduğunun bir göstergesidir. Moleküler modelleme alanında, üç boyutlu yapıları bilgisayar simülasyonları ile elde edilen ya da tahmin edilen proteinlerin X-ray kristolografisi, NMR gibi deneysel yöntemler sonucunda elde edilen yapılarla karşılaştırılmasında yaygın olarak kullanılmakta olup, sistemlerin konformasyonel kararlılıkları hakkında önemli bilgiler verir.

Bu bağlamda, wt-AQP2 ve mutantlarının stabiliteleri hakkında bilgi edinmek için üretim MD'den sonra elde edilen yapıların omurga (backbone) atomlarının koordinatlarının, başlangıç yapılarına göre kök-ortalama-kare sapmaları hesaplanmıştır (Şekil 4.1 a ve b). Şekil 4.1-a'da görüldüğü gibi, sistemdeki ilk büyük dalgalanmalar, sistem kararlı bir denge konumuna doğru ilerledikçe azalmakta ve simülasyon süresinin ilk 60 ns' inden sonra nispeten büyük RMSD değişiklikleri gözlenmediği için protein yapılarının istikrarlı bir denge durumuna ulaştığını söyleyebiliriz. Membran varlığında wt-AQP2 ve A147T-AQP2 proteinlerinin yapıları birbirine yakın olup, ortalama RMSD'leri 0.4 nm'dir.

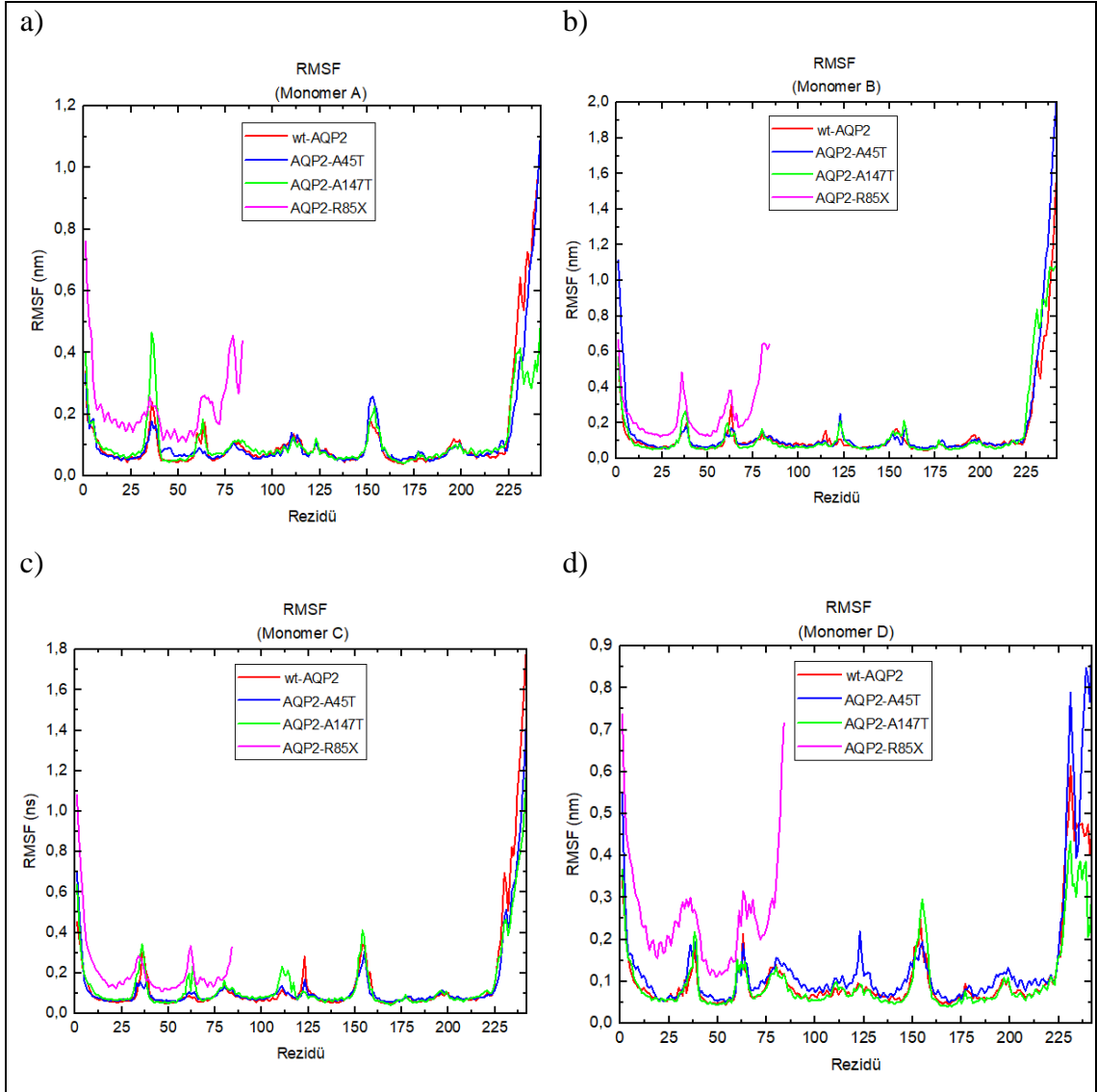
A45T-AQP2 ve R85X-AQP2 mutant proteinlerinin ortalama RMSD değerleri ise sırasıyla 0.6 nm ve 0.7 nm olup wt-AQP2'den oldukça farklıdır. Membran yokluğunda (Şekil 4.1-b) sistemler, R85X-AQP2 için 45 ns'den sonra, diğer yapılar için ise 20 ns'den sonra istikrarlı hale gelmişlerdir. wt-AQP2 ve A45T-AQP2 mutant proteini 0.4 nm RMSD değeri ile birbirlerine çok benzer yapıda olurken, 0.5 nm ile A147T-AQP2 mutant proteini yabancı tipten biraz farklılaşmıştır. Fakat R85X-AQP2 mutant proteini 1.5 nm'lik ortama RMSD değeri ile yabancı tipten iyice uzaklaşmıştır. RMSD sonuçları, membran varlığında ve yokluğunda yapılan simülasyonlara göre mutant proteinlerin yabancı tip proteinine göre daha fazla değişikliğe sahip olduğunu göstermiştir. Benzer sonuç, Kamali ve arkadaşlarının wt-AQP2 proteininin H172G [40], V168M ve G64R [60] mutant proteinleriyle karşılaştırılması sonucunda da elde edilmiştir.



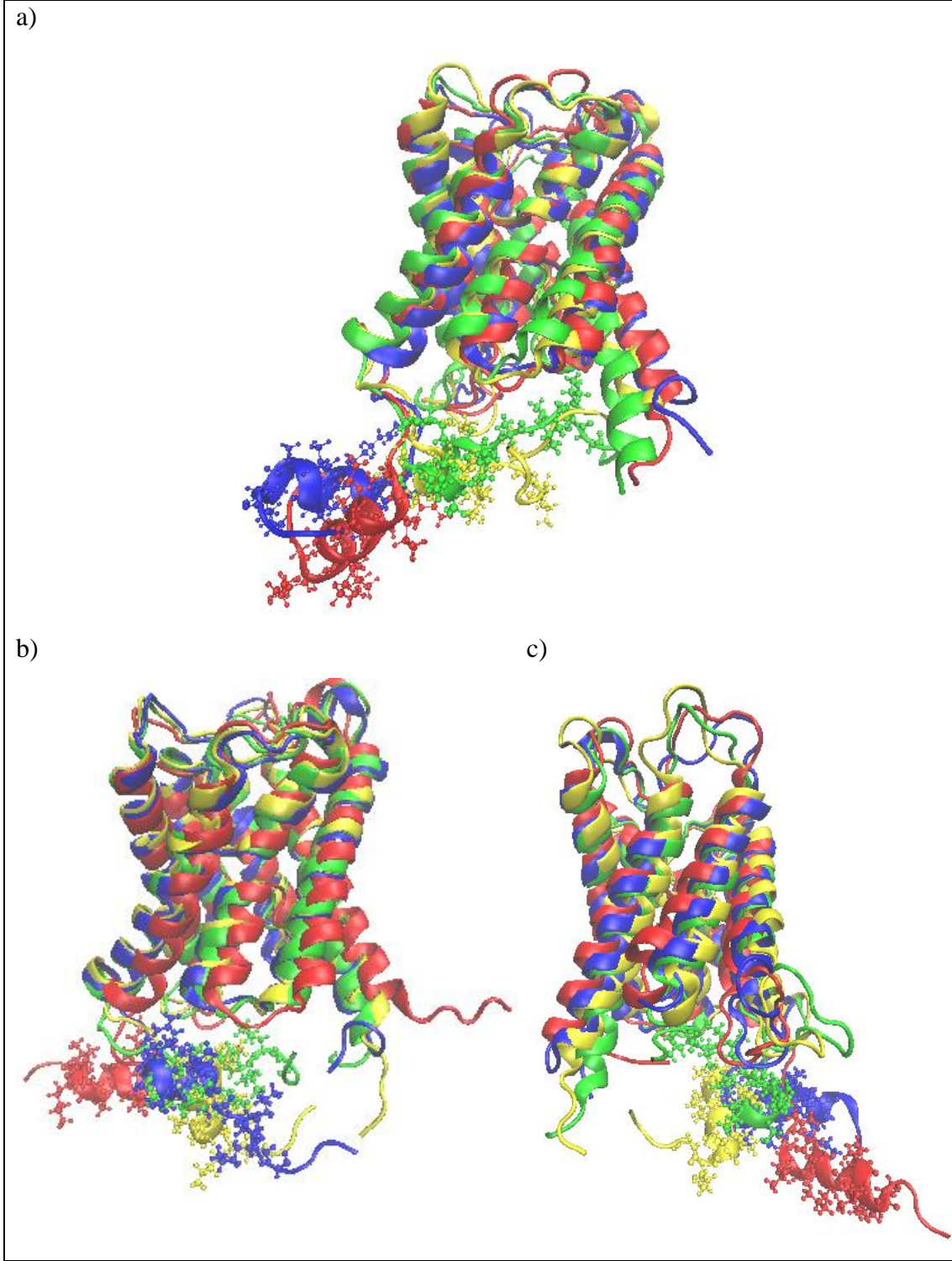
Şekil 4.1. İnsan AQP2 proteini ve mutantlarının denge MD simülasyon süresinin bir fonksiyonu olarak a) membran varlığında b) membran yokluğunda RMSD grafikleri.

4.2. Kök-Ortalama-Kare Dalgalanmaları (Root Mean Square Deviation: RMSF)

RMSF bir moleküldeki atomların ortalama hareketliliğini ölçer. wt-AQP2 ve mutant proteinlerin C α atomlarının hareketlerine erişim sağlayabilmek için, üretim MD simülasyonları boyunca, tüm rezidülerin C α atomlarının RMSF'leri çizilmiştir. Şekil 4.2.1'e göre bütün sistemlerde (a, b, c ve d) genel olarak dalgalanmaların büyük olduğu yerler döngü (loop) bölgelerine karşılık gelirken, C-terminal sarmalı dışındaki sarmal bölgeleri düşük dalgalanma sergilemekte olup, elde edilen sonuçlar [59] çalışması ile uyumludur. Sitoplazmik tarafta yer alan 229-239 numaralı rezidülerden oluşan C-terminal sarmalı ise wt-AQP2 ve mutantlarının her bir monomorinde oldukça değişken konumlu olup, çok dalgalanmaktadır (Şekil 4.2.2-a, b, c). Kısa C-terminal sarmalının bu değişken konumu, AQP2 ile diğer tüm memeli AQP yapıları arasındaki önemli farklardan birini oluşturmaktadır [3]. C-terminal sarmalı, dört AQP2 protomerinin her birinde farklı bir konformasyon benimserken, promoter D'de oldukça düzensizdir. Şöyle ki; wt-AQP2'de promoter A ve B birbirlerine daha yakın lokasyonlarda olup sarmal yapısını korurken promoter C sarmal yapıdan turn (dönüş) yapıya, promoter D ise sarmal yapıdan düzensiz sarmal (tesadüfi kıvrılmalar: coil) yapıya dönüşmüştür. A45T ve A147T mutantları için ise benzer durum söz konusu olup, promoter C'de heliks yapısı gözlenirken promoter D'de dönüş ve düzensiz sarmaldan oluşan bir yapıya dönüşmüştür (Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2. Membran varlığında, wt-AQP2 ve mutantlarına ait monomerlerin a) Monomer A b) Monomer B c) Monomer C d) Monomer D rezidü başına RMSF değerleri.

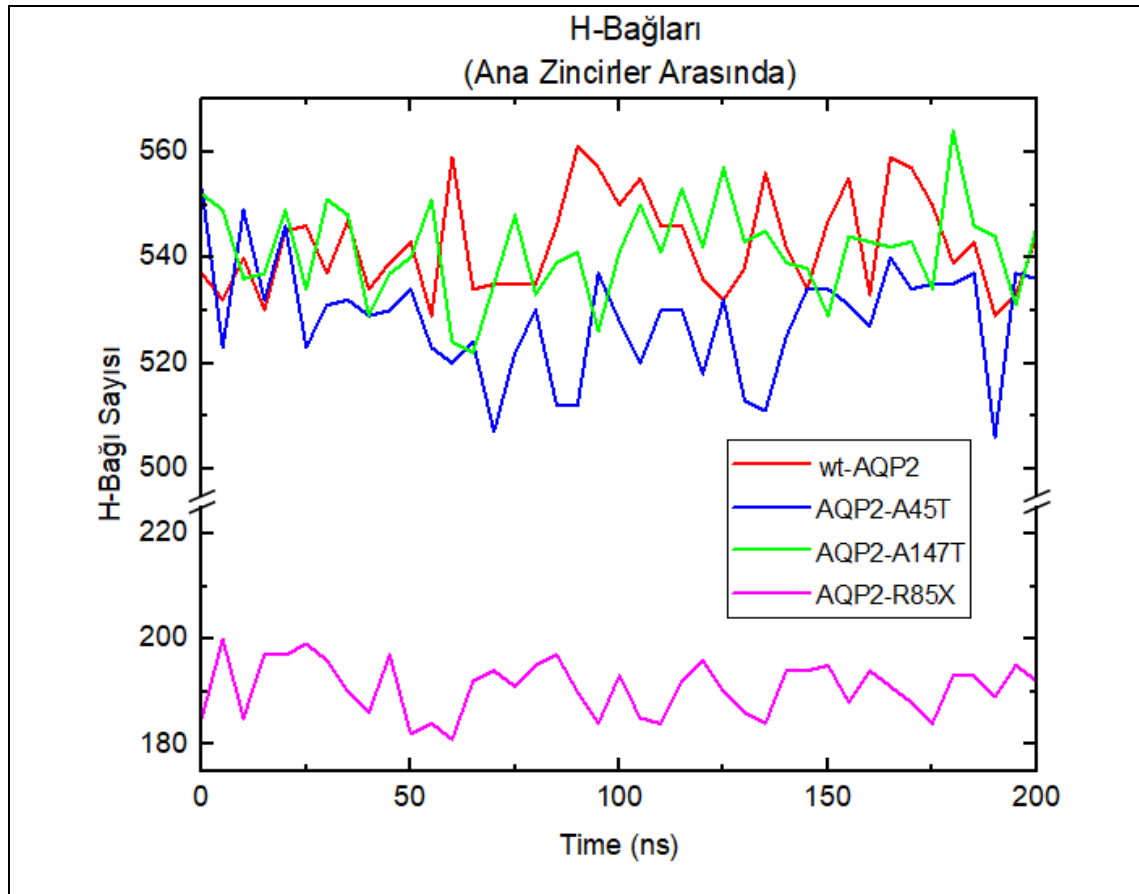


Şekil 4.3. a) wt-AQP2 b) A45T-AQP2 c) A147T-AQP2 ait her bir monomerin moleküler hizalaması (Monomer A: Mavi, Monomer B: Kırmızı, Monomer C: Sarı, Monomer D: Yeşil).

4.3. Hidrojen Bağları

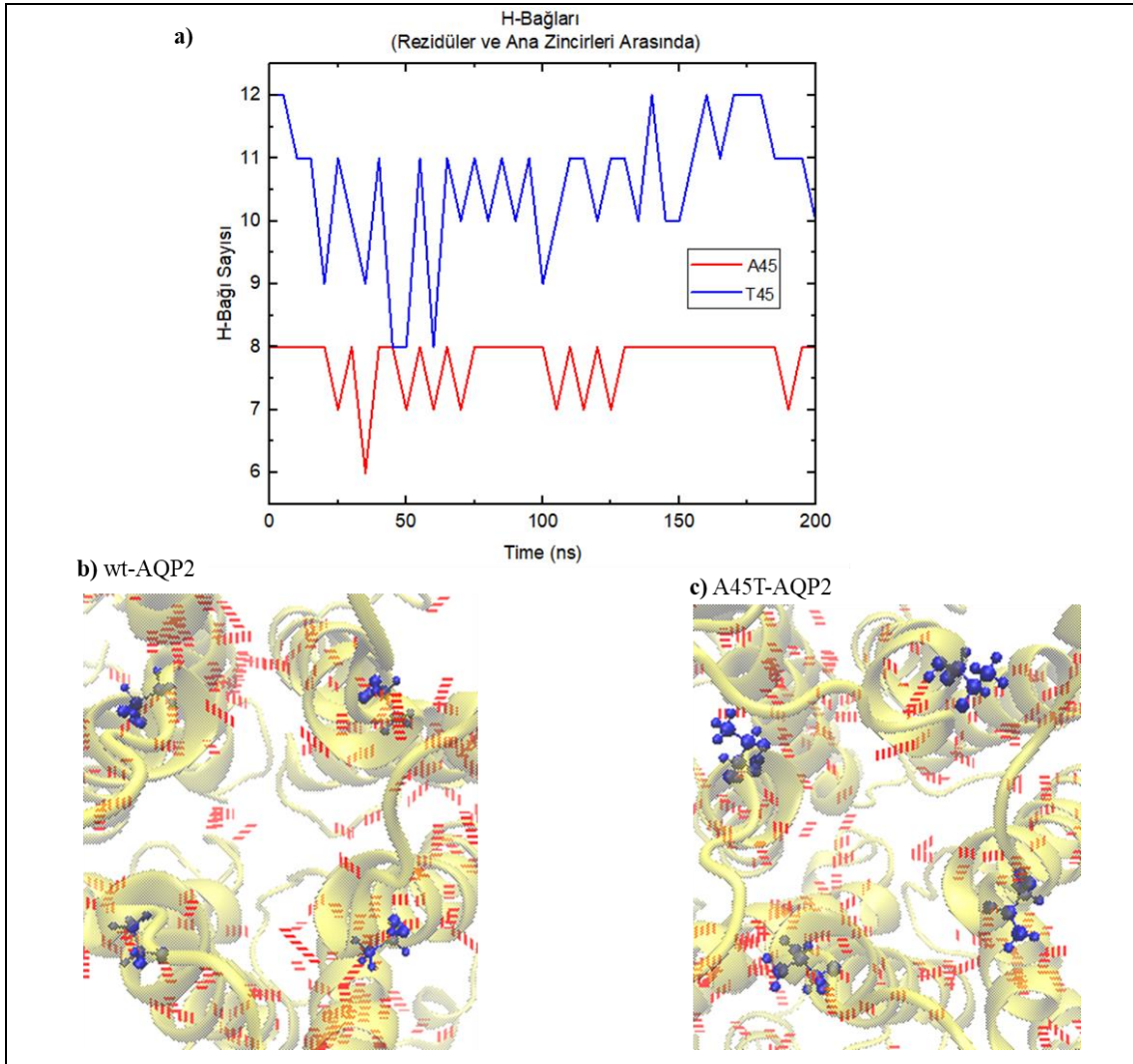
H-bağları hidrojen atomu ile oksijen, nitrojen ya da flor gibi elektronegatif bir atom arasında oluşan, kovalent olmayan bir etkileşim olup, proteinlerin stabilitesinin ve işlevinin önemli bir göstergesidir. Aquaporinlerde, kanal içerisinde H-bağlarının sayısı ve yeri, kanalların su-taşıma kapasitelerini, seçiciliklerini ve genel işlevlerini etkilemektedir.

Bu tezde 200ns'lık üretim MD simülasyonları boyunca wt-AQP2 ve mutantlarının her birinin ana zincirleri arasında oluşan H-bağları (şekil 4.3.1) 0.35 nm veya daha küçük O-H mesafeleri ve 30 derece veya daha küçük OHN açısı için bağ oluşacağı varsayımıyla, analiz edilmiştir. wt-AQP2 ile A147-AQP2' de oluşan toplam h-bağ sayısı birbirine yakın olurken, A45T-AQP2 için bu sayı biraz daha düşüktür. R85X-AQP2 için ise diğer yapılardaki H-bağı sayısının yarısından daha azdır.

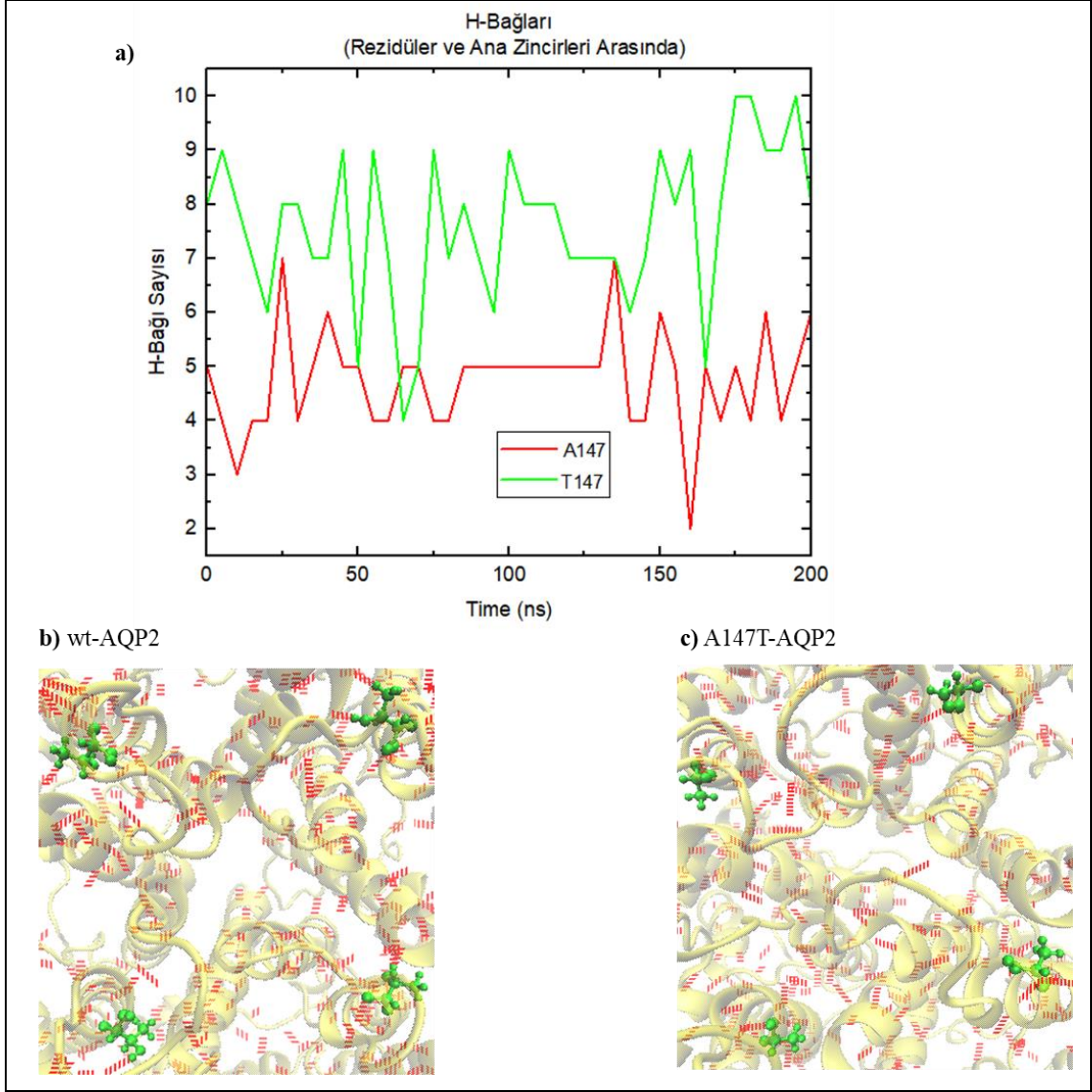


şekil 4.4. 200ns'lık üretim MD simülasyonları boyunca wt-AQP2 ve mutantlarının her birinin ana zincirleri arasında oluşan toplam H-bağı sayısının zamana göre değişimi.

Mutasyonların yapıldığı bölgelerde H-bağı sayısında nasıl bir değişiklik olduğunu anlayabilmek için ise yabancı tip amino asitin (Ala) ve mutasyon yapılan amino asitin (Thr) ana zincirler ile yaptıkları H-bağ sayıları hesaplanmıştır. Bu bağlamda, wt-AQP2 proteini ile A45T-AQP2 mutant proteininin ve wt-AQP2 proteini ile A147T mutant proteininin mutasyon bölgelerinin ana zincir ile yaptıkları H-bağı sayıları sırasıyla Şekil 4.3.2 ve Şekil 4.3.3’de gösterilmiştir. Her iki grafikten de anlaşıldığı gibi, Ala ile Thr değişimi wt-AQP2’ye göre mutant proteinlerde H-bağı sayısını arttırmaktadır. Bu artışın nedeni, Ala'nın yan zinciri basit bir metil (-CH₃) grubundan oluşurken, Thr'nin, H-bağı oluşumuna katılabilecek, hidroksil (-OH) grubu içermesinden dolayı olabilir.

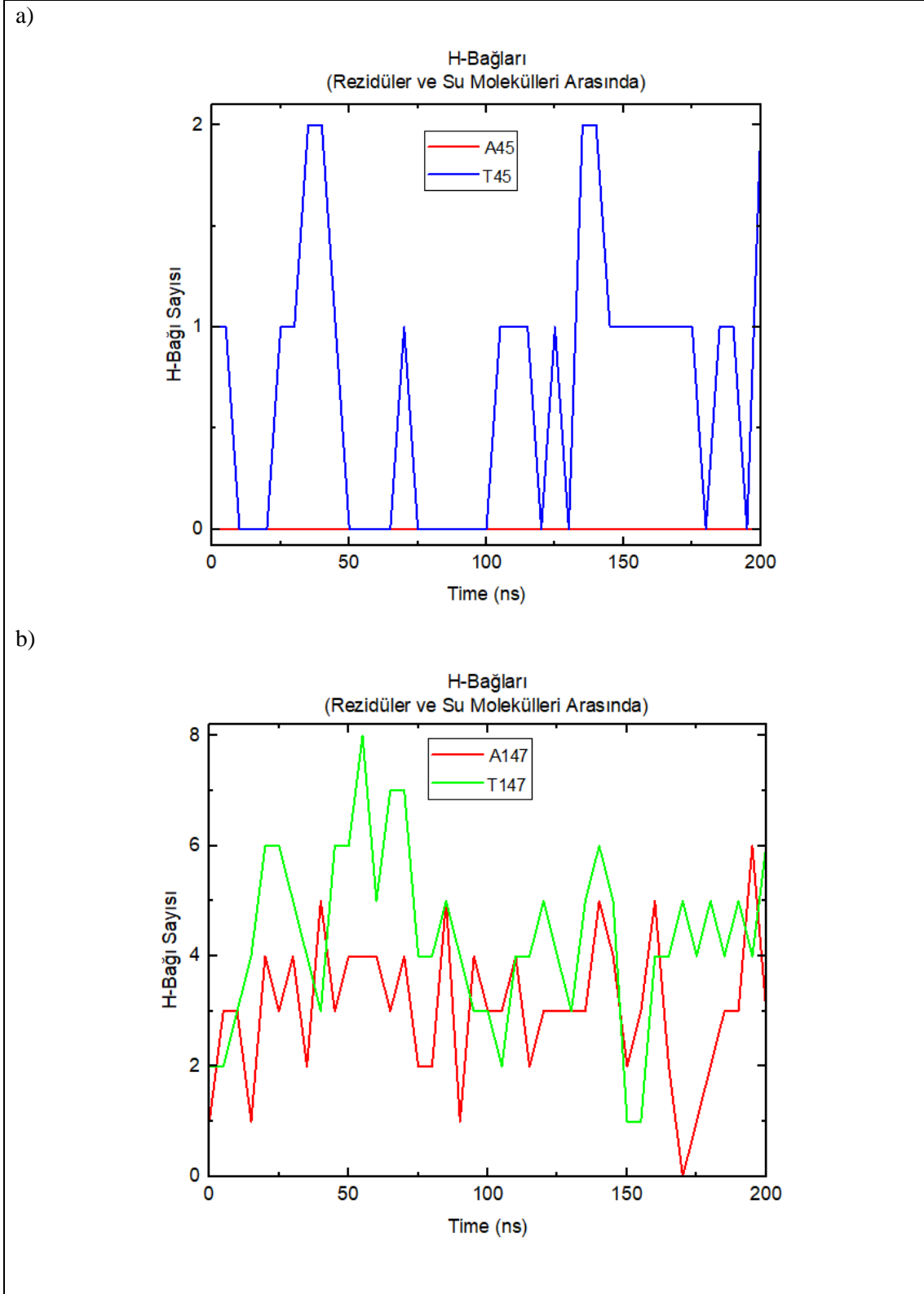


Şekil 4.5. wt-AQP2 proteini ve A45T-AQP2 mutant proteininin mutasyon bölgelerinin a) 200 ns’lık simülasyon süresi boyunca ana zincir ile yaptığı H-bağı sayıları b) wt-AQP2 c) A45T-AQP2 için 200 ns sonundaki yapının H-bağlarını gösteren anlık resim (kesikli kırmızı çizgiler H-bağlarını temsil etmektedir).



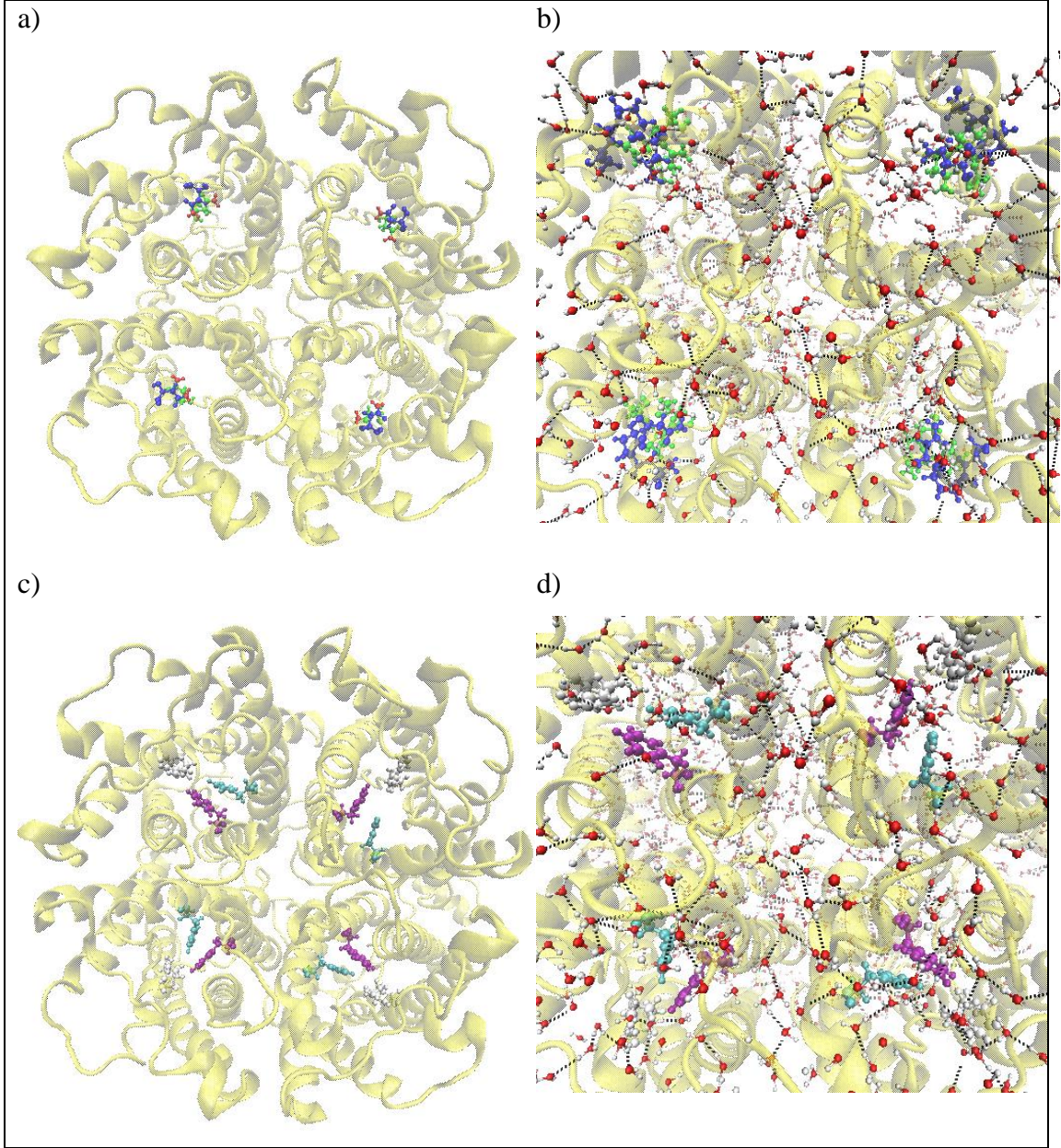
Şekil 4.6. wt-AQP2 proteini ve A147T-AQP2 mutant proteininin mutasyon bölgelerinin
a) 200 ns'lık simülasyon süresi boyunca ana zincir ile yaptığı H-bağı sayıları
b) wt-AQP2 c) A147T-AQP2 için 200 ns sonundaki yapının H-bağlarını
gösteren anlık resim (kesikli kırmızı çizgiler H-bağlarını temsil etmektedir).

Ayrıca wt-AQP2 proteini ile A45T-AQP2 mutant proteininin ve wt-AQP2 proteini ile A147T mutant proteininin mutasyon bölgelerinin (Ala ile Thr değişimi) su molekülleri ile yaptığı H-bağı sayıları hesaplanmış, Şekil 4.3.4 a ve b'de gösterilmiştir. Her iki mutasyonda da mutant rezidülerin yabancıl rezidüye göre su molekülleri ile daha çok H-bağı yaptığı görülmektedir. Bu bölgedeki H-bağı artışının kanal boyunca su geçişini olumsuz etkilediği, yani su moleküllerinin daha yavaş ya da daha az geçmesine neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.7. a) wt-AQP2 ve A45T-AQP2 ile b) wt-AQP2 ve A147T-AQP2 proteinlerinin mutasyon bölgelerinin 200 ns'lık simülasyon süresi boyunca su molekülleri ile yaptığı H-bağı sayıları.

Aquaporinlerin yüksek düzeyde korunmuş NPA dizisi, AQP2 proteininde 68-70 numaralı rezidüleri ile 184-186 numaralı rezidüleri arasında olmak üzere iki yerde bulunmaktadır. İki NPA dizisinden gelen N68 ve N184 nolu rezidüleri NH₂ grupları, Şekil 4.3.5-a'dan da görüldüğü gibi kanalın içine bakacak şekilde durdukları için, su moleküllerinin atomları ile H-bağları oluşturabilirler (Şekil 4.3.5-b). Aquaporinlerin ar/R SF ise AQP2 için F48, H172 ve R187 rezidülerinden oluşmaktadır (Şekil 4.3.5-c). Bu dizideki her rezidünün AQP2'deki su geçişinin düzenlenmesine spesifik katkıları bulunmaktadır. Hacimli, aromatik yan zincirli ve hidrofobik bir amino asit olan Phe, kanalın daralmasına neden olarak, iyonların ve daha büyük moleküllerin geçişini engel olup, sadece su moleküllerinin geçmesine katkıda bulunabilir. His'in su molekülleri ile H-bağları oluşturması ve fizyolojik pH'ta iki farklı protonasyon durumu arasında geçiş yapabiliyor olması, His'in su moleküllerinin hareketini kolaylaştırarak, kanaldan geçişlerini stabilize ettiğini düşündürmektedir. Arg pozitif yüklü bir amino asit olduğu için yakın çevresindeki su molekülleri ile elektrostatik etkileşimler kurarak, su moleküllerinin kanal boyunca geçişini stabilize edebilir. Aynı zamanda da pozitif yüklü iyonları iterek kanaldan geçişlerine engel olabilir. Özetle, bu üç rezidünün katkıları ile AQP2 kanalı içinde büyük moleküllere ve iyonlara karşı bir bariyer oluştururken, su moleküllerinin kanal boyunca doğru yönelimlerini koruyarak hareket etmesine izin veren bir ortam yaratılır (Şekil 4.3.5-d).

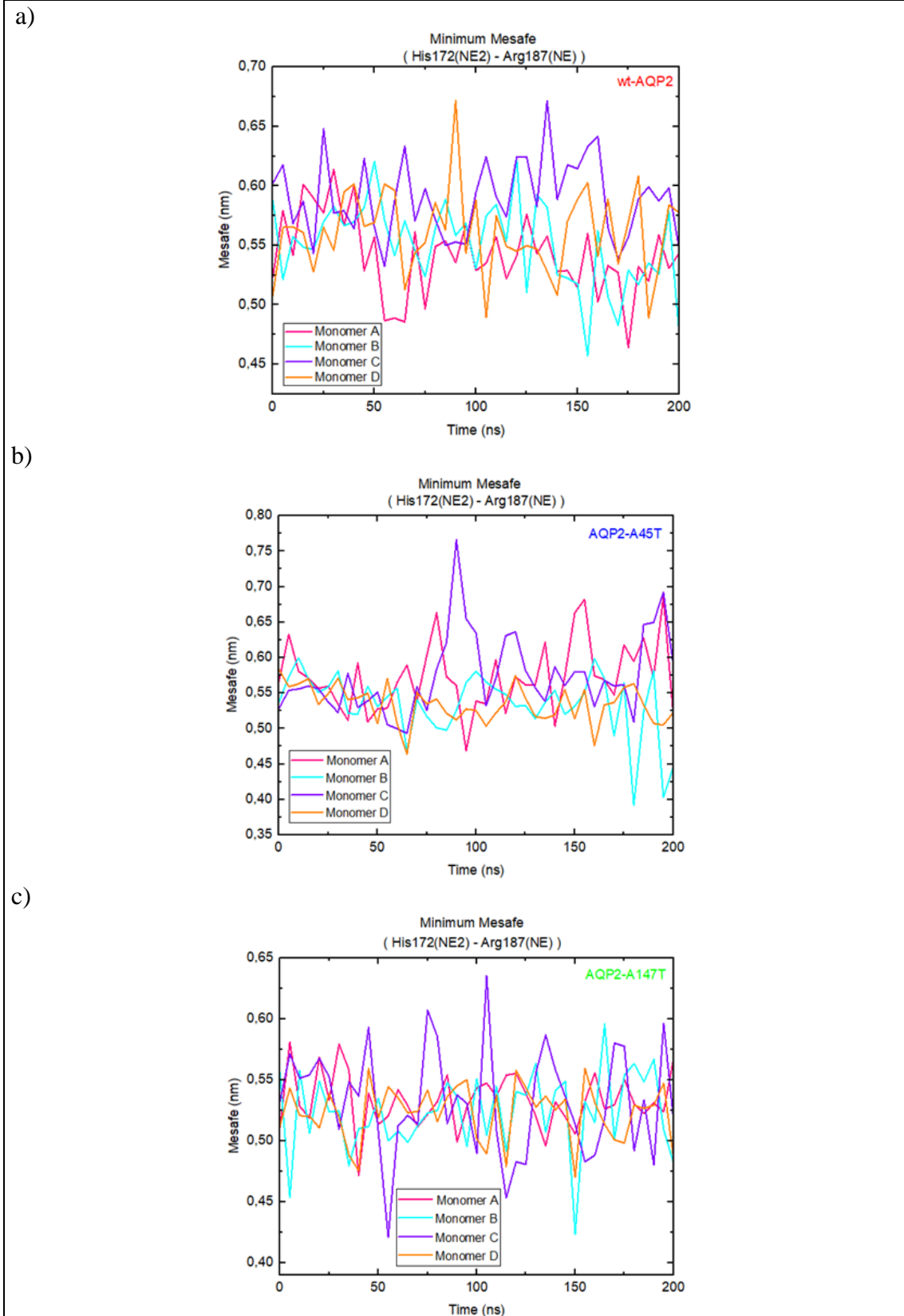


Şekil 4.8. a) NPA bölgesindeki N68 (Yeşil), N184 (Mavi) ve her iki rezidünün NH₂ uçları (Kırmızı), b) NPA'nın su molekülleri ile etkileşimi (68-69-70: Yeşil ve 184-185-186: Mavi) c) ar/R SF bölgesindeki F48 (Mor), H172 (Açık Mavi) ve R187 (Beyaz) d) ar/R SF bölgesinin su molekülleri ile etkileşimi.

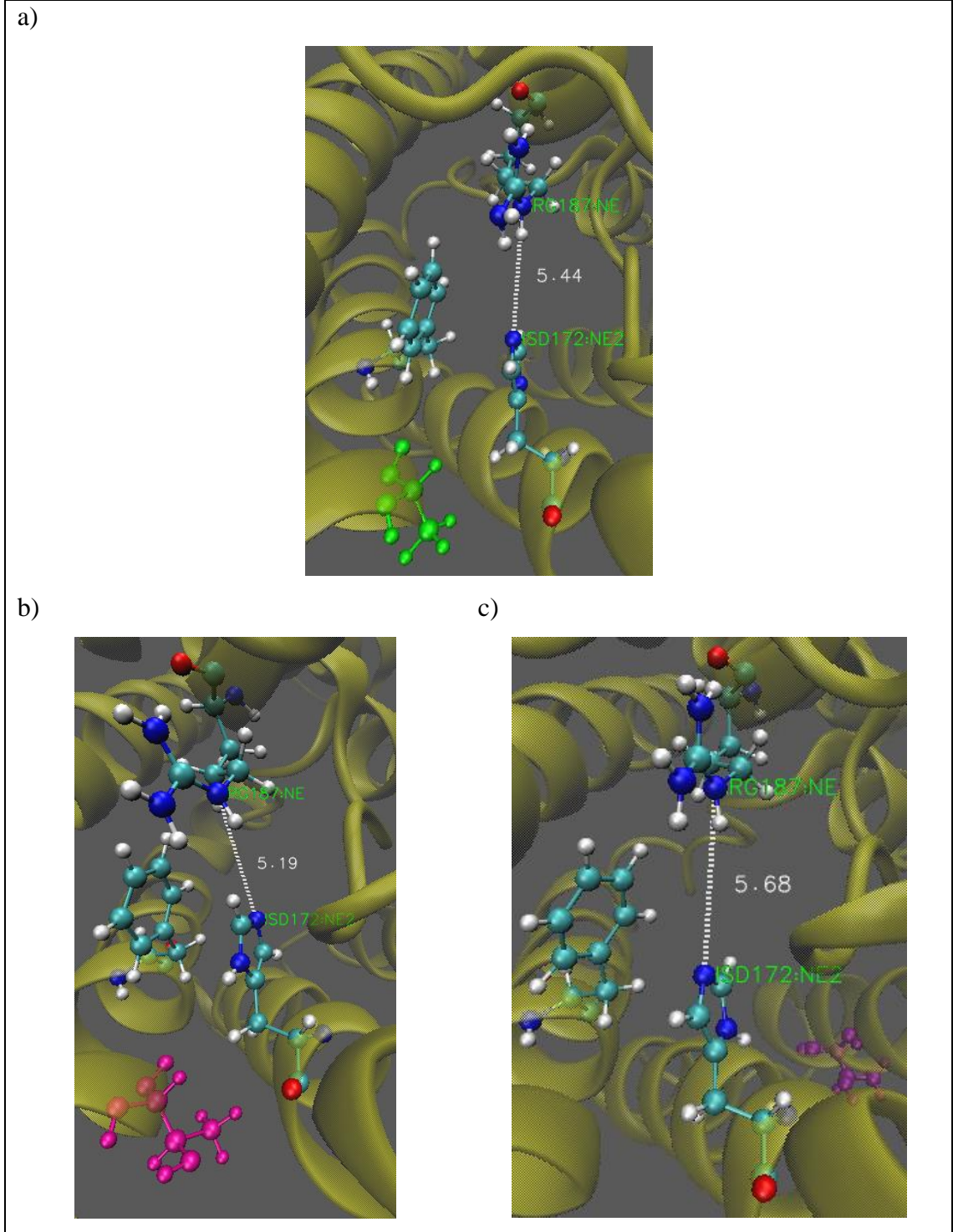
Ayrıca, Ala-Thr mutasyonları yapıldığında ar/R SF'nde bir değişiklik olup-olmadığını anlamak için, 200 ns'lik MD üretim simülasyonu boyunca, wt-AQP2, AQP2-A45T ve AQP2-A147T proteinlerinin her bir monomeri için SF bölgesinde bulunan His172'nin NE2 nitrojen atomu ile Arg187'nin NE nitrojen atomu arasındaki minimum mesafelerin ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.3.6). His'in yan zincirinde bulunan NE2 atomu imidazol halkasının bir parçası olup proton alma/verme yeteneğine sahiptir. Arg'in yan zincirinde

bulunan NE atomu ise guanidin grubunun bir parçası olup pozitif yüklüdür. Dolayısıyla her iki nitrojen atomu da proteinlerin yapısında ve işlevinde önemli bir yere sahiptir.

Ortalama olarak, bu iki atom arasındaki mesafe, mutant proteinlerin her bir monomerinde (AQP2-A45T proteininin A monomeri dışında), yabanıl tip AQP2'ye göre azalma göstermiştir. Bu da yapılan mutasyonların ar/R SF'nde su moleküllerinin taşınmasının belli ölçüde kısıtlayan bir konformasyon oluşturduğunu düşündürmektedir. SF konformasyonlarındaki değişikliklerin yakından görünümü Şekil 4.3.7' den de görülebilir.



Şekil 4.9. 200 ns'lık MD üretim simülasyonu boyunca a) wt-AQP2, b) AQP2-A45T ve c) AQP2-A147T proteinlerinin her bir monomeri için ar/R SF bölgesindeki His172'nin NE2 nitrojen atomu ile Arg187'nin NE nitrojen atomu arasındaki mesafe.



4.4. Su Dinamiği: Python

wt-AQP2 üzerine yapılan mutasyonların kanalın su geçirgenliği üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla 200 ns'lik üretim MD simülasyonları süresince wt-AQP2 ve mutantlarından geçen su sayısı Python programlama dilinde yazdığımız kod ile hesaplanmıştır. Kod, üç önemli kitaplığı içe aktararak başlamaktadır:

```
import MDAnalysis as mda
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

mutations = ['R85X', 'A45T', 'A147T', 'WILD']
colors = ['r', 'g', 'b', 'm']
```

İlk kütüphane MD simülasyonlarının analizi için kullanılan “MDAnalysis” ismindeki Python kitaplığıdır. Bu kitaplık, MD simülasyonlarından üretilen yörüngeleri analiz ederek, moleküler sistemlerin davranışını incelemek için kullanılır. İkinci kütüphane "Numerical Python" kelimesinin kısaltması olan “numpy” kütüphanesidir. Bu kitaplık, matematiksel işlemleri hızlı bir şekilde gerçekleştirmek için optimize edilmiştir. Genellikle, diziler (arrays) ve matris işlemleri için kullanılmakta olup büyük veri kümeleri üzerinde karmaşık hesaplamaları kolaylıkla gerçekleştirilmesini sağlar. Üçüncü kütüphane ise Matplotlib kütüphanesi olup pyplot alt modülü ile kullanıldığında veriler değişik grafik türleriyle görselleştirilir.

```
i= 0
while i<4:
```

Kodun bu kısmında, dört ayrı simülasyon olduğu için, kullanıcının mutasyon türünü arka arkaya dört kez seçmesi için “while” döngüsü kullanılmıştır. Döngüde, 'i' “sıfırdan” başlatılmış, sonrasında her döngü yinelemesi için “bir” arttırılmıştır.

```

x = input('Select the mutation you want to work with: \n1- R85X\n2- A45T\n3- A147T\n4- WILD\n')

u=None

if x == '1':
    u = mda.Universe("step6.0_minim_R85X_4nef.gro","total_200ns_7-product_R85X_4nef.xtc")

    # get the indices of the water molecules
    water_indices = u.select_atoms('resname TIP3').indices

    # set the specific coordinates
    xmin, ymin, zmin = 2.386, 2.288, 2.175
    xmax, ymax, zmax = 8.478, 7.933, 7.757

elif x == '2':
    u = mda.Universe("step6.0_minim_A45T_4nef.gro","total_200ns_7-product_A45T_4nef.xtc")

    # get the indices of the water molecules
    water_indices = u.select_atoms('resname TIP3').indices

    # set the specific coordinates
    xmin, ymin, zmin = 2.511, 2.851, 1.506
    xmax, ymax, zmax = 9.462, 9.782, 7.959

elif x == '3':
    u = mda.Universe("step6.0_minim_A147T_4nef.gro","total_200ns_7-product_A147T_4nef.xtc")

    # get the indices of the water molecules
    water_indices = u.select_atoms('resname TIP3').indices

    # set the specific coordinates
    xmin, ymin, zmin = 1.002, 2.931, 1.464
    xmax, ymax, zmax = 9.433, 9.886, 7.989

elif x == '4':
    u = mda.Universe("step6.0_minim_wild_4nef.gro","total_200ns_7-product_wild_4nef.xtc")

    # get the indices of the water molecules
    water_indices = u.select_atoms('resname TIP3').indices

    # set the specific coordinates
    xmin, ymin, zmin = 1.593, 2.860, 1.586
    xmax, ymax, zmax = 9.579, 10.614, 7.825

```

Kullanıcıdan 1'den 4'e kadar bir sayı girerek bir protein türü seçmesi istenir. Kullanıcının girişine bağlı olarak kod, dört tane “if-else” bloğundan birine girer. Her blok, MD simülasyonları sonunda elde edilen atom koordinatların bulunduğu “.gro” uzantılı dosya ile zaman, atom koordinatları ve hızların bulunduğu “.xtc” uzantılı dosyayı yüklemek için “Universe” nesnesini başlatır. Bundan sonra kod, 'select_atoms' yöntemini kullanarak simülasyondaki su moleküllerinin indekslerini seçer ve bunları 'water_indices' değişkeninde saklar. Seçilen mutasyona göre belirli koordinatları ("xmin", "ymin", "zmin", "xmax", "ymax", "zmax") ayarlar. Bu koordinatlar, su moleküllerinin geçeceği kanal proteinlerinin sınırlarını tanımlar.

```

# check if any water molecules are between the specific coordinates
mask = np.logical_and.reduce((water_positions[:, 0] >= xmin, water_positions[:, 0] <= xmax,
                              water_positions[:, 1] >= ymin, water_positions[:, 1] <= ymax,
                              water_positions[:, 2] >= zmin, water_positions[:, 2] <= zmax))

# update the counter if any water molecules are between the specific coordinates
count += np.sum(mask)
counts.append(count)
times.append(ts.time)

print("Number of water molecules that passed the specific coordinates: ", count)

# Get the total number of water molecules
total_water = len(water_indices)
# Get the ratio of the water molecules that pass through to the total water
ratio= count/total_water
print("Ratio of passing water to total water : ", ratio)

plt.plot(times, counts, color=colors[i], label=mutations[i])
i+= 1

plt.xlabel('Time')
plt.ylabel('Water molecules')
plt.title('Water molecules vs Time')
plt.legend()
plt.show()

```

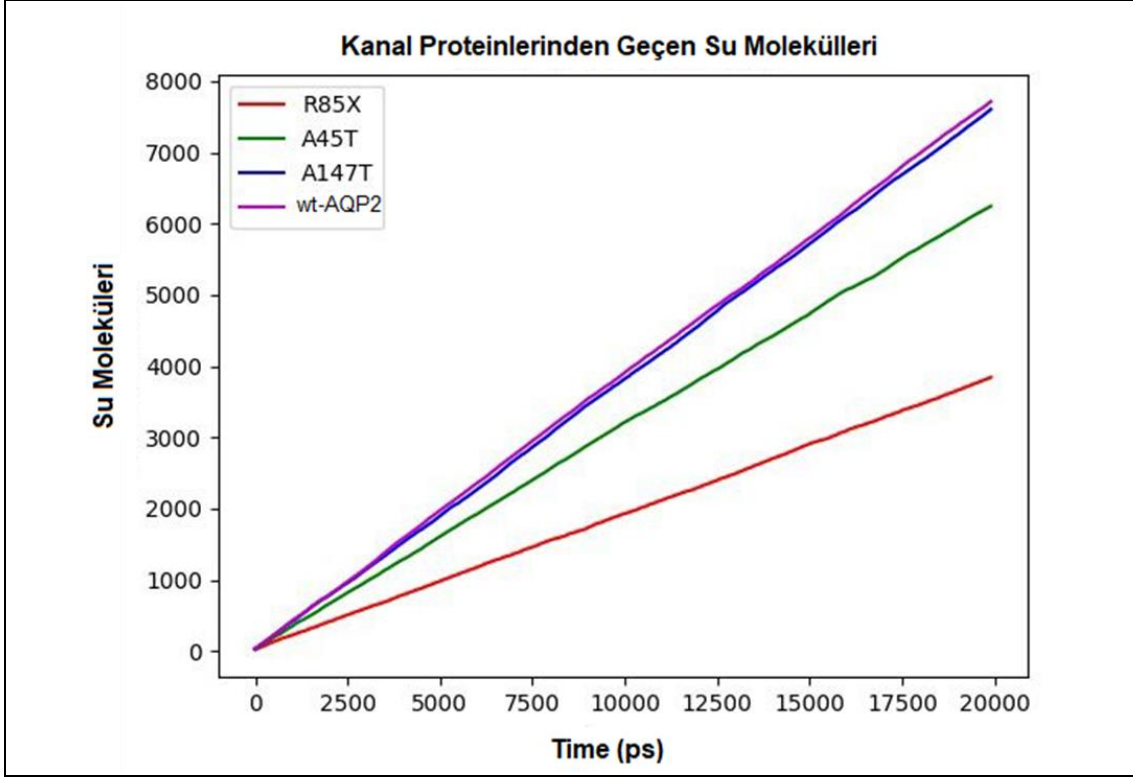
Kanal proteinlerinin sınırları olarak belirtilen koordinatlardan geçen su moleküllerinin sayısını takip etmek için bir sayaç değişkeni olan “count” başlatılır. Kod daha sonra, yörüngenin toplam 200 çerçevesini yükleyen "u.trajectory[:200]" ögesini kullanarak yörünge çerçeveleri üzerinden bir döngüye girer. Her çerçevede, su moleküllerinin konumları, seçilen su indeksleri için atom nesnesinin (object) "positions" özelliği (attribute) kullanılarak elde edilir. Sonrasında, herhangi bir su molekülünün konumunun belirtilen koordinatlar dahilinde olup-olmadığını kontrol etmek için “numpy” kütüphanesinin "logical_and.reduce" işlevi kullanılarak bir maske (mask) oluşturulur. Yani, "maske" büyük bir veri içerisinde sadece belirli koşul ya da koşullar sağlayan öğeleri seçmek için kullanılan bir kavramdır. “Maske” daha sonra "np.sum(mask)" ile maskedeki “True” değerlerini toplayarak "count" değişkenini güncellemek için kullanılır. Sonrasında, her çerçeve için belirli koordinatları geçen mevcut su molekülü sayısını yazdırır. Döngüden sonra kod, “count” ismi verilen kanal proteininden geçen su moleküllerinin, “total_water” ismi verilen olan toplam su molekülü sayısına oranını hesaplar ve yazdırır.

Özetle, bu kod yardımıyla farklı mutasyonlar seçilerek, her mutasyon için kanal proteininden geçen su moleküllerinin sayısı hesaplanabilir. Ayrıca, kanal proteininden geçen suyun toplam su molekülü sayısına oranını hesaplayabilir.

Kod çalıştırıldıktan sonra, elde edilen sonuçlarla hazırlanan Çizelge 4.4'den anlaşılacağı gibi, mutant kanallardan geçen toplam su molekülü sayısı wt-AQP2 proteinine kıyasla düşmüştür. Yani başka bir deyişle, mutant proteinler wt-AQP2'ye göre azalmış su geçirgenlik kapasitesi göstermektedirler. wt-AQP2'ye göre neredeyse kanaldan geçen su sayısının yarıya düştüğü R85X yapısı işlevini kaybetmiş bir protein halini almıştır. A147T mutasyonu A45T mutasyonuna göre daha fazla su molekülü geçirmekte olup, wt-AQP2'ye daha yakındır. Bu sonuçlar, Karaduman [15] tarafından yazılan doktora tezindeki, wt-AQP2'ye kıyasla mutantlarının su geçirgenliğini belirlemek için *Xenopus* oositler üzerine yapılan deneysel sonuçlarla uyumlu çıkmıştır (Çizelge 3.3 ve Şekil 4.4). Tezde, oositlere yabancı ve mutant cRNA'lar enjekte edildikten 24 saat sonra su geçirgenliği testi yapılmıştır. Yabancı tip cRNA enjekte edilen oositlerin hacimsel değişikliği %100 kabul edilip, mutant cRNA'ların enjekte edildiği oositlerdeki göreceli hacimsel değişiklikleri hesaplamışlardır. Sonuç olarak göreceli hacimsel değişiklikler A45T-AQP2 enjekte edilen oositler için %36, R85X-AQP2 enjekte edilen oositler için %30.25 ve A147T-AQP2 enjekte edilen oositler için %59.6 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. 200 ns üretim MD simülasyonları sonunda kanal proteinlerinden geçen toplam su molekülü sayıları.

	200 ns MD Simülasyonu Sonunda Kanalı Geçen Su Molekülü Sayısı	Kanaldan Geçen Su Moleküllerinin, Toplam Su Molekülü Sayısına Oranı	Oositlerin 1 dakikalık Süre Sonundaki Göreceli Hacimsel Değişiklikleri (%) Ref [15]
wt-AQP2	7715	0.09822644920616733	100
A45T-AQP2	6245	0.07617061241416322	%36
A147T-AQP2	7606	0.09152167111881213	%59.6
R85X-AQP2	3842	0.06982915303525991	%30.25



Şekil 4.11. 200 ns üretim MD simülasyonları boyunca kanal proteinlerden geçen su molekülü sayıları.

5. YORUM

AQP2, sadece su moleküllerinin geçmesine izin verecek, daha büyük ya da yüklü moleküllerin geçişini engelleyecek şekilde tasarlanmış, suyun hücre zarları boyunca hızlı ve seçici bir şekilde taşınmasından sorumlu olan bir kanal proteindir. Bu proteindeki bazı mutasyonlar, proteinin yapısını dolayısıyla işlevini değiştirerek, NDI başta olmak üzere böbrek fonksiyonlarını etkileyen değişik hastalıklara sebep olabilmektedir. Mergen ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel çalışmalarda NDI tanısı konmuş 15 Türk hastanın bir kısmında vazopressine duyarlı AQP2 geninde A45T, A147T ve R85X mutasyonlarına rastlanmıştır. Bu mutasyonların yabancı tip AQP2 su kanal proteini üzerine yaptığı değişiklikleri anlamak amacıyla yapılan fonksiyon analizleri sonucunda; 45 no'lu Ala'nın Thr ile değişiminin (A45T) işlevsiz bir su kanalı oluşturabileceği, 147 no'lu Ala'nın Thr ile değişiminin (A147T) yarı-işlevsel bir su kanalı oluşturabileceği ve 85 no'lu Arg rezidüsü ile beraber proteininin son bulmasının bir su kanalı oluşturamayacağı sonuçlarına varılmıştır.

Bu tezde, wt-AQP2 ile A45T-AQP2, A147T-AQP2 ve R85X-AQP2 proteinlerinden elde edilen deneysel sonuçların MD yöntemlerle karşılaştırılarak, mutasyonların kanal proteinlerin yapısında neden olacağı değişiklikler moleküler seviyede belirlenmiştir. Bu bağlamda yapılan analizler RMSD, RMSF, H-bağı sayısı ve Python programla dili ile yazdığımız kod ile belirlenen kanal boyunca geçen toplam su molekülü sayısıdır. Membran varlığında ve yokluğunda yapılan simülasyonların RMSD değerleri, mutasyonların proteinlerde yapısal değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Membran varlığında A147T-AQP2 mutant proteini diğer iki mutant proteine kıyasla wt-AQP2 proteininin yapısına daha yakın olurken, membran yokluğunda R85X-AQP2 mutant proteini wt-AQP2 proteininin yapısından iyice farklılaşmıştır. Bütün sistemlerde, RMSF değerlerinde dalgalanmaların büyük olduğu yerler döngülere karşılık gelirken, düşük dalgalanmalar, C-terminal sarmalı dışında kalan diğer sarmal bölgelerine karşılık gelmektedir. C-terminal sarmalı ise sistemlerin her bir monomerinde oldukça değişken konumludur. wt-AQP2 ve A147T-AQP2 proteinlerinin her birinin ana zincir ile yaptıkları toplam H-bağı sayısı birbirine yakın çıkarken bu sayı A45T-AQP2 proteininde biraz düşmüştür. Ayrıca, mutant rezidülerin su molekülleri ile yaptıkları h-bağı sayısı, yabancı rezidünün su molekülleri ile yaptığı h-bağı sayısından fazladır. Python programlama dilinde yazdığımız kodun sonuçlarına göre ise yabancı tip proteine göre mutant

proteinlerden daha az sayıda su molekülü geçmektedir. Bu sonuçlar hep beraber değerlendirildiğinde; yapılan mutasyonların hidrojen bağlanma bölgesini arttırdığı için su moleküllerinin de kanalın iç kısmına aşırı şekilde çekilerek geçişlerinin yavaşladığını söyleyebiliriz. Buradan da suyun AQP2'den geçişinde hidrojen bağlanma bölgelerinin sayısı kadar düzeni ve dağılımının da işlevi yani verimli su taşınması açısından önemli olduğunu söyleyebiliriz.

Bu tezde elde edilen sonuçlar, Karaduman tarafından yazılan doktora tezinde elde edilen deneysel sonuçları desteklediği gibi literatürde bulunan diğer modelleme çalışmaları ile de tutarlıdır. Bildiğimiz kadarıyla literatürde wt-AQP2 proteini ve bazı mutasyonlar ile ilgili MD simülasyonları bulunsa da AQP2-A45T, AQP2-A147T ve AQP2-R85X mutasyonları ile ilgili bir modelleme çalışması bulunmamaktadır. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar, wt-AQP2 ve mutantları hakkındaki belirsizliklerin aydınlatılmasına yardımcı olarak, ilaç tasarımına faydalı olabilir. Ayrıca yazdığımız Python kodu başka mutasyonların sonuçlarını görebilecek şekilde düzenlenebilecek genel bir kod olup, yine literatürde bu amaç için yazılmış bir koda rastlanılmamıştır.

KAYNAKLAR

- [1] S. Sasaki, K. Fushimi, H. Saito, F. Saito, S. Uchida, K. Ishibashi, M. Kuwahara, T. Ikeuchi, K. Inui, K. Nakajima, T. X. Watanabe and F. Marumo, *J. Clin. Invest.:* Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct, 93, (1994) 1250. Note: Erratum: *J. Clin. Invest.* 94 (1994), following 2169.
- [2] P. Agre, *Journal of the American Society of Nephrology: Aquaporin Water Channels in Kidney*, 11 (2000), 764.
- [3] Frick *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA: X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking*, 111 (2014), 6305.
- [4] S. M. Mulders *et al.*, *J Am Soc Nephrol.: New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels*, 8 (1997), 242.
- [5] J. Loonen *et al.*, *Semin Nephrol.: Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus*, 28 (2008), 252.
- [6] E. Sohara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA: Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation*, 103 (2006), 14217.
- [7] D. J. Lloyd *et al.*, *PLOS Genetics: Diabetes Insipidus in Mice with a Mutation in Aquaporin-2*, 1 (2005), e20.
- [8] Q. Li *et al.*, *Frontiers in Endocrinology: Novel AQP2 Mutations and Clinical Characteristics in Seven Chinese Families With Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus*, 12 (2021), 686818, 1.
- [9] C. J. Hagströmer *et al.*, *Sci. Rep.: Structural and functional analysis of aquaporin-2 mutants involved in nephrogenic diabetes insipidus*, 13, (2023) 14674.
- [10] P. Bissonnette *et al.*, *Physiol Rep.: Further evidence for functional recovery of AQP2 mutations associated with nephrogenic diabetes insipidus*, 9 (2021), e14866.
- [11] R. Gitte *et al.*, *Kidney International Reports: A Novel AQP2 Sequence Variant Causing Aquaporin-2 Retention in the Cytoplasm and Autosomal Dominant Nephrogenic Diabetes Insipidus*, 7 (2022), 2289.
- [12] Lina M *et al.*, *Frontiers in Pediatrics: A Case of Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus Caused by Thr108Met Variant of Aquaporin 2*, 8 (2020), 1.
- [13] D. Duzenli *et al.*, *Endocrine, Mutations in the AVPR2, AVP-NP11, and AQP2 genes in Turkish patients with diabetes insipidus*, 42 (2012), 664.

- [14] T. Karaduman *et al.*, *Biologia*: Functional analysis of AQP2 mutants found in patients with diabetes insipidus, 76 (2021), 2767.
- [15] T. Karaduman, *Diabetes İnsipidus'lu Hastaların Aqp2 Geninde Tanımlanan Mutasyonların Fonksiyonel Analizleri*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2018.
- [16] P. Agre P, *Proc Am Thorac Soc.*: The akuaporin water channels, 3 (2006), 5.
- [17] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, Washington, DC: ASM PRESS. 544. ISBN 978-0-87893-300-6, 2009.
- [18] L. Janosi, L and M. Ceccarelli, *PLoS One*: The gating mechanism of the human aquaporin 5 revealed by molecular dynamics simulations, 8 (2013), e59897.
- [19] S. Kaptan *et al.*, *Structure*: H95 Is a pH-Dependent gate in Aquaporin 4, 23 (2015), 2309.
- [20] Pelagalli *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*: Aquaporins in health and disease: an overview focusing on the gut of different species. 17 (2016), 1213.
- [21] C.Fortuna *et al.*, *FEBS J.*: Gating in plant plasma membrane aquaporins: the involvement of leucine in the formation of a pore constriction in the closed state. 286 (2016), 3473.
- [22] P. Agre, M. Bonhivers, and M. J. Borgnia, *J. Biol. Chem.*: The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. 273 (1998), 14659.
- [23] G. M. Preston *et al.*, *Science*: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. 256 (1992), 385.
- [24] D. Kozono *et al.*, *J Clin Invest*: “Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine, 109 (2002), 1395.
- [25] Azad *et al.*, *PLoS One*: Genome-wide characterization of major intrinsic proteins in four grass plants and their non-aqua transport selectivity profiles with comparative perspective, 11 (2016), e0157735.
- [26] S. Verkman, M. Hara-Chikuma and M. C. Papadopoulos, *J. Mol. Med.*: Aquaporins–new players in cancer biology, 86 (2008a), 523.
- [27] S. Verkman, J. Ruiz-Ederra, and M. H. Levin, *Prog. Retin. Eye Res.*: Functions of aquaporins in the eye. 27 (2008b), 420.
- [28] O. Verkerk, E. M. Lodder, E and R. Wilders, R. *Int. J. Mol. Sci.*: Aquaporin channels in the heart-physiology and pathophysiology, 20 (2019), 2039.
- [29] E. Pérez *et al.*, *Brain. Res.*: Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease, 1128 (2007), 164.
- [30] T. Misawa, K. Arima, H. Mizusawa, and J. Satoh, *Acta Neuropathol.*: Close association of water channel AQP1 with amyloid- deposition in Alzheimer disease brains, 116 (2008), 247.

- [31] P. M. Tricarico *et al.*, *Int J Mol Sci.*: Aquaporins Are One of the Critical Factors in the Disruption of the Skin Barrier in Inflammatory Skin Diseases, 23 (2022), 4020.
- [32] W. Wang *et al.*, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*: Role of AQP1 in endotoxemia-induced acute kidney injury. 294 (2008), F1473.
- [33] Y. Lu *et al.*, *J. Diabetes Complicat.*: Urine AQP5 is a potential novel biomarker of diabetic nephropathy, 30 (2016), 819.
- [34] M. Halsey *et al.*, *Cells: Aquaporins and Their Regulation after Spinal Cord Injury*, 7 (2018), 174.
- [35] T. Gonen and T. Walz, *Q. Rev. Biophys.*: "The structure of aquaporins. 39 (2006), 361.
- [36] D. Fu and M. Lu, *Mol. Membr. Biol.*: The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins, 24 (2007), 366.
- [37] E. Tajkhorshid *et al.*, *Science*: Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning, 296 (2002), 525.
- [38] E. Beitz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*: Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. 103 (2006), 269.
- [39] Y. Wang, K. Schulten, and E. Tajkhorshid, *Structure: What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF*, 13 (2005), 1107.
- [40] H. Hadidi, R. Kamali, and A. Binesh, *Proteins: Investigation of the aquaporin-2 gating mechanism with molecular dynamics simulations*, 89 (2021), 819.
- [41] P. M. T Deen, *et al.*, *Cytogenet. Cell Genet.*: Assignment of the human gene for the water channel of renal collecting duct aquaporin 2 (AQP2) to chromosome 12 region q12-q13", 66 (1994), 260.
- [42] L. Bai, K. Fushimi, S. Sasaki, and F. Marumo, *The Journal of Biological Chemistry: Structure of Aquaporin-2 Vasopressin Water Channel*, 271 (1996), 5171.
- [43] T. Rai *et al.*, *JASN: Urinary Excretion of Aquaporin-2 Water Channel Protein in Human and Rat*, 8 (1997), 1357.
- [44] R. S. Pedersen *et al.*, *Am J Physiol Renal Physiol*: Effect of water deprivation and hypertonic saline infusion on urinary AQP2 excretion in healthy humans, 280 (2001), F860.
- [45] Y. Miyazawa *et al.*, *Clinical and Experimental Nephrology: AQP2 in human urine is predominantly localized to exosomes with preserved water channel activities*, 22 (2018), 782.
- [46] C. Graffe, J. N. Bech and E. B. Pedersen, *Am J Physiol Renal Physiol*: Effect of high and low sodium intake on urinary aquaporin-2 excretion in healthy humans, 302 (2012), F264.

- [47] H. B. Moeller, S. Rittig, R. A. Fenton, *Endocr. Rev.*: Nephrogenic diabetes insipidus: Essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment, 34 (2013), 278.
- [48] Wesche, P. M. Deen and N. V. Knoers, *Pediatr Nephrol.*: Congenital nephrogenic diabetes insipidus: The current state of affairs. 27 (2012), 2183.
- [49] S. Ozer *et al.*, *Cellular and Molecular Life Sciences*: “Molecular characterization of an aquaporin-2 mutation causing a severe form of nephrogenic diabetes insipidus, 77 (2020), 953.
- [50] R. Vargas-Poussou *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*: Mutations in the vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 genes in 12 families with congenital nephrogenic diabetes insipidus, 8 (1997), 1855.
- [51] S.M. Mulders *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*: New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels. 8 (1997), 242.
- [52] B-G Han, A. B Guliaev, P. J Walian and B.K Jap, *J Mol Biol.*: Water transport in AQP0 aquaporin: molecular dynamics studies, 360 (2006), 285.
- [53] Zhu, E. Tajkhorshid and K. Schulten, *FEBS Lett.*: Molecular dynamics study of aquaporin-1 water channel in a lipid bilayer, 504 (2001), 212.
- [54] D. K. Yadav *et al.*, *Front. Chem.*: Computational Modeling on Aquaporin-3 as Skin Cancer Target: A Virtual Screening Study, 8 (2020), 1.
- [55] Y. Cui and D.A. Bastien, *Biochem Biophys Res Commun.*: Water transport in human aquaporin-4: Molecular dynamics (MD) simulations, 9 (2011), 1.
- [56] L. Janosi and M. Ceccarelli, *PLOS One*: The Gating Mechanism of the Human Aquaporin 5 Revealed by Molecular Dynamics Simulations, 8 (2013), e59897-1.
- [57] M. Hashido, M. Ikeguchi and Kidera A., *FEBS Lett.*: Comparative simulations of aquaporin family: AQP1, AQPZ, AQP0 and GlpF, 579 (2005), 5549.
- [58] A.R. Binesh and R. Kamali, *Biophys Chem.*: Molecular dynamics insights into human aquaporin 2 water channel, 207 (2015), 107.
- [59] S. Padhi and U. D. Priyakumar, *BBA Biomembranes*: Microsecond simulation of human aquaporin 2 reveals structural determinants of water permeability and selectivity, 1859 (2017), 10.
- [60] H. Hadidi, R. Kamali and A. Binesh, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*: Dynamics and energetics of water transport through aquaporin mutants causing nephrogenic diabetes insipidus (NDI): A molecular dynamics study, 40 (2022), 1273.
- [61] H.M. Berman *et al.*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*: The Protein Data Bank”, 58 (2002), 899.

- [62] Šali and T. L. Blundell, *J. Mol. Biol.*: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, 234 (1993), 779.
- [63] Leaver-Fay, A. *et al.*, *Meth. Enzym.*: Rosetta3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules, 487 (2011), 545.
- [64] J. Zhang *et al.*, *Proteins*: MUFOLD: A new solution for protein 3D structure prediction. 78 (2010), 1137.
- [65] K. Arnold *et al.*, *Bioinformatics*: The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, 22 (2006), 195.
- [66]] A. Roy, A. Kucukural and Y. Zhang, *Nat. Protocols*: I-tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. 5 (2010), 725.
- [67] T. Karaduman T *et al.*, *Molecular and clinical identification of A45T mutation in AQP2 gene*, 18th European Congress of Endocrinology (ECE 2016), Munich, Germany. *Endocrine Abstracts*, 2016.
- [68] G.C.P van Zundert *et al.*, *J. Mol. Biol.*: The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes, 428 (2016), 720.
- [69] Haddock / Haddock-Tools, <https://github.com/haddock/haddock-tools> (Erişim tarihi: 6 Ağustos 2013).
- [70] Rouser, G. Simon and G. Kritchevsky, *Lipids: Species Variations in Phospholipid Class Distribution of Organs: I. Kidney, Liver and Spleen*, 4 (1969), 599.
- [71] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, and W. Im, *J. Comput. Chem.*, CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. 29 (2008), 1859.
- [72] J. Lee *et al.*, *J. Chem. Theory Comput.*: CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations using the CHARMM36 Additive Force Field. 12 (2016), 405.
- [73] M. A. Lomize, A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, and H. I. Mosberg, *OPM: Orientations of Proteins in Membranes database*”, *Bioinformatics*, 22 (2006), 623.
- [74] J. Alder, T. Wainwright, *The Journal of Chemical Physics: Studies in Molecular Dynamics. I. General Method*, 31 (1959), 459.
- [75] L. Verlet, *Phys. Rev.*: Computer 'experiments' on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules, 159 (1967) 98.
- [76] M. J. Abraham *et al.*, *SoftwareX*: GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, 1 (2015) 19.
- [77] P. Smith and W. Vangunsteren, *Chem. Phys. Lett.*: The viscosity of SPC and SPC/E water at 277-K and 300-K, 215 (1993) 315.
- [78] N. Schmid *et al.*, *European Biophysics Journal*: Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7, 40 (2011), 843.

- [79] H.J.C. Berendsen *et al.*, J. Chem. Phys. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath, 81 (1984), 3684.
- [80] Bussi, D. Donadio, and M. J. Parrinello, Chem. Phys.: Canonical sampling through velocity rescaling, 126 (2007) 014101.
- [81] Hess, H. Bekker, H. Berendsen, and J. Fraaije, J. Comput. Chem.: LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, 18 (1997) 1463.
- [82] U. Essmann *et al.*, J. Chem. Phys.: A smooth particle mesh Ewald method, 103 (1995), 8577.
- [83] S. Nosé, Mol. Phys.: A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble, 52 (1984) 255.
- [84] W.G. Hoover, Phys. Rev. A: Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions, 31 (1985), 1695.
- [85] M. Parrinello and A. Rahman, J. Appl. Phys.: Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, 52 (1981), 7182.
- [86] R. B. Best *et al.*, J Chem Theory Comput.: Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 dihedral angles.8 (2012), 3257.
- [87] J. B. Klauda *et al.*, J Phys Chem B.: Update of the CHARMM allatom additive force field for lipids: validation on six lipid types, 114 (2010), 7830.
- [88] W. L. Jorgensen *et al.*, J Chem Phys.: Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, 79 (1983), 926.