

**DİABETES İNSİPIDUS TANILI HASTALARIN *AVP-NPİİ*
GENİNDE TANIMLANAN MUTASYONLARIN
FONKSİYONEL ANALİZLERİ**

**FUNCTIONAL ANALYSES OF MUTATIONS FOUND IN
AVP-NPİİ GENE OF PATIENTS DIAGNOSED WITH
DIABETES INSIPIDUS**

MERVE ÖZCAN TÜRKMEN

PROF. DR. HATİCE MERGEN
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

ÖZET

DİABETES İNSİPIDUS TANILI HASTALARIN AVP-NPII GENİNDE TANIMLANAN MUTASYONLARIN FONKSİYONEL ANALİZLERİ

Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Temmuz 2020, 131 sayfa

Sağlıklı bireylerde kan ozmolalitesi, vücut su dengesini ayarlayan mekanizmalar aracılığıyla belirli sınırlar içerisinde tutulmaktadır. Plazma ozmolalitesindeki artış veya kan hacmindeki azalma ile böbreklere suyu koruması için sinyal gönderilerek susuzluk uyarılmaktadır. Bu uyarılma sonucu, arka hipofizde depolanmakta olan arjinin vazopressin hormonu (AVP, ADH, antidiüretik hormon) kana salınmaktadır. AVP hormonu, kan dolaşımı yoluyla böbreklere gelerek toplama kanalı hücrelerindeki arjinin vazopressin reseptör 2 (AVPR2)'ye bağlanmaktadır. AVP'nin AVPR2'ye bağlanması, hücre içerisinde bulunan akuaporin 2 su kanal proteinlerinin (AQP2) fosforillenerek apikal membrana yerleşmelerini sağlamaktadır. AQP2 su kanalı aracılığıyla ihtiyaç duyulan suyun geri emilimi gerçekleşmekte ve böylece vücuttaki su dengesi tekrar kurulmaktadır. Bu mekanizma içerisinde oluşabilecek herhangi bir aksaklık vücudun su dengesinin bozulmasına ve poliüri, polidipsi ile karakterize olan Diabetes insipidus (DI) hastalığının gelişimine neden olmaktadır.

DI, AVP hormonun yetersiz sentezi ve/veya salınımına bağlı olarak santral tip (CDI) veya böbreklerde AVP'ye karşı yetersiz cevap oluşmasına bağlı olarak nefrojenik tipte (NDI) olabilmektedir. CDI, kafa travmaları, beyin tümörleri, cerrahi operasyonlar veya çeşitli hastalıklar sonucu nörohipofiz bölgesinin hasarı nedeniyle sonradan meydana gelebileceği gibi, *arjinin vazopressin-nörofizin II (AVP-NPII)* geninde bulunan mutasyonlar nedeniyle

kalıtsal olarak da oluşabilmektedir. *AVP-NP11* geni ile ilgili yapılan çalışmalarda, gendeki mutasyonlar nedeniyle öncül hormonun düzgün bir şekilde katlanması ve işlenmesinde başarısızlık olduğu bulunmuştur. Bunun sonucunda mutant proteinin endoplazmik retikulum (ER) içerisinde birikerek protein agregasyonları oluşturduğu ve diğer esansiyel proteinlerin düzenli işlenmesini engelleyerek magnoselüler sinir hücrelerinin ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, DI tanısı konmuş hastaların *AVP-NP11* geninde tanımlanmış G45C, 207_209delGGC ve G88V mutasyonlarına ilişkin literatürde yer almayan fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla yapılan deneysel çalışmalarda, yabancı tip *AVP-NP11* geni içeren ifade vektörü üzerinde ilgili mutasyonlar bölgeye yönelik mutagenез yöntemi kullanılarak oluşturulmuş ve vektörlerin Neuro2A hücrelerine geçici transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Neuro2A hücreleri tarafından besiyerine salınan yabancı tip ve mutant AVP miktarları radyoimmün analiz (RIA) ve enzim-bağlı immünosorbent analiz (ELISA) yöntemleri olmak üzere iki ayrı yöntem ile belirlenmiştir. Yabancı tip ve mutant öncül hormonların hücre içi trafiklerindeki farklılıkları belirleyebilmek için floresan görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, AVP miktarının belirlenmesinde kullanılan RIA yönteminin gerçekleştirilmesi zor ve uzun süren bir yöntem olmasından dolayı, yerine alternatif bir yöntem olarak daha hızlı sonuç veren ve gerçekleştirilmesi kolay olan ELISA yönteminin kullanılabilirliği istatistiksel bir analiz olan Bland-Altman yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmanın sonucunda G45C ve G88V mutant proteinlerin yabancı tip AVP-NP11 proteinine göre hücre kültürü ortamında önemli ölçüde azalmış miktarda bulunduğu ve hücrede ER içerisinde takılı kaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, 207_209delGGC mutant proteinin ise, hücre kültürü ortamında yabancı tip proteine yakın miktarda bulunduğu ve yabancı tip ile benzer şekilde ER'de takılı kalmayarak hücre içi kompartmanlara dağıldığı gözlenmiştir. G45C ve G88V mutasyonlarının öncül hormonun düzgün katlanması, üç boyutlu yapısını kazanması, işlenmesi veya hücre içi trafiği gibi süreçlerde önemli etkilere sahip olduğu, 207_209delGGC mutasyonunun ise bu süreçlerde herhangi bir önemli etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca AVP miktarının belirlenmesinde, ELISA yönteminin RIA yöntemi yerine alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Diabetes insipidus, *AVP-NP11*, Fonksiyonel analiz, RIA, ELISA

ABSTRACT

FUNCTIONAL ANALYSES OF MUTATIONS FOUND IN *AVP-NPII* GENE OF PATIENTS DIAGNOSED WITH DIABETES INSIPIDUS

Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

July 2020, 128 pages

In healthy individuals, blood osmolality is kept within certain limits through mechanisms that regulate body water balance. Thirst is stimulated by sending signals to the kidneys for water protection with an increase in plasma osmolality or a decrease in blood volume. As a result of this stimulation, the arginine vasopressin hormone (AVP, ADH, antidiuretic hormone) which is stored in the posterior pituitary, is released into the blood. The AVP hormone reaches to the kidneys through the bloodstream and binds to arginine vasopressin receptor 2 (AVPR2) in the collection duct cells. The binding of AVP to the AVPR2 leads to the aquaporin 2 water channel proteins (AQP2) to be phosphorylated and settle in the apical membrane. The reabsorption of the required water takes place through the AQP2 water channel, thus the water balance in the body is reestablished. Any malfunction that may occur within this mechanism causes disruption of the body's water balance and the development of Diabetes insipidus (DI) disease, which is characterized by polyuria and polydipsia.

DI can be either central type (CDI) due to inadequate synthesis and/or release of AVP hormone or nephrogenic type (NDI) due to inadequate response of the kidney to AVP. CDI can be either acquired by damage to the neurohypophysis region as a result of head injuries, brain tumors, surgical operations or various diseases or can be congenital due to mutations in the *vasopressin-neurophysin II (AVP-NPII)* gene. In many studies

concerning *AVP-NP11*, it has been found that the precursor hormone fails during proper folding and processing due to mutations in the *AVP-NP11* gene. As a consequence, the mutant protein accumulates in the endoplasmic reticulum (ER), generates protein aggregations and leads to the death of magnocellular nerve cells by preventing the regular processing of other essential proteins.

The aim of this thesis is to perform functional analyzes of G45C, 207_209delGGC and G88V mutations defined in the *AVP-NP11* gene of patients diagnosed with DI, which are not included in the literature. In the experimental studies, the relevant mutations on the expression vector containing the wild-type *AVP-NP11* gene were created using the site-directed mutagenesis method and transient transfection of these vectors to Neuro2A cells was performed. The amount of wild type and mutant AVP that were released into the medium by Neuro2A cells were determined by two separate methods, namely radioimmunoassay (RIA) and Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Fluorescence imaging studies were performed to determine the differences in the intracellular traffic of wild-type and mutant precursor hormones. In addition, since the RIA method used in determining the amount of AVP is a difficult and long-lasting method, the usability of the ELISA method, which provides faster results and is easy to perform as an alternative method for RIA, was evaluated by the Bland-Altman method, which is a statistical analysis.

As a result of the study, it was determined that G45C and G88V mutant proteins were significantly reduced in the cell culture medium compared to wild type AVP-NP11 protein and were trapped in the ER in the cell. However, it was observed that the amount of 207_209delGGC mutant protein is similar to the wild type protein in the cell culture medium and was distributed in intracellular compartments by not being trapped in ER, likewise the wild type. It has been concluded that G45C and G88V mutations have significant effects in processes such as the proper folding, gain of three-dimensional structure, processing, or intracellular traffic of the precursor hormone, and the 207_209delGGC mutation does not have any significant effect in these processes. In addition, it was determined that ELISA method can be used as an alternative method instead of RIA method in determining the amount of AVP.

Keywords: Diabetes insipidus, *AVP-NP11*, Functional analysis, RIA, ELISA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana her konuda yardımcı olan, Konya'ya git-gel yaparak tamamladığım zorlu tez dönemimde anlayış ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Tez izleme komitesinde bulunarak bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, tez çalışmasının ilerlemesine büyük katkı sağlayan Sayın Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN ve Sayın Doç. Dr. Yeşim DOĞAN'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında bana birçok kez laboratuvarının kapılarını açan Sayın Doç. Dr. Muhittin SERDAR'a,

Tez çalışmam için maddi destek sağlayan TÜBİTAK ve Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Kurum Koordinasyon Birimi'ne,

Laboratuvarda deneysel çalışmalarım için bana yol gösteren Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER ve Dr. Beril ERDEM TUNÇDEMİR'e,

"İyi ki tanışmışım" dediğim, her konuda güvendiğim, birlikte çalışmaktan keyif aldığım canım dostum Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a,

Desteğe ihtiyaç olduğum zamanlarda varlıkları ile güç ve neşe veren Dilara ŞAHİN HALICI ve Gülsen BAYRAK'a,

Büyük özveri ve fedakârlıklarla beni büyütüp bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca bana her koşulda destek veren, yoğun çalışma sürecimde aylarca yüzlerini göremediğim ve bunu sevgi, anlayışla karşılayan babam Burhan ÖZCAN'a, annem Lale ÖZCAN'a, kardeşim Selen ÖZCAN'a,

Her ihtiyacım olduğunda yanımda olduklarını bildiğim ve çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen ablam Melda ÖZCAN TAŞ'a, abim Fatih TAŞ'a, benden uzakta büyüyen ve kokusuna hasret kaldığım canım minnoşum Berin TAŞ'a,

Tez çalışması sırasında uzun süre görüşememize gösterdikleri anlayış ve bana olan sevgi ve destekleri için diğer babam Tufan TÜRKMEN'e, diğer annem Nevin TÜRKMEN'e ve kardeşim Korcan TÜRKMEN'e,

İyi ve kötü her an yanıbaşımdayken olan, sonsuz sabırla her işimi kolaylaştıran, tez çalışmamın her anında emeği olan, birlikte her zorluğun üstesinden gelebileceğimize inandığım, beni benden çok düşünen sevgili eşim Dr. Gencer TÜRKMEN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Merve ÖZCAN TÜRKMEN
Temmuz 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes İnsipidus	3
2.1.1. Diabetes İnsipidus Tipleri	6
2.1.1.1. Gestasyonel Diabetes İnsipidus	6
2.1.1.2. Primer polidipsi	7
2.1.1.3. Nefrojenik Diabetes İnsipidus	7
2.1.1.3.1. Edinilmiş NDI	7
2.1.1.3.2. Konjenital NDI	8
2.1.1.3.2.1. AVPR2 Geni ve X'e Bağlı NDI	8
2.1.1.3.2.2. AQP2 Geni ve Otozomal Çekinik/Baskın NDI	11
2.1.1.4. Santral Diabetes İnsipidus	15
2.1.1.4.1. Edinilmiş CDI	16
2.1.1.4.2. Konjenital CDI	16
2.1.1.4.2.1. AVP-NP _{II} Geni, İşlenmesi ve AVP Biyosentezi	17
2.1.1.4.2.2. AVP-NP _{II} Geni Mutasyonları	21
2.1.1.4.2.3. Otozomal Baskın CDI	23
2.1.1.4.2.4. Otozomal Çekinik CDI	26

2.1.1.4.2.5. X'e Bağlı Çekinik CDI	28
2.1.2. Diabetes İnsipidus Tanısı	29
2.1.3. Diabetes İnsipidus Tedavisi.....	32
2.1.3.1. Gestasyonel DI Tedavisi	32
2.1.3.2. Primer Polidipsi Tedavisi.....	33
2.1.3.3. Nefrojenik Diabetes İnsipidus Tedavisi	34
2.1.3.4. Santral Diabetes İnsipidus Tedavisi	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Fonksiyonel Analiz Çalışmaları Gerçekleştirilecek olan Mutasyonların Belirlenmesi	41
3.2. <i>AVP-NPII</i> Genini Taşıyan İfade Vektörünün Temin Edilmesi.....	44
3.3. Bölgeye Yönelik Mutagenез Yöntemi Kullanılarak Oluşturulan Mutant <i>AVP-NPII</i> Gen Dizilerini İçeren Uygun İfade Vektörlerinin Hazırlanması	46
3.4. Oluşturulan Mutant <i>AVP-NPII</i> Gen Dizilerinin DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Doğrulanması	52
3.5. Yabancı Tıp ve Mutant <i>AVP-NPII</i> Gen Dizilerini İçeren Vektörlerin Neuro2A Hücrelerine Transfeksiyonu	55
3.5.1. Neuro2A Hücrelerinin Üretilmesi	55
3.5.2. Neuro2A Hücrelerinin Pasajlanması.....	56
3.5.3. Transfeksiyon İşlemi İçin Neuro2A Hücrelerinin Hazırlanması	56
3.5.4. DNA/Besiyeri Karışımının Hazırlanması.....	57
3.5.5. Lipofectamin 2000/Besiyeri Karışımının Hazırlanması	58
3.5.6. Transfeksiyon İşlemi.....	59
3.6. Hücre Kültürü Süpernatantlarında AVP Düzeylerinin RIA ve ELISA Yöntemleri ile Belirlenmesi	61
3.6.1. Neuro2A Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu.....	62
3.6.2. Örneklere Ait Total Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	63
3.6.2.1. BCA Protein Assay Kit İçin Reaktiflerin Hazırlanması	64

3.6.2.2. Örneklerle Ait Total Protein Konsantrasyonlarının BCA Protein Assay Kit ile Belirlenmesi	65
3.6.3. AVP Miktarlarının Radioimmunoassay (RIA) Yöntemi ile Belirlenmesi	66
3.6.3.1. RIA Yöntemi Basamakları	67
3.6.4. AVP Miktarlarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	70
3.6.4.1. ELISA Yöntemi için Reaktiflerin Hazırlanması	71
3.6.4.2. ELISA Yöntemi.....	72
3.7. Neuro2A Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışmaları	74
3.7.1. Neuro2A Hücrelerinin ER-İzleyici ile Boyanması Protokolü.....	74
3.8. İstatiksel Analiz.....	75
4. SONUÇLAR.....	77
4.1. AVP-NP11 Genini Taşıyan İfade Vektörü İzolasyonu	77
4.2. Bölgeye Yönelik Mutagenез Yöntemi Kullanılarak Oluşturulan Mutant AVP-NP11 Gen Dizilerini İçeren Uygun İfade Vektörlerinin Hazırlanmasına İlişkin Sonuçlar	78
4.3. Yabancı Tip ve Mutant AVP-NP11 Gen Dizilerini İçeren Vektörlerin Neuro2A Hücrelerine Transfeksiyon Sonuçları	81
4.4. Hücre Kültürü Süpernatantlarında AVP Düzeylerinin RIA ve ELISA Yöntemleri ile Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	82
4.4.1. Örneklerin BCA Protein Assay Kit ile Belirlenmiş Total Protein Konsantrasyonları	82
4.4.2. AVP Miktarlarının Radioimmunoassay (RIA) Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	82
4.4.3. AVP Miktarlarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	83
4.5. Neuro2A Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar	84
4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları	89

4.6.1.	RIA Yöntemine Ait Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi....	89
4.6.2.	ELISA Yöntemine Ait Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi	90
4.6.3.	RIA ve ELISA Yöntemleri Arasındaki Uyumun Bland-Altman İstatistiksel Yöntemi ile Değerlendirilmesi	91
5.	TARTIŞMA.....	92
5.1.	G45C Mutasyonuna İlişkin Fonksiyonel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	92
5.2.	207-209delGGC Mutasyonuna İlişkin Fonksiyonel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	94
5.3.	G88V Mutasyonuna İlişkin Fonksiyonel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	96
6.	KAYNAKLAR	106
EKLER	129
	EK 1 - Proje bilgileri.....	129
	EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	130
ÖZGEÇMİŞ	131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	Heterotrimerik G proteini döngüsü.....	4
Şekil 2. 2.	Böbrek toplama kanalı hücrelerinde AVP aracılı suyun geri emilim mekanizması.	5
Şekil 2. 3.	Dört farklı DI tipi ve patofizyolojisi.....	6
Şekil 2. 4.	X'e bağlı NDI'ye neden olan <i>AVPR2</i> gen mutasyonlarının <i>AVPR2</i> proteini üzerindeki yerleşiminin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2. 5.	NDI'ye neden olan 5 farklı <i>AVPR2</i> mutasyon sınıfı ve sonuçta oluşan mutant proteinlerin böbrek toplama kanalı hücresi içerisindeki lokalizasyonları.....	10
Şekil 2. 6.	<i>AQP2</i> monomerinin yapısı ve plazma membranı üzerindeki yerleşimin şematik gösterimi.	13
Şekil 2. 7.	NDI'nin otozomal baskın ve çekinik formuna neden olan <i>AQP2</i> gen mutasyonlarının <i>AQP2</i> proteini üzerindeki yerleşiminin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2. 8.	Vazopressin (<i>AVP-NP11</i>) geninin yapısal organizasyonu ve gene ait protein ürünlerinin şematik gösterimi. Sayılar amino asitleri göstermektedir.....	17
Şekil 2. 9.	Hipotalamusun paraventriküler ve supraoptik çekirdekleri ile AVP'nin sentezlendiği magnoselüler nöron hücreleri.	19
Şekil 2. 10.	Pre-pro-AVP-NP11'nin sentezi, işlenmesi ve taşınması.....	20
Şekil 2. 11.	Konjenital CDI (ailesel nörohipofizyal diabetes insipidus) ile ilişkili en sık görülen mutasyon tiplerinin ve mutasyonların AVP proteini üzerindeki yerleşimlerinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 3. 1.	G45C mutasyonu ($GGC \rightarrow TGC$) için hastanın DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü..	42
Şekil 3. 2.	207_209delGGC mutasyonu için hastanın DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü..	43
Şekil 3. 3.	G88V mutasyonu ($GGC \rightarrow GTC$) için hastanın DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü..	43

Şekil 3. 4.	Her üç mutasyon için tasarlanan primerlerin <i>AVP-NP11</i> gen dizisi üzerindeki yerleşimleri.....	47
Şekil 3. 5.	<i>hAVP-pL</i> haritası ve tasarlanan primerlerin harita üzerinde gösterimi... ..	48
Şekil 3. 6.	Protein izolasyonu yöntemine ilişkin görüntüler.....	63
Şekil 3. 7.	Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi yöntemine ilişkin görüntüler.	65
Şekil 3. 8.	RIA yönteminin uygulanmasına ilişkin görüntüler.....	69
Şekil 3. 9.	ELISA yöntemi prensip şeması.	70
Şekil 3. 10.	ELISA yöntemi için standart tüplerinin hazırlanma protokolü.	71
Şekil 3. 11.	ELISA yöntemi uygulanması sırasında kitin prosedüründe de belirtilen mavi ve yeşil renklerin oluşumu.....	73
Şekil 4. 1.	<i>hAVP-pL</i> plazmidinin transformasyon sonrası plak görüntüsü.	77
Şekil 4. 2.	<i>hAVP-pL</i> vektörünün % 1'lik agaroz jel görüntüsü.....	77
Şekil 4. 3.	<i>AVP-NP11</i> geni G45C, 207_209delGGC ve G88V mutantlarına ilişkin kısa PZR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüleri.....	78
Şekil 4. 4.	<i>AVP-NP11</i> geni G45C, 207_209delGGC ve G88V mutantlarına ilişkin uzun PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	79
Şekil 4. 5.	<i>hAVP_ pL</i> vektörü ve G45C, 207_209delGGC ve G88V uzun PZR ürünlerinin <i>XhoI</i> ve <i>SpeI</i> ile kesimleri sonucu agaroz jel görüntüsü... ..	79
Şekil 4. 6.	G45C mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	80
Şekil 4. 7.	207_209delGGC mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.. ..	80
Şekil 4. 8.	G88V mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	81
Şekil 4. 9.	pEGFP ile transfekte edilen Neuro2A hücrelerinin 48 saat sonraki görüntüsü.. ..	81
Şekil 4. 10.	Örneklerin total protein konsantrasyonu (mg/ml) ortalamalarına ait grafik	82
Şekil 4. 11.	Transfekte Neuro2A hücrelerinin hücre kültürü ortamına salgılamış oldukları AVP'nin RIA analizi ile ölçüm sonuçlarının sütun grafiği ile gösterimi.....	83
Şekil 4. 12.	Transfekte Neuro2A hücrelerinin hücre kültürü ortamına salgılamış oldukları AVP'nin ELISA analizi ile ölçüm sonuçlarının sütun grafiği ile gösterimi.....	84

Şekil 4. 13. Yabanıl tip AVP ifade eden Neuro2A hücresi.....	85
Şekil 4. 14. G45C mutant AVP ifade eden Neuro2A hücresi.....	86
Şekil 4. 15. 207-209delGGC mutant AVP ifade eden Neuro2A hücresi.....	87
Şekil 4. 16. G88V mutant AVP ifade eden Neuro2A hücresi.....	88
Şekil 4. 17. RIA yöntemi içerisindeki gruplara ait AVP miktarı ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesi.....	89
Şekil 4. 18. ELISA yöntemi içerisindeki gruplara ait AVP miktarı ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesi.....	90
Şekil 4. 19. Bland-Altman saçılım grafiği.....	91
Şekil 5. 1. 207-209delGGC mutantına ait <i>AVP-NPII</i> DNA ve amino asit dizilerinin gösterimi ve yabanıl tipe ait diziler ile karşılaştırılması.....	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1.	Fonksiyonel analizi gerçekleştirilecek olan mutasyonlar.	41
Çizelge 3. 2.	Hastaların klinik özellikleri	42
Çizelge 3. 3.	Mutant <i>AVP-NP11</i> dizilerinin oluşturulması sırasında kullanılan primer dizileri	46
Çizelge 3. 4.	<i>AVP-NP11</i> geni için bölgeye yönelik mutagenез işlemleri sonucunda elde edilen bant büyüklükleri	49
Çizelge 3. 5.	Bölgeye yönelik mutagenез işlemleri için gerçekleştirilen PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	49
Çizelge 3. 6.	<i>AVP-NP11</i> geninde bölgeye yönelik mutagenез işlemleri için gerçekleştirilen PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	50
Çizelge 3. 7.	PZR ürününün temizlenme basamağını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları	53
Çizelge 3. 8.	Temizlenmiş PZR ürünlerinin DNA dizileme reaksiyonunda kullanılan bileşenlerin miktarları	54
Çizelge 3. 9.	DNA/Besiyeri ve Lipofectamin 2000/Besiyeri Karışımlarının İçerikleri.....	58
Çizelge 3. 10.	BSA Standart Solüsyon Dilüsyonlarının Hazırlanması için Kullanılan Miktarlar ve Tüplerde Oluşan Son Konsantrasyonlar.	64
Çizelge 3. 11.	ELISA yöntemi için hazırlanan standart tüplerde AVP'nin son konsantrasyonu.....	72
Çizelge 4. 1.	Bland-Altman Yöntemine İlişkin İstatistiksel Değerler.	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

<	Küçük
>	Büyük
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
°C	Santigrat derece
Cu	Bakır
μ	Mikro
\pm	Artı eksi
\bar{d}	Fark ortalaması
s	Standart sapma
^{125}I	İyot-125

Kısaltmalar

ADH	Antidiüretik hormon
Asn	Asparajin
AQP2	Akuaporin 2
ATP	Adenozin trifosfat
AVP	Arjinin vazopressin
AVPR2	Arjinin vazopressin reseptör 2
BCA	Bikinkoninik asit yöntemi (Bicinchoninic acid assay)
bç	Baz çifti
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CDI	Santral diabetes insipidus
CLS	Cell Lines Service
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit

CP	Copeptin
CPM	Dakikadaki sayım (count per minute)
DDAVP	Desmopresin
del	Delesyon
DI	Diabetes insipidus
DIDMOAD	Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optik Atrofi ve Deafness
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim-bağlı immunosorbent analiz (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Endoplazmik retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum
g	g Kuvveti
G protein	Guanin nükleotidi bağlayıcı protein
GAP	GTPaz aktive eden protein
GDP	Guanozin difosfat
GFP	Yeşil floresan proteini (Green Fluorescent Protein)
G _s α	G protein alfa alt birimi
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
GP	Glikoprotein
GPRC	G protein bağlayıcı reseptör
HRP	Horseradish peroksidaz
HGMD	The Human Genome Mutation Database
kb	Kilobaz
kg	Kilogram
LB agar	Luria-Bertani agar
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre

mM	Milimolar
mOsm	Miliosmol
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
NaCl	Sodyum klorür
NDI	Nefrojenik diabetes insipidus
NEAA	Esansiyel olmayan amino asit
ng	Nanogram
NPA motifi	Asn-Pro-Ala motifi
NPII	Nörofizin II
nm	Nanometre
NSB	Spesifik olmayan bağlanma (Non-specific binding)
OD	Optik dansite
OXT	Oksitosin
P-AQP2	Fosforillenmiş akuaporin 2
P _i	İnorganik fosfat
pEGFP	GFP içeren plazmid
pg	Pikogram
pmol	Pikomol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PKA	Protein kinaz A
RIA	Radyoimmün analiz (radioimmunoassay)
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolution per minute)
SDM1	Site-Directed (Bölgeye Yönelik) Mutagenез 1
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOC	Super optimal broth
SP	Sinyal peptid
TMB	3,3',5,5' tetramethylbenzidine
U	Ünite
WFS1	Wolfram Sendromu 1
WT	Yabanıl tip
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram

1. GİRİŞ

Sağlıklı bireylerde kan ozmolalitesi, bir dizi karmaşık mekanizma ile belli sınırlar içerisinde tutulmaktadır. Vücut su dengesindeki ayarlamalar, bu ozmolitenin seviyesini (sabitliğini, stabilitesini) belirlemektedir. Bu ayarlamalar, susuzluk (susama) mekanizmasındaki hassas değişiklikler ile arjinin vasopressin (AVP) hormonunun plazma konsantrasyonundaki küçük değişikliklere cevap olarak idrar akış hızını ve ozmolalitesini değiştirme kapasitesine sahiptir. Böylece sağlıklı insanlar, iklim şartlarındaki aşırı değişimlere veya bir dereceye kadar yetersiz su alımlarına rağmen, ozmotik iç ortamlarını koruyabilmektedirler [1-2].

Vücuttaki su dengesi, su alımı ile kaybının dengede olması ile sağlanmaktadır. Bu denge, susuzluk ile uyarılan sıvı alımına karşılık, böbrekler aracılığıyla idrarın ve deri aracılığıyla terin vücuttan atılımı ile kontrol edilmektedir [3-4]. Plazma ozmolalitesindeki artış veya kan hacmindeki azalma ile vücutta daha fazla suya ihtiyaç duyulmakta ve böbreklere suyu koruması için sinyal gönderilerek susuzluk uyarılmaktadır. Uyarılma sonucu arka hipofiz bezinden antidiüretik hormon (ADH) olarak da adlandırılan AVP hormonu salgılanmaktadır [5-6]. Bu hormon, böbrek toplama kanalı hücrelerinin bazolateral membranında bulunan arjinin vazopressin reseptör 2 (AVPR2)'yi aktive ederek, böbrek toplama kanallarındaki su geçirgenliği artırmaktadır. Sonuçta suyun geri emilimi ile vücuttaki su dengesi tekrar kurulmaktadır [7-9].

Vücutta su dengesinin düzenlenmesi sırasında AVP hormonunun önemi büyüktür. Eğer AVP hormonu yeterli miktarda sentezlenmez veya salgılanmazsa, Diabetes insipidus (DI) hastalığının tiplerinden biri olan Nörohipofizyal (Santral) Diabetes insipidus hastalığı meydana gelmektedir. Bu hastalığın en önemli belirtilerinden biri, suyun böbreklerden geri emilememesi sonucu, anormal derecede fazla hacimde ve oldukça seyreltik idrar oluşumudur [10-11]. AVP hormonunun sentez ve salgılanmasındaki eksikliğin temelinde ise iki neden yatabilmektedir. Bunlardan ilki, beyin tümörü, metastatik karsinom, kafa travması, enfeksiyon ya da cerrahi uygulamaların arka hipofiz üzerindeki etkileri sonucu oluşan sonradan edinilen

durumdur. İkincisi ise, *arjinin vazopressin-nörofizin II (AVP-NP11)* genindeki mutasyonlar nedeniyle gözlenen kalıtsal durumdur [12].

AVP-NP11 geninde yer alan mutasyonların, öncül hormonun düzgün bir şekilde katlanması ve işlenmesi sırasında hatalara neden olabileceği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu hataların sonucunda, mutant proteinin endoplazmik retikulum (ER) içerisinde birikerek protein agregasyonları oluşturduğu ve burada diğer esansiyel proteinlerin düzenli işlenmesini engelleyerek, AVP hormonunun sentezlendiği hücreler olan magnoselüler sinir hücrelerinin ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir [13-15].

Tez çalışması kapsamında, DI tanılı hastaların *AVP-NP11* geninde tanımlanmış üç farklı mutasyonun (G45C, 207_209delGGC ve G88V) fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, mutasyonların ilgili proteinin fonksiyonunu ne şekilde etkilediğinin ve hastalığın seyrinde nasıl bir etki yarattığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Neuro2A hücre hattı kullanılarak, yabanıl tip ve mutant proteinlerin hücre içindeki yerleşimi ve miktarı incelenmiştir. Böylece mutasyonların proteinlerin hücresel tutulumu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olup olmadığı karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

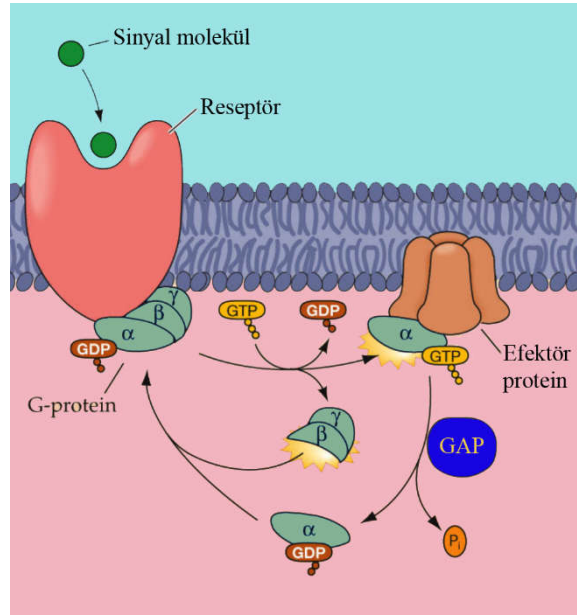
2.1. Diabetes İnsipidus

DI, poliüri olarak bilinen oldukça seyreltik (<300 mOsm/kg) idrarın çok fazla hacimde (>50 ml/kg/gün) atılımı ve polidipsi olarak tanımlanan aşırı susama hissi sonucu sıvı alımındaki artış ile karakterize bir hastalıktır [10, 16-17]. Hastalığın görülme sıklığı 25.000 bireyde 1 olduğundan dolayı nadir hastalık olarak tanımlanmaktadır [18].

Poliüri, düşük yoğunluklu idrar ve polidipsiye ek olarak hipernatremi ve dehidratasyon da DI'nin en yaygın belirtilerindedir. DI'li hastaların vücutlarında su miktarı düzenlenemediğinden vücuttaki su dengesi bozulmuştur [12]. Sağlıklı bireylerde vücuttaki su miktarının düzenlenmesi, suyun uzaklaştırılması ya da geri emilimi aracılığıyla böbrekler tarafından gerçekleştirilmektedir. Böbrekler tarafından bu ayarlamaların yapılması ise kan içeriğinde meydana gelen değişiklikler aracılığıyla olmaktadır. Kan hacmindeki azalma veya plazma ozmolalitesindeki artış, vücuttaki suyun korunması gerektiğini ve vücudun daha fazla suya ihtiyaç duyduğunu belirtmektedir. Plazma ozmolalitesindeki %1'den az olan çok küçük değişiklikler bile hipotalamustaki ozmoreseptörleri uyarırken, kan hacmindeki %5-10'a ulaşan değişiklikler kan damarlarındaki baroreseptörleri uyarmaktadır. Bunun üzerine her iki durumda da, AVP hormonunun hipotalamusta sentezlendikten sonra giderek depolandığı yer olan arka hipofiz bezinden salınması tetiklenmektedir. AVP hormonu salındıktan sonra kan dolaşımı yoluyla böbreklere gelmektedir. Bu hormon, böbrek toplama kanalı hücrelerinin bazolateral membranında yer alan ve transmembran bir protein olan AVPR2'ye bağlanmaktadır [5-6, 19].

AVPR2, guanin nükleotit (G) protein-bağlı reseptör (GPCR) ailesinin bir üyesidir. Bu ailedeki reseptörlerin ilişkili olduğu G proteinleri, 3 adet alt birimden (α , β ve γ) oluşan heterotrimerik bir yapıya sahiptir ve hücre dışından gelen birçok sinyalin hücre içerisine iletilmesinde görev almaktadır. G proteinin α alt birimi, guanozin trifosfat (GTP) veya guanozin difosfat (GDP) olarak guanin nükleotitlerine bağlanabilmektedir. α alt birimine GDP'nin bağlanması, bu alt biriminin diğer alt birimlerine (β ve γ) bağlanmasına izin vererek aktif olmayan bir heterotrimer yapının oluşmasına yol açmaktadır. Hücre dışı bir sinyalin membrandaki reseptöre

bağlanması, G proteinin reseptöre bağlanmasına, α alt birimine bağlı GDP'nin GTP ile yer değiştirmesine, $\beta\gamma$ alt birimlerinin α alt biriminden ayrılarak G proteinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.1). Aktivasyonun ardından, GTP'ye bağlı α alt birimi ($G_{s\alpha}$) ve serbest $\beta\gamma$ kompleksi farklı efektör moleküllere bağlanarak onların aktivitelerini düzenlemekte ve hedef hücreye gelen sinyale karşılık hücrel yanıtın oluşuma aracılık etmektedir. G proteinin α alt birimi GTPaz aktivitesine sahiptir ve böylece α alt birimine bağlı GTP'nin, GDP ve inorganik fosfata (P_i) hidrolizini gerçekleştirmektedir. GTPaz aktive eden proteinler (GAP) bu tepkimeyi hızlandırmaktadır. GTP'nin hidrolizi, efektör molekül- α alt birim kompleksinin ayrılmasına neden olmaktadır. GDP-bağlı α alt birimi ile $\beta\gamma$ alt birimleri tekrar bir araya gelerek inaktif G proteinini oluşturmaktadır ve bu protein farklı bir uyarılmış reseptör varlığında yeni bir döngüye girebilmektedir [20-22].

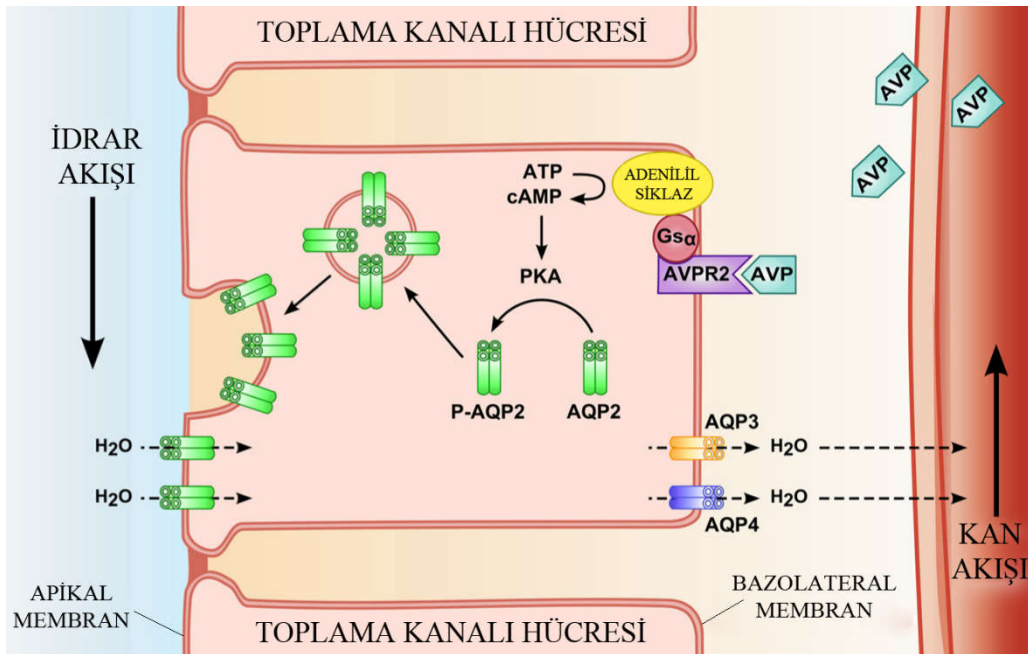


Şekil 2. 1. Heterotrimerik G proteini döngüsü. [22] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

AVP hormonunun AVPR2'ye bağlanması ile reseptörün G proteinine bağlanabilen aktif formunun stabilizasyonu gerçekleşmekte ve sonuçta sitozolik G proteinin aktivasyonu sağlanmaktadır (Şekil 2.2). $G_{s\alpha}$, membranla ilişkili bir enzim olan adenilil siklaza bağlanarak onu aktifleştirmektedir. Aktive olan adenilil siklaz ise,

adenozin trifosfatın (ATP) siklik adenozin monofosfata (cAMP) dönüşümünü arttırmaktadır. Hücre içerisinde konsantrasyonu artan cAMP, protein kinaz A (PKA)'nın düzenleyici alt birimine bağlanarak katalitik birimini aktive etmektedir. Aktif hale gelen PKA, hücre içerisinde bulunan akuaporin 2 su kanal proteinlerinin (AQP2) fosforillenmesini sağlamaktadır. Fosforillenen AQP2 (P-AQP2)'ler, hücre içi vezikülleri aracılığıyla tetramerler halinde böbrek toplama kanal hücrelerinin apikal membranına gelerek buraya yerleşmektedir. Membrana yerleşen AQP2 su kanalı aracılığıyla ihtiyaç duyulan suyun geri emilimi gerçekleşmektedir. Apikal membrandan hücreye AQP2 aracılığıyla giren su, bazolateral plazma membranında bulunan diğer su kanal proteinleri olan AQP3 ve AQP4 aracılığıyla çıkarak kan dolaşımına verilmektedir [9, 19].

Su dengesi kurulduğunda uyarının ortadan kalkması ile AVP seviyesi düşmekte ve apikal membranda bulunan AQP2 endositoz ile membrandan uzaklaşarak hücre içine geri dönmektedir. Böylece ihtiyaç duyulan suyun geri emilimi ile vücutta su dengesi tekrar kurulmuş olmaktadır. Bu mekanizmada yer alan *AVP-NPII*, *AVPR2* ve *AQP2* genlerinin herhangi birinde oluşabilecek bir mutasyon ve dolayısıyla bu bileşenlerden birinin düzgün çalışmaması halinde vücudun su dengesi bozulmakta ve DI hastalığının gelişimine neden olabilmektedir [9, 19, 23].



Şekil 2. 2. Böbrek toplama kanalı hücrelerinde AVP aracılı suyun geri emilim mekanizması. [24] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

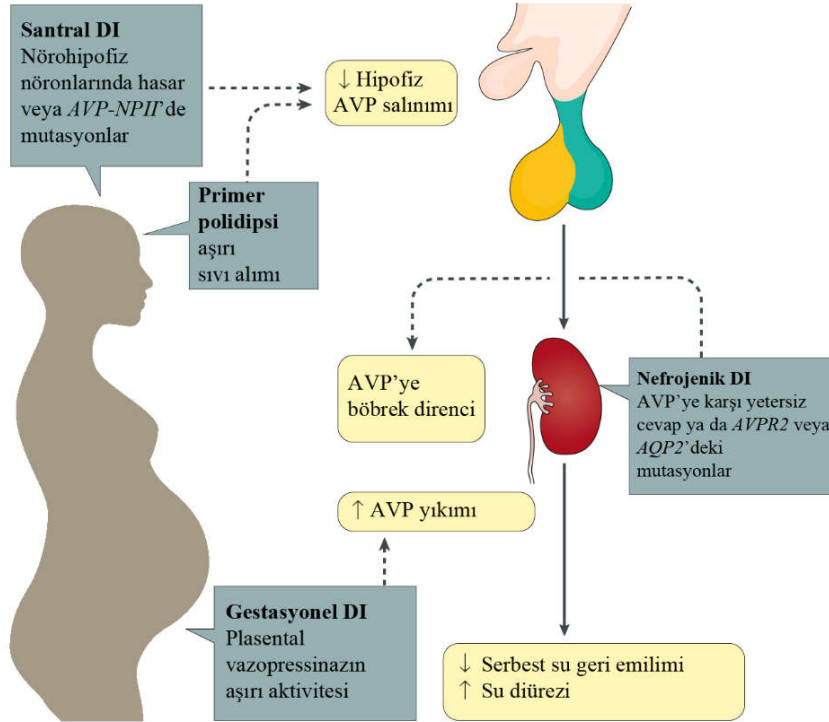
2.1.1. Diabetes İnsipidus Tipleri

Temelde 4 farklı tipte diabetes insipidus bulunmaktadır [16]: (Şekil 2.3).

1. Gestasyonel diabetes insipidus
2. Primer polidipsi
3. Nefrojenik diabetes insipidus
4. Santral diabetes insipidus

2.1.1.1. Gestasyonel Diabetes İnsipidus

DI'nin bu tipi, hamilelik süresince AVP metabolizmasında görülen artış sebebiyle ortaya çıkmaktadır ve bu nedenle gebelik DI'si olarak adlandırılmaktadır [25]. Genellikle gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde meydana gelmekte ve doğumdan 4-6 hafta sonra kendiliğinden geçmektedir. Plasenta tarafından üretilen bir enzim olan ve vazopressinaz olarak da adlandırılan plasental sistin aminopeptidazın yükselmiş seviyesi veya aktivitesinden dolayı AVP'nin daha hızlı yıkılması ile karakterize bir hastalıktır. AVP'nin hızlı yıkılması sonucu meydana gelen polidipsi, poliüri ve şiddetli susuzluk, gestasyonel diabetes insipidusun yaygın belirtilerindendir [26-28].



Şekil 2. 3. Dört farklı DI tipi ve patofizyolojisi. [29] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

2.1.1.2. Primer polidipsi

Primer polidipsi, aşırı sıvı alımı nedeniyle AVP salınımının baskılanmasından kaynaklanan bir DI tipidir [16]. Aşırı sıvı alımı, düşük plazma ozmolalitesine yol açmakta ve buna cevap olarak da AVP salınımı durmaktadır. Sonuçta, düşük ozmolaliteye sahip fazla miktarda seyreltik idrar oluşumu görülmektedir [30-31].

Primer polidipsinin nedenine bağlı olarak, iki alt çeşidi bulunmaktadır:

- a) Dipsojenik DI: Hipotalamusta yer alan susuzluk merkezindeki kusurdan kaynaklanan bir primer polidipsi çeşididir. Bu kusurun sonucu olarak, susuzluk mekanizması aşırı aktif hale gelmekte ve buna bağlı olarak da çok miktarda sıvı alımı ile hipotonik idrar atılımı görülmektedir [32].
- b) Psikojenik DI: Primer polidipsinin bu tipi, temel olarak şizofreni gibi psikiyatrik bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Bu tür psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılan psikiyatrik ilaçlar ağız kuruluğuna neden olmaktadır. Sonuçta kişinin sıvı alımını arttırmasına ve bu sıvının fazla miktarda seyreltik idrar halinde atılımına neden olmaktadır [32].

2.1.1.3. Nefrojenik Diabetes İnsipidus

Nefrojenik Diabetes İnsipidus (NDI), böbreklerde AVP'ye karşı yetersiz cevap oluşmasından kaynaklanan bir DI tipidir. NDI'de, hipotalamik fonksiyon ve AVP salınımı normal olmasına rağmen, AVP'ye karşı böbrek yanıtının olmadığı veya az olduğu görülmekte, buna bağlı olarak idrar yeterince konsantre edilememektedir. Bunun sonucunda ise, klinik olarak poliüri ve dehidratasyon gibi belirtiler görülmektedir. Polidipsi, hipernatremi, ateş ve kabızlık ise, NDI olgularında görülen diğer belirtilerdir [33-35].

NDI'nin ortaya çıkış nedenine bağlı olarak, edinilmiş NDI ve konjenital NDI olmak üzere iki tipi bulunmaktadır [34].

2.1.1.3.1. Edinilmiş NDI

Edinilmiş NDI, yetişkin bireylerde konjenital NDI tipinden daha yaygın görülmektedir ve nadiren şiddetlidir [29]. Genel olarak, elektrolit anormallikleri (örneğin, hipokalemi ve hiperkalsemi) veya tıbbi tedavi (örneğin, lityum ve sisplatin tedavisi) gibi çok sayıda

yaygın klinik duruma komplikasyon olarak ortaya çıkmaktadır. Edinilmiş NDI'ye neden olan etmenler, ya AVPR2'nin başlatmış olduğu hücre içi sinyal trafiğini etkilemektedir veya AQP2'nin ekspresyonunu azaltmaktadır [19, 35].

Edinilmiş NDI'nin en yaygın nedeni, bipolar hastalıklar, depresyon ve alkolizm tedavisinde kullanılan lityum uygulamasıdır [36]. Lityum, cAMP sistemine müdahale ederek renal AQP2 ekspresyonunun azalmasına ve sonuçta poliüriye neden olabilmektedir [37-39]. Bunun dışında, hipokalemi ve hiperkalsemi gibi çeşitli elektrolit bozuklukları da AQP2 ekspresyonunun azalmasına yol açmaktadır. Elektrolit dengesi tekrar sağlandığında durum tersine dönebildiğinden süreç geçici olabilmektedir [40]. Kronik böbrek yetmezliği, polikistik böbrek hastalığı gibi çeşitli böbrek hastalıkları ile renal transplantasyon gibi böbreklerin fonksiyonunu etkileyecek herhangi bir durum da edinilmiş NDI'nin nedenleri arasında yer almaktadır [32].

2.1.1.3.2. Konjenital NDI

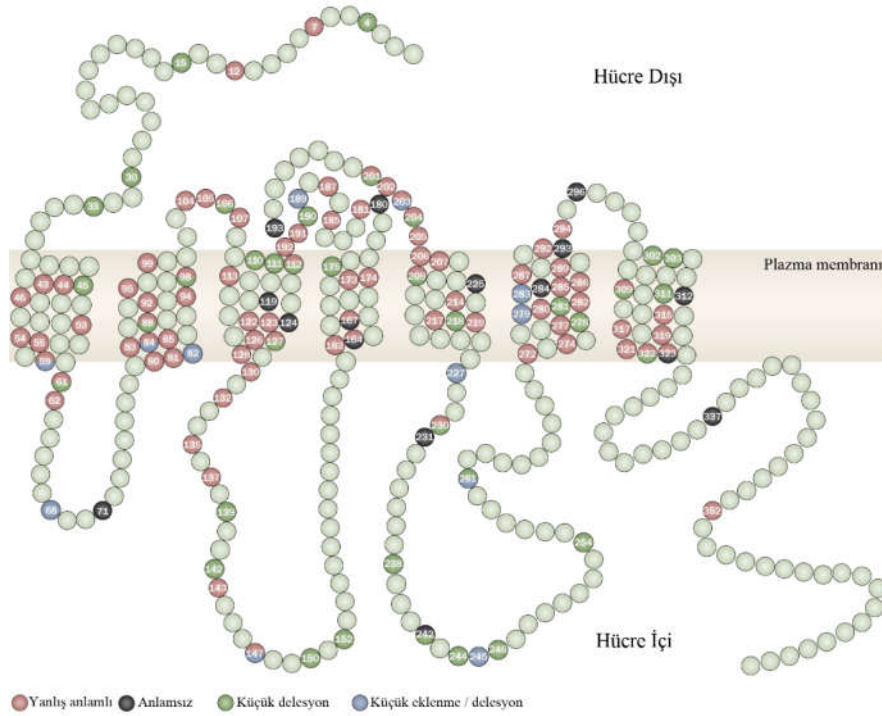
Konjenital NDI, NDI'nin kalıtsal formudur ve idrarı konsantre etmedeki bozukluk doğumdan itibaren başlamaktadır. Hastalığa ait belirtiler, dehidratasyon ataklarına bağlı tekrarlayan ateş, nöbetler, beslenme azlığı, beslenmeden kısa bir süre sonra olan kusma, kabızlık, yetersiz kilo alımıdır ve yenidoğanlarda ilk haftadan itibaren gözlenmektedir [9, 35, 41].

Konjenital NDI, AVPR2 ile AQP2 genlerinde bulunan mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir [19, 42]. Konjenital NDI olgularının yaklaşık olarak %90'ı AVPR2 geninde bulunan mutasyonlardan kaynaklanmakta ve X'e bağlı NDI'ye neden olmaktadır. Geriye kalan %10'luk kısım ise, AQP2 geninde yer alan mutasyonlar sonucu meydana gelmekte ve otozomal çekinik veya baskın NDI'ye yol açmaktadır [25, 43].

2.1.1.3.2.1. AVPR2 Geni ve X'e Bağlı NDI

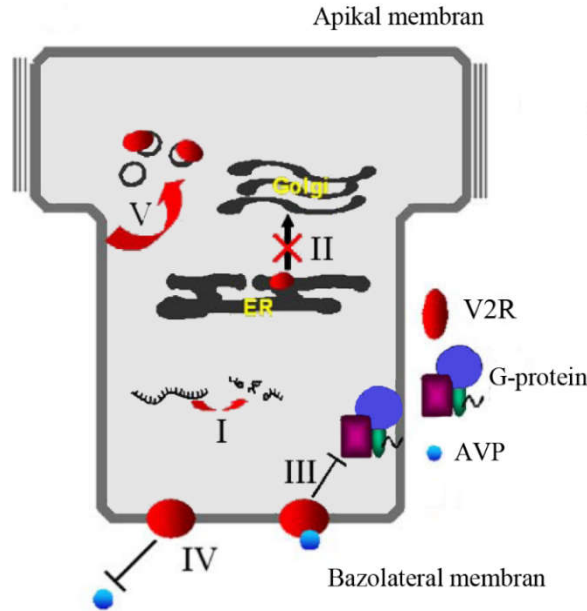
İnsanda bulunan AVPR2 geni 2.27 kb boyutunda olup, X kromozomu üzerinde (Xq28) yer almaktadır. Bu gen, 3 ekzon ve 2 intron bölgesinden oluşmakta ve G protein-bağlı reseptör ailesine ait olup, 371 amino asitten oluşan bir reseptörü kodlamaktadır. Reseptör, 7 adet transmembran domain, 4 adet hücre dışı ve 4 adet de hücre içi (sitoplazmik) domain içermektedir [44-47].

Bugüne kadar *AVPR2* geninde, yanlış anlamlı mutasyon, anlamsız mutasyon, delesyon ve insersiyonları içeren 250'den fazla mutasyon tanımlanmıştır [29, 48]. Bu mutasyonların yaklaşık olarak yarısı, yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. Yanlış anlamlı mutasyonlardan sonra, en fazla oranda (%25) çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları görülmektedir. Çerçeve kayması mutasyonları, nükleotit delesyonu (silinmesi) veya insersiyonu (eklenmesi) sonucu oluşmaktadır. Mutasyonların kalan kısmını, büyük delesyonlar (%10), anlamsız (non-sense) mutasyonlar (%10), çerçeve kaymasına neden olmayan delesyon veya insersiyonlar (%4), splice-site mutasyonları ve kompleks mutasyonlar oluşturmaktadır. Mutasyonların genel olarak reseptör proteininin transmembran, hücre dışı ve hücre içi alanları olmak üzere her bölgesinde saptandığı, fakat hücre dışı ve hücre içi alanlarla karşılaştırıldığında transmembran bölgesinde iki kat daha fazla mutasyon meydana geldiği belirtilmiştir [49] (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. X'e bağlı NDI'ye neden olan *AVPR2* gen mutasyonlarının *AVPR2* proteinini üzerindeki yerleşiminin şematik gösterimi. Kırmızı daire sembolleri, yanlış anlamlı mutasyonları; siyah renkteki daireler, anlamsız mutasyonları; yeşil renkteki daireler, küçük delesyonları ve mavi renkteki daireler ise küçük insersiyon/delesyonların buldukları kodonları belirtmektedir. Şekilde X'e bağlı NDI'ye neden olan mutasyonların sadece bir kısmı gösterilmiştir. [16] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

AVPR2 mutasyonları, reseptörlerin hücredeki işlevselliği ve hücre içi lokalizasyonuna göre 5 sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.5). Sınıf I mutasyonları, çerçeve kayması, promotor değişiklikleri veya reseptör sentezinin erken sonlanmasına neden olan anlamsız mutasyonlar sonucu yanlış işlenmiş veya kararsız mRNA oluşumuna yol açan tüm mutasyonlardır. Sınıf II mutasyonları, en yaygın mutasyon tipidir ve reseptörün yanlış katlanarak ER'de tutulmasına neden olan mutasyonlardır. Sınıf III mutasyonları da *AVPR2*'nin yanlış katlanmasına neden olmaktadır, fakat bu mutant reseptörler ER'de tutulmayıp hücre membranına (bazolateral membrana) ulaşmaktadır. Membrana ulaşan mutant reseptörler, AVP ile etkileşime girmektedir ancak G proteinleri ile yeterli düzeyde etkileşime giremedikleri için adenilil siklazın aktivasyonu azalmakta ve böylece yetersiz cAMP oluşumu meydana gelmektedir. Sınıf IV mutasyonları da *AVPR2*'nin yanlış katlanması ve hatta hücre membranına ulaşması ile sonuçlanmakta, ancak bu mutant reseptörlerin AVP ile etkileşime girmesi azalmakta veya hiç etkileşime girememektedir. Son olarak, sınıf V mutasyonlarını taşıyan reseptörlerde normal protein sentezi ve olgunlaşma süreci olmasına rağmen, bu mutant reseptörler hücre içinde farklı organellere dolayısıyla yanlış hücresel bölgelere yerleşmektedirler [9, 19, 50].



Şekil 2. 5. NDI'ye neden olan 5 farklı *AVPR2* mutasyon sınıfı ve sonuçta oluşan mutant proteinlerin böbrek toplama kanalı hücresi içerisindeki lokalizasyonları. [50] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

AVPR2 genindeki mutasyonlar, konjenital NDI'nin bir tipi olan X'e bağılı NDI'ye neden olmaktadır. X'e bağılı NDI, nadir kalıtsal bir hastalıktır ve X'e bağılı çekinik kalıtım özelliğinden dolayı hastaların çoğunluğu erkektir [36, 51]. Erkek hastalar dışarıdan AVP uygulamasına rağmen idrarı konsantre edemediklerinden, bu bireylerde genellikle poliüri ve polidipsi gibi belirtiler görülmektedir. X'e bağılı çekinik ve nadir bir hastalık olduğundan dişilerin hastalıktan etkilenme oranı daha az olmaktadır. Buna ek olarak, X kromozomu inaktivasyonu nedeniyle değışen derecelerde poliüri ve polidipsi heterozigot diş bireylerde de görülebilmektedir [49, 52].

X'e bağılı NDI'nin genel popülasyonda görülme sıklığı çok nadir olmakla birlikte, her 1.000.000 canlı erkek doğumda 4 olarak tahmin edilmektedir [12, 53]. Bu hastalığa sahip bireylerde doğumdan itibaren belirgin bir poliüri, aşırı susama hissi ve buna bağılı olarak polidipsi görülmektedir. Tedavi edilmemiş X'e bağılı NDI olguları ise, erken bebeklik döneminde hipernatremi, hipertermi ve tekrarlanan dehidratasyon dönemlerini de içermektedir. Tekrarlanan dehidratasyon olaylarının sonucunda ise mental retardasyon (zihinsel gerilik) görülmektedir. X'e bağılı NDI'nin erken tanı ve tedavisi, normal fiziksel ve zihinsel gelişim ile birlikte bireylerin sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için önemlidir [49, 53].

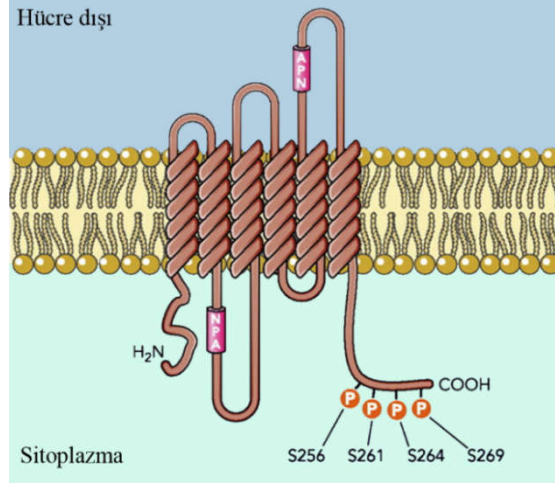
2.1.1.3.2.2. AQP2 Geni ve Otozomal Çekinik/Baskın NDI

İnsanda bulunan *AQP2* geni, 5.1 kb boyutunda olup, 12q13 kromozom bölgesinde yer almaktadır. Bu gen, 4 ekzon ile 3 intron bölgesinden oluşmakta ve 271 amino asitten oluşan *AQP2* proteinini kodlamaktadır [8, 19, 54-56]. *AQP2* proteini, transmembran kanal protein ailesinin bir üyesidir ve idrarın konsantre edilmesinde kilit rol oynayan bir su kanal proteindir. Bu protein, vücudun suya ihtiyaç duymadığı koşullarda böbrek toplama kanalı ana hücreleri içerisindeki veziküllerde depolanmaktadır. Vücudun suya ihtiyaç duyması üzerine, gelen uyarıya cevap olarak depolandığı veziküllerden bulunduğu hücrenin plazma membranına taşınmakta ve membran üzerine homotetramerler halinde yerleşmektedir [8, 57].

AQP2 su kanalı homotetramer yapısındadır; dört özdeş protein alt birimi plazma membranında su kanalını oluşturmak için bir araya gelmektedir [19]. Her bir

monomer ise, 6 adet transmembran domain, 3 adet hücre dışı ve 4 adet hücre içi (sitoplazmik) domaine sahiptir (Şekil 2.6). Proteinin amino ve karboksil uçlarının her ikisi de sitoplazmada yer almaktadır ve karboksil ucunda fosforilasyon için önemli serin reziduları (S256, S261, S264, S269) bulunmaktadır [8-9]. Diğer akuaporinlerin çoğuna benzer şekilde, iki adet yüksek oranda korunmuş NPA motifi (Asn-Pro-Ala motifi) içermektedir ve bu motifin proteinin membrana yerleşmesini sağladığı, üst üste çakışarak su geçişini sağlayan su kanalı porunu oluşturduğu düşünülmektedir [58].

AQP2 proteinin sentezinden itibaren hücre içi trafiği, post-translasyonel modifikasyonların da dahil olduğu çeşitli hücresel süreçler tarafından düzenlenmektedir [19, 58]. AQP2 proteini de diğer membran proteinleri gibi, ER'de sentezlenmekte ve burada katlanmaktadır. ER içerisinde bir veya iki monomerine yüksek mannozlu glikanlar asparajin 123 (Asn123) bölgesinden eklenmekte ve ER'den çıkış başlamaktadır. Golgi ağında olgunlaşma sırasında, yüksek mannozlu şeker gruplarının bir kısmı çıkarılmakta ve çoğu glikozillenmiş proteinin aksine, AQP2 tetramerinin sadece bir veya iki monomeri kompleks glikolizasyona uğramaktadır. Ardından, AQP2 proteinleri ihtiyaç halinde apikal membrana gitmek üzere hücre içi veziküllerde depolanmaktadır. Vücudun su ihtiyacı üzerine, AVP hormonunun reseptörüne bağlanması ile hücre içinde cAMP miktarı artmakta ve bunu takiben PKA aktifleşerek AQP2'nin sitoplazmik karboksil ucunda bulunan serin rezidularından (S256, S261, S264 ve S269) fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir (Şekil 2.6). Fosforilasyonu takiben AQP2 homotetramer yapısı oluşturmaktadır ve bu tetramer yapısının hücre içi veziküllerden apikal membrana taşınarak buraya yerleşmesi için, tetramerdeki dört monomerden en az üçünün fosforile edilmesi gerekmektedir. Membrana yerleşen AQP2 homotetramer yapısı, renal ana hücrelerin su geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır. Geçirgenlikteki artış, suyun tübül lümeninden hücreye geçişine izin vermektedir. Bu durum da daha konsantre idrar oluşumuna yol açmaktadır. Uyarının ortadan kalkması, AQP2'nin endositoz ile apikal membrandan hücre içine geri dönmesini tetiklemektedir. Bu süreçte AQP2, kltrin kaplı çukurlar içinde birikmekte ve kltrin-aracılı endositoz yoluyla hücre içerisine alınmaktadır [9, 59-60].

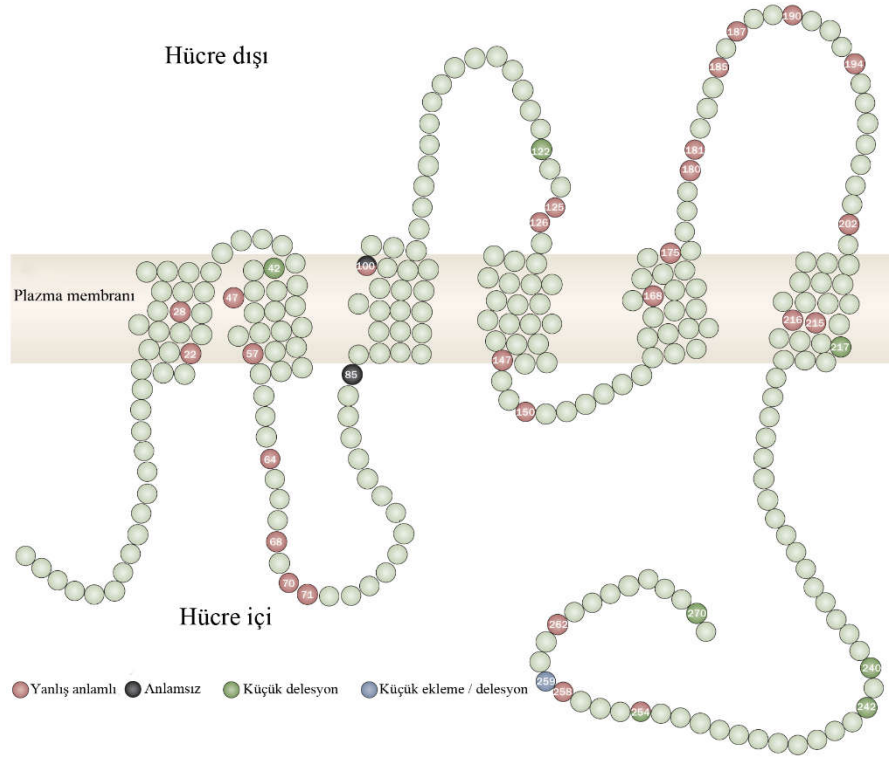


Şekil 2. 6. AQP2 monomerinin yapısı ve plazma membranı üzerindeki yerleşimin şematik gösterimi. [58] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

AQP2 genindeki mutasyonlar, konjenital NDI'nin bir diğer tipi olan otozomal NDI'ye neden olmaktadır. Bugüne kadar bu gende hastalığa neden olan yaklaşık 65 mutasyon saptanmıştır [29]. Bu mutasyonlar 2 farklı durumla sonuçlanmaktadır. İlk olarak, *AQP2*'deki bir mutasyon hedefleme sinyalini etkileyebilmekte ve böylece fonksiyonel olan *AQP2*'nin membrana yönlendirilmesi engellenebilmektedir. Diğer durumda ise, mutasyon, *AQP2*'nin por yapısını oluşturmasında bir hataya neden olarak işlevsiz bir su kanalı meydana gelmesine yol açabilmektedir. NDI ile sonuçlanan *AQP2* mutasyonlarının birçoğu incelenmiş ve çeşitli model sistemlerinde çalışılmıştır. Memeli hücre hatları ile yapılan çalışmalar, mutant *AQP2* proteinin hücre içi trafiği ve hedeflenmesi hakkında bilgi vermektedir. *Xenopus laevis* oosit sistemindeki *AQP2*'nin ifadesi ise, mutasyonların membrandaki *AQP2*-aracılı su akış hızını değiştirme yeteneği hakkında yani kısaca proteinin fonksiyonu hakkında bilgi vermektedir [19, 50].

AQP2 gen mutasyonlarının neden olduğu otozomal NDI, hem çekinik hem de baskın kalıtım özelliği göstermektedir. Otozomal NDI olguları incelendiğinde, bu olguların yaklaşık %90'ından fazlasının otozomal çekinik kalıtım gösterdiği bulunmuştur [50, 61-63]. Otozomal çekinik NDI'da, mutasyonlar çoğunlukla *AQP2*'nin por oluşturan kısmı olan transmembran domain ve bağlantı halkalarında bulunmaktadır (Şekil 2.7). Bu mutasyonlar, *AQP2*'nin yanlış katlanmasına ve buna bağlı olarak da ER'de tutuklanmasına ve proteazom tarafından hızlı parçalanması için hedeflenmesine yol açmaktadır [19, 63].

Otozomal NDI olgularının yaklaşık %10'u baskın kalıtım özelliği göstermektedir. NDI'nin bu tipine neden olan mutasyonların tamamı, proteinin sitozolik karboksil uç kısmında bulunmaktadır. Bu kısımdaki mutasyonlar proteinin katlanmasını etkilememektedir fakat bu bölge AQP2 trafiği için önemlidir; çünkü proteinin hücre içi taşınmasını düzenleyen önemli sinyaller içermektedir. Dolayısıyla bu bölgedeki mutasyonlar sonucu sentezlenen mutant AQP2 proteini fonksiyonel olmasına rağmen, protein apikal membrana doğru bir şekilde taşınmamaktadır. Bu durum da idrarı konsantre etme yeteneğinde bir hata ile sonuçlanmakta ve NDI gelişimi gözlenmektedir [9, 19, 63-64].



Şekil 2. 7. NDI'nin otozomal baskın ve çekinik formuna neden olan AQP2 gen mutasyonlarının AQP2 proteini üzerindeki yerleşiminin şematik gösterimi. Kırmızı daire sembolleri, yanlış anlamlı mutasyonları; siyah renkteki daireler, anlamsız mutasyonları; yeşil renkteki daireler, küçük delesyonları ve mavi renkteki daireler ise küçük insersiyon/delesyonların buldukları kodonları belirtmektedir. Şekilde otozomal baskın ve çekinik NDI'ye neden olan mutasyonların sadece bir kısmı gösterilmiştir. [16] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Otozomal baskın NDI ile ilişkili mutant AQP2 proteinleri, otozomal çekinik formdaki mutant proteinler gibi yanlış katlanma göstermedikleri için, yabancı tip AQP2 proteinleri ile heterotetramer yapısı oluşturabilmektedir. Mutant proteinlerdeki yanlış yönlendirme motifinin baskınlığından dolayı, mutant-yabancı tip heterotetrameri de hücre içinde yanlış yerlere yönlendirilmektedir. Bu durum, proteinin apikal membrana ulaşması yerine, Golgi aygıtında tutuklanmasına ya da lizozomlara, geç endozomlara veya bazolateral plazma membranına hedeflenmesine neden olmaktadır. Sonuçta, heterotetramer yapısında bulunan yabancı tip proteinlerin de apikal membrana ulaşması engellenmiş olmakta ve buna bağlı olarak apikal membran üzerinde AQP2 protein miktarında ciddi azalmalara yol açmaktadır [19, 63, 65-66]. Bununla birlikte, idrarı konsantre etme yeteneğinin bazen kısmen bozulmuş olabileceği, bu durumun da muhtemelen yabancı tip AQP2'lerin en azından bir kısmının homotetramer yapı oluşturmasından ve apikal membrana ulaşabilmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir [16].

2.1.1.4. Santral Diabetes İnsipidus

Santral Diabetes İnsipidus (Central Diabetes İnsipidus=CDI), AVP hormonunun yetersiz sentezi ve/veya salınımı ile karakterize bir DI tipidir. AVP hormonunun yetersiz salgılanması ise, nörohipofiz fonksiyonunu bozan çeşitli hastalıklar veya genetik mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. AVP hormonu eksikliği sonucu idrar yeterince konsantre edilemediğinden, hastalarda klinik olarak poliüri, aşırı susuzluk hissi, polidipsi, yüksek plazma ozmolalitesi, hipernatremi ve dehidratasyon gibi belirtiler görülmektedir [17, 24, 32, 40, 50].

CDI, tüm DI tipleri arasında en yaygın görülen tiptir ve nörohipofizyal, kraniyal, hipotalamik, nörojenik DI olmak üzere çeşitli şekillerde de adlandırılmaktadır [16, 24, 33]. NDI'da olduğu gibi, CDI'nin de ortaya çıkış nedenine bağlı olarak edinilmiş CDI ve konjenital CDI olmak üzere iki tipi bulunmaktadır [67-68]. Bunun dışında, tüm CDI olgularının yaklaşık 1/3'ünde hastalığın ortaya çıkmasına yol açan herhangi bir neden bulunamadığından, bu olgular idiyopatik olarak değerlendirilmektedir [69].

2.1.1.4.1. Edinilmiş CDI

Edinilmiş CDI, genellikle nörohipofiz bölgesinin hasarı sonucu (özellikle de AVP hormonunun sentezlendiği hücreler olan magnoselüler nöronlarda meydana gelen hasar sonucu) gelişen bir hastalıktır ve konjenital CDI tipine göre daha yaygın görülmektedir [29, 67].

Edinilmiş CDI'ye neden olan birçok faktör bulunmaktadır ve bunların başında kafa travmaları ile beyin tümörleri gelmektedir [29, 40]. AVP hormonunu sentezleyen magnoselüler nöronların aksonları yaklaşık 10 mm'lik bir mesafe boyunca arka hipofizde kesintisiz olarak uzanmaktadır. Beynin hipotalamus veya arka hipofiz kısmındaki bir travma, bu aksonların kopmasına veya etrafında şişlik oluşmasına bunun sonucunda da geçici veya kalıcı DI gelişmesine neden olabilmektedir [13, 70-71]. Beynin aynı bölgesindeki primer veya metastatik tümörler ile yine bu bölgede gerçekleştirilen cerrahi operasyonlar (özellikle hipotalamusun suprasellar bölgesinde) da AVP sentezleyen nöronlarda hasara neden olduğunda CDI'ya yol açabilmektedir. CDI belirtilerinin görülebilmesi için bu nöronların yaklaşık olarak %80-90'ının hasar görmesi gerekmektedir [40, 67, 72]. CDI'nin en şiddetli formlarından biri de, AVP hormonunun nörohipofizyal salgılanmasını uyaran ozmoreseptörlerin hasarından kaynaklanmaktadır. Ozmoreseptörler, susama olayını ve AVP hormonunun salgılanmasını kontrol etmektedir. Bu nedenle bu bölgedeki lezyonlar, susamanın ve ozmotik olarak uyarılan AVP salgılanmasının bozulması ile hiperozmolaliteye ve sonuçta CDI oluşumuna neden olmaktadır. Bunun dışında menenjit, ensefalit, nörosarkoidoz ve tüberküloz gibi enfeksiyonlar da edinilmiş CDI'nin nedenleri arasında yer almaktadır [29, 67, 73].

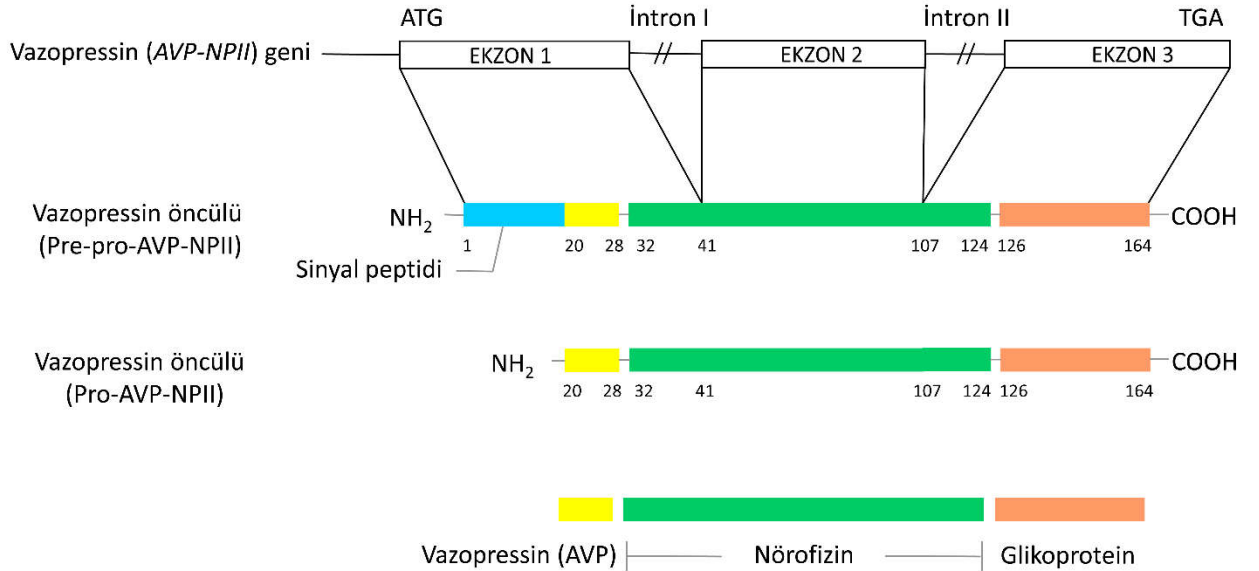
2.1.1.4.2. Konjenital CDI

Konjenital CDI, CDI'nin kalıtsal formudur ve ailesel nörohipofizyal diabet insipidus olarak da adlandırılmaktadır. Tüm CDI olgularının sadece %1-5'ini oluşturan nadir kalıtsal bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [74-75]. Bu hastalık genellikle şiddetli poliüri ve polidipsi belirtileri ile erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır [76-77].

Konjenital CDI, *AVP-NP11* geninde bulunan mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla, *AVP-NP11* geninde CDI ile ilişkili olarak The Human Genome Mutation Database'de (HGMD) yer alan 75 mutasyon tanımlanmıştır [78-79].

2.1.1.4.2.1. *AVP-NP11* Geni, İşlenmesi ve AVP Biyosentezi

İnsanda bulunan *AVP-NP11* geni, 2.5 kb boyutunda olup, 20. kromozom üzerinde (20p13) yer almaktadır [76, 80]. Bu gen, 3 ekzon ve 2 intron bölgesinden oluşmakta ve öncül bir hormon olan pre-pro-AVP-NP11'yi kodlamaktadır [16]. Bu öncül hormon 164 aminoasit uzunluğundadır ve sırasıyla bir sinyal peptid, vazopressin (AVP), nörofizin II (NP11) ile bir glikoproteinden oluşmaktadır [81-82] (Şekil 2.8).



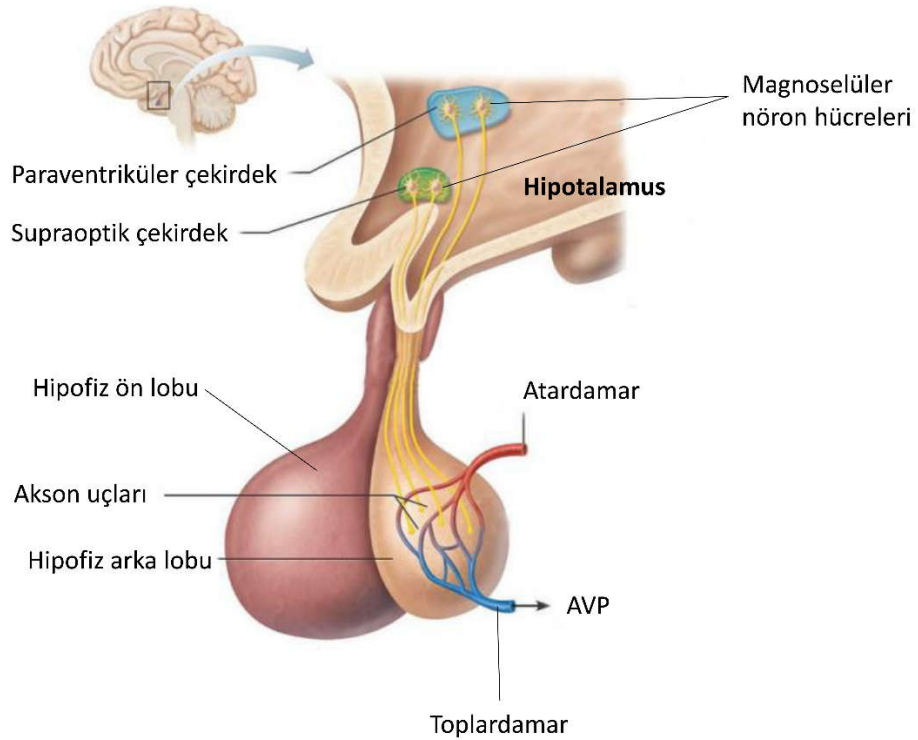
Şekil 2. 8. *Vazopressin (AVP-NP11)* geninin yapısal organizasyonu ve gene ait protein ürünlerinin şematik gösterimi. Sayılar amino asitleri göstermektedir. [82] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

AVP-NP11 geninde yer alan 1. ekzon, bu pre-pro-peptid yapısında yer alan sinyal peptidi, vazopressini ve NP11'nin amino uç (N- terminal) kısmını kodlamaktadır. Sinyal peptid kısmı 19 amino asit uzunluğundadır ve proteinin translasyon sonrası ER içerisine taşınması için sinyal görevi görmektedir. Birinci ekzon tarafından kodlanan AVP peptid kısmı 9 amino asit uzunluğunda iken, NP11'nin amino uç

kısından ilk 9 amino asit de 1. ekzon tarafından kodlanmaktadır. İkinci ekzon, NPİİ'nin yüksek oranda korunmuş bölgesi olan merkezi bölgesini kodlamaktadır ve bu bölge 67 amino asitten oluşmaktadır. Üçüncü ekzon ise, NPİİ'nin 17 amino asit uzunluğundaki karboksil ucu (C-terminal) ile 39 amino asitten oluşan bir glikoprotein kısmını kodlamaktadır. Böylece toplamda 93 amino asitten oluşan NPİİ kısmının farklı bölgeleri farklı ekzonlar tarafından kodlanmış olmaktadır [25, 75-76, 82]. NPİİ, AVP'nin katlanmasından, proteolizini önlemekten ve ER'den Golgi'ye taşınma işleminden sorumludur. Pre-pro-AVP-NPİİ'nin karboksil uç kısmında bulunan glikoprotein yapısındaki peptid kısmı ise copeptin olarak adlandırılmaktadır ve fonksiyonu henüz bilinmemektedir [83-84].

Öncül hormon olan pre-pro-AVP-NPİİ, hipotalamusun supraoptik ve paraventiküler çekirdeklerinde bulunan magnoselüler nöron hücrelerinde sentezlenmektedir [10, 85] (Şekil 2.9). Nöron hücre gövdesi içerisinde sentezi gerçekleşen öncül hormon, yapısında bulunan sinyal peptid dizisi ile ER'ye hedeflenmekte ve ER içerisine taşınmaktadır (Şekil 2.10). ER içerisinde pre-pro-AVP-NPİİ'den sinyal peptidin sinyal peptidaz ile kesilip uzaklaştırılması ve glikopeptid kısmına bir karbohidrat zincirinin eklenmesi ile pro-AVP-NPİİ meydana gelmektedir. Ardından pro-AVP-NPİİ katlanmakta ve sistein kalıntıları arasında disülfid bağları oluşumu ile de öncül hormonun konformasyonu stabilize edilmiş olmaktadır [10-11, 86]. AVP domaini içerisinde 1 ve NPİİ domaini içerisinde ise 7 olmak üzere öncül hormon yapısında toplam 8 adet disülfid bağı oluşmaktadır. Bu öncül hormon yapısının ER'de doğru bir biçimde katlanmasının, molekülün serbestçe dönmesini veya sert bir bükülme oluşturmasını sağlayan glisin veya prolin kalıntıları gibi kritik olarak yerleşen amino asitlerin dizideki konumuna bağılı olduğu belirtilmektedir. Bunun dışında, katlanmanın stabilitesinin, AVP'nin amino ucunun, NPİİ'nin amino ucundaki belirli bir bölgeye bağlanması ile ilişkili olduğu da belirtilmektedir [11, 24-25, 87]. Daha sonra öncül hormon, ER'den çıkarak Golgi aygıtına taşınmakta ve buradan trans Golgi ağına ilerlemektedir. Trans Golgi ağında, öncül hormon yapıları daha büyük oligomerler oluşturmak üzere birleşmekte ve burada nörosalgı granülleri halinde paketlenmektedir. Öncül hormonun sentezlendiği yer olan magnoselüler nöron hücrelerinin aksonları arka hipofize kadar uzanmaktadır. Böylece, öncül hormon akson boyunca nörosalgı granülleri halinde mikrotübüller aracılığıyla taşınmakta ve bu taşınma sırasında ek translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadır. Bu

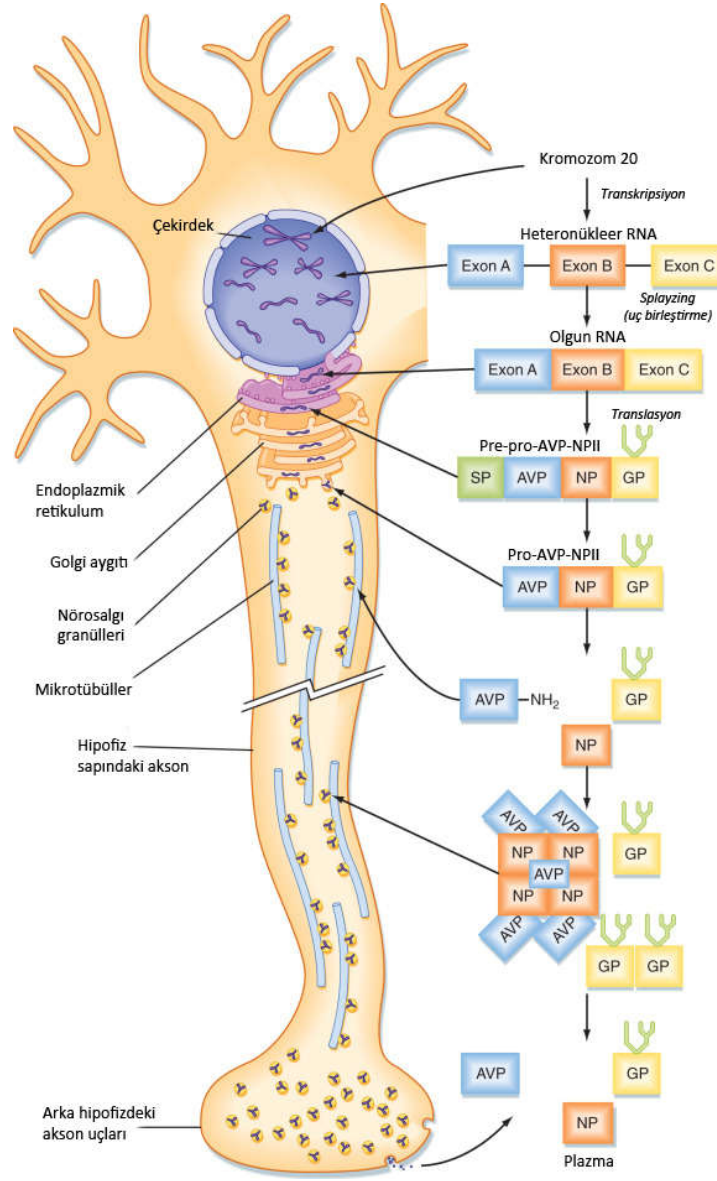
modifikasyonlar sonucunda salgı vezikülleri içerisinde, öncül hormon peptidazlar yardımıyla aktif hormon olan AVP, taşıyıcı proteini NPII ve glikopeptid kısımları olmak üzere üç peptid yapısına ayrılmaktadır [11, 24, 88-90]. Daha sonra bu moleküller, sinir uçlarında salgı vezikülleri içinde depolanmakta ve herhangi bir uyarı gelene kadar burada beklemektedir. Uyarı geldiğinde, bu uyarana yanıt olarak salgı vezikülünün içeriği ekzositoz ile arka hipofizden kana salınmaktadır [87]. Veziküllerin içinde, AVP ve NPII arasındaki geri dönüşümlü kovalent olmayan etkileşimler, bu moleküller kan dolaşımına salınana ve serbest hormon (AVP) ve NPII'ye ayrılincaya kadar devam etmektedir [11, 91].



Şekil 2. 9. Hipotalamusun paraventriküler ve supraoptik çekirdekleri ile AVP'nin sentezlendiği magnoselüler nöron hücreleri. Nöron hücrelerinin aksonları arka hipofize kadar uzanmaktadır. Nöron hücre gövdesinde sentezlenen AVP, akson boyunca taşınarak arka hipofizdeki akson uçlarından kan dolaşımına verilmektedir [85] nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

Vücutta hipotalamik nöronları uyaran aksiyon potansiyellerinin sıklığı arttıkça AVP salınma hızı da artmaktadır [24, 92]. Normal olarak, insanlarda plazma AVP konsantrasyonu 4 pg/mL'den azdır [93-94]. AVP'nin hipotalamustaki sentezi, arka hipofize taşınması ve burada depolanması ise yaklaşık olarak 1-2 saat sürmektedir

[95]. AVP, böbrek ve karaciğerdeki vazopressinazlar tarafından metabolize edilmektedir ve bu hormonun plazmada yarılanma ömrü yaklaşık olarak 10-35 dakikadır [96].



Şekil 2. 10. Pre-pro-AVP-NP11'nin sentezi, işlenmesi ve taşınması. Hipotalamik magnoselüler nöron hücre gövdesi içerisinde sentezlenen öncül AVP hormonu (pre-pro-AVP-NP11), akson boyunca taşınması sırasında proteolitik olarak aktif hormon olan AVP'ye, taşıyıcı proteini olan nörofizine (NP) ve bir glikoproteine (GP) ayrılmaktadır. NP, beş AVP molekülünü bağlayan tetramerler halinde düzenlenmektedir. Arka hipofizde sonlanan akson ucundan salınan her üç peptid de (AVP, NP, GP) sistemik kana verilmektedir. [90] nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

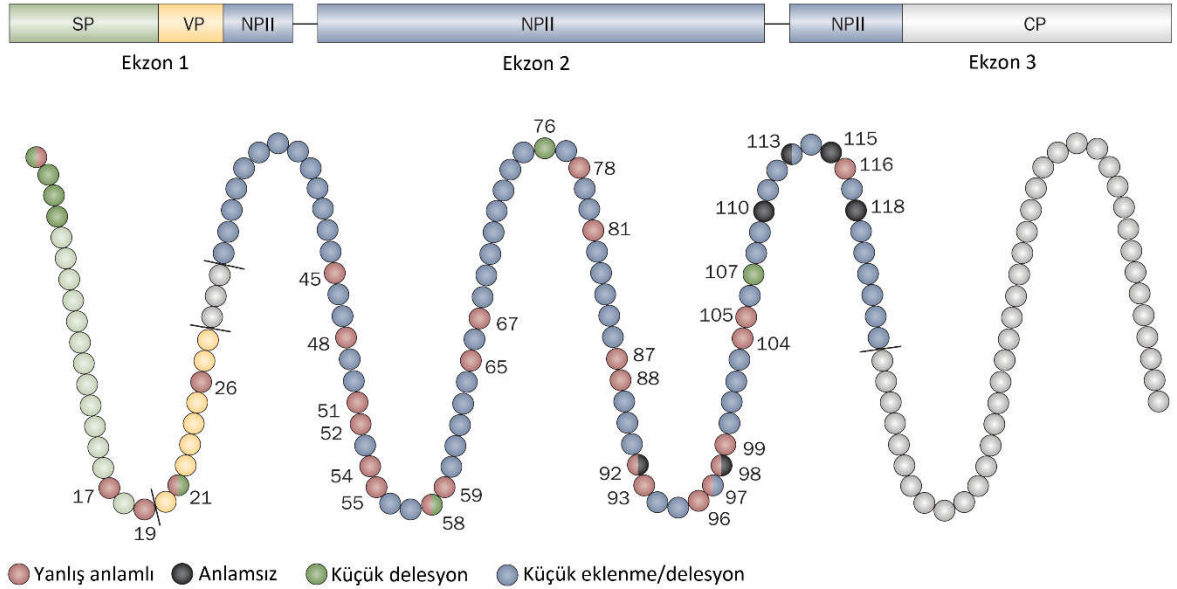
Fiziksel veya kimyasal birçok faktör AVP salınımının uyarılmasına neden olmaktadır. Yüksek plazma ozmolalitesi, azalmış kan hacmi, bulantı, kusma, hipotansiyon, stres, hipoksi, egzersiz ile ayrıca dopamin, asetilkolin, anjiyotensin II ve histamin gibi kimyasal mediatörler bu faktörler arasında yer almaktadır. Bunlardan AVP salınımı için en güçlü uyarıcı, artmış plazma ozmolalitesidir. AVP salınımının inhibe edilmesi ise, azalmış plazma ozmolalitesi, artan kan hacmi, alkol tüketimi, opioidler ve gama-aminobutirik asit gibi kimyasal mediatörler aracılığıyla olmaktadır [16, 94].

2.1.1.4.2.2. AVP-NPİİ Geni Mutasyonları

Bugüne kadar *AVP-NPİİ* geninde CDI ile ilişkili olarak tanımlanmış 75 adet mutasyonun büyük bir kısmı, tek baz değişiklikleri sonucu oluşan yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlardır. Bunun dışında, dinükleotit baz değişiklikleri, küçük insersiyon/delesyon (indel) mutasyonlar, 1 veya 3 nükleotiti içeren küçük delesyonlar ve splice-site mutasyon da gözlenmiştir (Şekil 2.11) [16, 75-76, 97-98]. Bu mutasyonların çoğu, genellikle ekzon 2'de yer alan ve AVP için hücre içi bağlanma proteini olan NPİİ'yi kodlayan dizide bulunmuştur. Birinci ekzonda yer alan sinyal peptid ve AVP'nin kendisini kodlayan dizide sadece birkaç mutasyon saptanırken, 3. ekzonda bulunan glikoprotein kodlayan dizide ise herhangi bir mutasyon saptanmamıştır [75, 77].

Sinyal peptid mutasyonlarının, sinyal peptidazın hedeflenmesinde önemli olduğu belirtilmektedir. Bu mutasyonların varlığında sinyal peptidazın prepro-AVP-NPİİ'den sinyal peptidi kesip çıkarma yeteneğinin azaldığı ve bu nedenle prepro-AVP-NPİİ'nin uygun şekilde işlenemediği gösterilmiştir [13, 99-101]. AVP hormonunun kendisini kodlayan dizide yer alan mutasyonlar sonucu, mutant hormon hücreden salınmaya devam etmekte, fakat AVPR2 reseptörüne bağlanma yeteneği azaldığından dolayı antidiüretik aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir [102]. NPİİ mutasyonları, öncül proteinin yanlış katlanmasına veya dimerizasyonuna yol açmaktadır. Bununla birlikte, bu mutant öncül proteinin ER'de birikmesine, nöron hücrelerinde mutant öncül proteinin kümelenmesine ve hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerindeki magnoselüler nöronların dejenerasyonuna neden olmaktadır [15, 103-104]. Buna ek olarak, NPİİ'yi kodlayan dizide yer alan

birkaç nokta mutasyonunun, stop kodonunun oluşmasına neden olarak, kesilmiş (erken sonlanmış) bir NPİİ molekülü oluşumuna neden olduğu da gözlenmiştir. Protein sentezindeki bu erken sonlanma sonucu, normal öncül protein (prepro-AVP-NPİİ) yapısı ile karşılaştırıldığında, mutant proteinde NPİİ molekülünün karboksil ucu ve glikoprotein domain kısmının eksik olduğu, buna bağlı olarak mutant proteinin konformasyonunun normal proteinden oldukça farklı olduğu gösterilmiştir. Konformasyonel değişikliğin sonucu olarak da, mutant NPİİ'nin, AVP'ye bağlanamamasının veya daha büyük oligomer kompleksleri oluşturmak üzere kendi kendine birleşmemesinin mümkün olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, AVP'nin sentezi için, öncül protein yapısındaki NPİİ kısmı ve NPİİ'nin de yüksek oranda korunmuş olan merkezi kısmının önemi büyüktür [105].



Şekil 2. 11. Konjenital CDI (ailesel nörohipofizyal diabetes insipidus) ile ilişkili en sık görülen mutasyon tiplerinin ve mutasyonların AVP proteini üzerindeki yerleşimlerinin şematik gösterimi. Kırmızı daire sembolleri, yanlış anlamlı mutasyonları; siyah renkteki daireler, anlamsız mutasyonları; yeşil renkteki daireler, küçük delesyonları ve mavi renkteki daireler ise küçük insersiyon/delesyonların buldukları kodonları belirtmektedir. (Kısaltmalar: SP, sinyal peptidi; VP; vazopressin; NPİİ, nörofizin; CP, copeptin). [16] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

AVP-NP11 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan konjenital CDI, çoğunlukla otozomal baskın kalıtım özelliği göstermektedir. Bunun dışında, çok nadir olarak otozomal çekinik ve X'e bağlı çekinik kalıtım özelliği gösteren olgular da mevcuttur [40].

2.1.1.4.2.3. Otozomal Baskın CDI

Ailesel nörohipofizyal diabet insipidus olgularının çok büyük bir kısmı, otozomal baskın kalıtım özelliği göstermektedir. Bu kalıtım özelliği gösteren hastalardaki *AVP-NP11* geninin sadece tek alelinde mutasyon bulunmaktadır ve bu nedenle bu hastaların mutasyonlar için heterozigot oldukları bulunmuştur [13, 16]. Kalıtımın bu formu, erkek ve kadın bireyleri eşit olarak etkilemektedir [16]. Otozomal baskın CDI'li tüm bebekler doğumda ve erken bebeklik döneminde sağlıklıdır, dolayısıyla hastalığa ait herhangi bir belirti göstermemektedir [19, 29]. Bu belirtiler tipik olarak poliüri, susama, polidipsidir ve genellikle 1 yaşından sonra olmak üzere doğumdan aylar veya yıllar sonra da ortaya çıkabilmektedir [12, 40, 97]. Hastalığın başlangıç yaşının hastalar arasında farklılık gösterdiği ve bu durumun hastalığa sebep olan mutasyon tipinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Örneğin, sinyal peptid mutasyonuna sahip hastalarda hastalığın daha geç bir zamanda (genç yetişkinliğe kadar) başladığı görülürken, NP11'yi kodlayan dizideki mutasyonlara sahip hastalarda hastalığın bebeklik döneminde ortaya çıktığı görülmüştür [16, 29]. Bununla birlikte, hastalık ilk geliştiğinde hastalarda kısmi AVP eksikliği görülmekte ve bu durum zamanla şiddetlenmektedir [16].

Otozomal baskın CDI'ye neden olan ilk mutasyon 1991 yılında Ito ve ark. [106] tarafından rapor edilmiştir. Bu mutasyon, *AVP-NP11* geninin 2. ekzonunda bulunan NP11'yi kodlayan dizide yer almaktadır ve tek baz değişimi (G→A) sonucu oluşan yanlış anlamlı mutasyondur; dizideki tek baz değişikliği, glisin amino asidi yerine serin amino asidinin gelmesi ile sonuçlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar ile, otozomal baskın CDI'ye neden olan mutasyonların sinyal peptid, AVP hormonunun kendisi ve NP11'yi kodlayan dizide meydana geldikleri bulunmuş ve copeptin'i kodlayan dizide ise hastalıkla ilişkili herhangi bir mutasyon saptanmamıştır [97]. Bu mutasyonlar *AVP-NP11* gen dizisi üzerinde meydana geldikleri bölgeye ve yapılarına

göre farklı etkilere sahip olabilmektedir. Örneğin, AVP hormonunun kendisini veya NPII'yi kodlayan dizide meydana gelen mutasyonlar, dizideki sistein kalıntılarını değiştirerek veya diziyeye sistein kalıntısı ekleyerek öncül hormon yapısındaki disülfid bağlarının yerleşimini bozmakta ve sonuçta öncül hormonun (prepro-AVP-NP II) yanlış katlanmasına neden olabilmektedir. Bunun dışında, yine aynı bölgede meydana gelen farklı bir mutasyon sonucu gen dizisinde erken stop kodonu oluşabilmekte veya AVP, kendisinin taşıyıcı proteini olan NP II'ye hatalı bağlanabilmektedir. Sinyal peptid kısmında meydana gelen mutasyonlar ise, sinyal peptidin kesilip çıkarılma aşamasında ve böylece öncül hormonun işlenmesinde hatalara neden olabilmektedir [76, 97, 107].

Otozomal baskın CDI'de diğerlerine göre daha yaygın görülen mutasyon, 19. kodonda treonin amino asidinin alanin amino asidi ile yer değiştirdiği A19T mutasyonudur. Bu mutasyon 1. ekzonda yer almaktadır ve sinyal peptidi kodlayan dizide tek baz değişimi sonucu (guaninden adenine; g.279G→A) meydana gelmektedir. A19T mutasyonu, glikolize olmuş fakat sinyal peptidin kesilip çıkarılma sırasındaki hatalardan dolayı sinyal peptidini koruyan anormal bir öncül hormon oluşumuna neden olmaktadır [76, 101]. Otozomal baskın CDI ile ilişkili splice-site mutasyon ise Tae ve ark. [98] tarafından 2005 yılında tanımlanmıştır. Bu mutasyon, diğer alışılmış mutasyonlara benzemeyerek *AVP-NP II* geninin herhangi bir ekzon bölgesinde meydana gelmeyip, genin 2. intron bölgesinde (g.1999) saptanmıştır. Bu nedenle intronik mutasyon olarak da bilinmektedir. Mutasyon, 2. intronda tek nükleotitin (guanin) delesyonu sonucu meydana geldiğinden dolayı, kodon 108'ten itibaren çerçeve kaymasına (frameshift) ve 3. ekzonda erken bir stop kodonunun oluşmasına neden olmaktadır. Mutasyonun, pre-mRNA birleştirme (splicing) sırasında da 2. intronun kesilip çıkarılma yerine pre-mRNA yapısında korunmasına yol açtığı belirtilmektedir. Oluşan mutant protein ise, erken stop kodonu oluşması nedeniyle NP II'nin karboksil ucu bakımından yoksundur ve 167 amino asitten oluşmaktadır. Etkilenen bireylerin bu mutasyon için heterozigot oldukları belirtilmiştir [76, 98].

AVP-NP II genindeki mutasyonların otozomal baskın CDI patogenezindeki rolü için iki ayrı mekanizma ileri sürülmektedir. İlk mekanizma, mutant öncül hormonların yanlış katlanmasını, yanlış katlanan proteinlerin ER'de birikerek sitotoksik protein

kümeleri oluşturmasını ve magnoselüler hücrelerin fonksiyon kaybı sonucu bu hücrelerin ölümünü tetikleyerek ilerleyen nöron kaybını içermektedir [19, 87, 108]. CDI hastalarında yapılan otopsi çalışmaları sonucu, AVP üreten ve salgılayan magnoselüler nöronların kaybı gözlenmiştir [109]. Fare modelleri ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda ise, yanlış katlanmış mutant AVP öncül hormonun ER’de birikiminin ER stresine neden olarak otofajiyi indüklediğini ve AVP salgılayan nöron kaybının da otofajiden dolayı meydana gelebileceği bildirilmiştir [18, 76, 97, 110-112]. ER’de biriken mutant öncül proteinlerin, hücre için gerekli diğer proteinlerin düzenli işlenmesini de etkileyerek de hücrenin ölümüne yol açabileceği belirtilmiştir [101,113-114]. Bu mekanizma, otozomal CDI’nin başlangıç yaşının hastalar arasında neden farklılık gösterdiğini kısmen açıklayabilmektedir. Yanlış katlanmış öncül hormonun sitotoksik birikiminin farklı hastalarda ve farklı zamanlarda değişen derecelerde meydana gelebileceği belirtilmektedir. Bu durumun da mutant AVP öncül hormonunun katlanma kusurundaki şiddeti, ER protein kalite kontrolünün hücredeki etkinliği, AVP üreten magnoselüler nöronların duyarlılığı gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu ileri sürölmektedir [76, 115].

Normal şartlar altında, AVP öncül hormonları ER’de homodimer yapıları oluşturmaktadır. *AVP-NPII* gen mutasyonlarının otozomal baskın CDI patogenezindeki rolü için ikinci mekanizma, yabancı tip ile mutant AVP öncül hormonlarının birlikte heterodimer yapısı oluşturarak ER’de tutulduklarını belirtmektedir. ER’de biriken mutant AVP heterodimerlerinin sitotoksik olduğu, bu nedenle nöron hücrelerinin yavaş fakat ilerleyici kaybına neden olduğu ve sonuçta AVP eksikliğine yol açtığı düşünölmektedir. Bu mekanizma ile mutant öncül hormon, yabancı tip öncül hormonun işlenmesini engelleyerek onun hücre içi trafiğini bozmuş olmaktadır. Sonuç olarak, mutant hormonun yabancı tip hormonun hücrede salgılanması üzerine baskın negatif bir etkisi olduğundan, bu mekanizma “baskın-negatif etki” olarak bilinmektedir [18-19, 116].

AVP-NPII gen mutasyonlarının otozomal baskın CDI patogenezindeki rolü ile bu hastalığın baskın ve ilerleyici özelliğinin, ancak bu iki mekanizmanın paralel bir şekilde meydana gelmesi ile ortaya çıkabileceği belirtilmiştir [19].

2.1.1.4.2.4. Otozomal Çekinik CDI

Ailesel nörohipofizyal diyabet insipidus olguları incelendiğinde, otozomal çekinik kalıtım özelliği gösteren olgu sayısının, otozomal baskın olan tipine göre daha az olduğu görülmektedir [117]. Bu kalıtım özelliği gösteren hastalarda *AVP-NP11* geninin her iki alelinde de mutasyon bulunduğundan dolayı, hastaların bu mutasyon için homozigot oldukları; *AVP-NP11* geninin sadece tek alelinde mutasyon bulunduranların ise heterozigot taşıyıcı oldukları belirtilmektedir [87]. Heterozigot taşıyıcılar hastalığa ilişkin herhangi bir belirti göstermemektedir. Hastalıktan etkilenen homozigot bireylerde ise, CDI'nin otozomal baskın formundan farklı olarak, belirtiler genellikle yaşamın ilk 3 ayında ortaya çıkmaktadır. Polidipsi, poliüri ve plazma AVP eksikliği bu hastalarda görülen en belirgin belirtilerdir [102, 117].

Otozomal çekinik CDI'ye neden olan mutasyonlar, *AVP-NP11* geninin genellikle 1. ekzonunda yer alan AVP hormonunun kendisini kodlayan dizide bulunmuştur. Willcutts ve ark. [102] tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada, otozomal çekinik CDI'ye neden olan bir mutasyon yine aynı bölgede saptanmıştır. Bu mutasyon, tek baz değişikliği sonucu (g.C301→T) oluşan yanlış anlamalı mutasyondur; dizideki tek baz değişikliği, normalde AVP hormonunun 7. amino asidi olan prolin amino asidinin lösin amino asidi ile yer değiştirmesiyle (P7L) sonuçlanmıştır. Çalışmada meydana gelen mutasyonun, mutant hormonun sentezini ve/veya hücreden salınmasını etkilememesine rağmen, mutant hormonun AVPR2 reseptörüne bağlanma yeteneğinin, normal AVP hormonu ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 30 kat azaldığı ve bu nedenden dolayı antidiüretik aktivitesinde düşüşler olduğu saptanmıştır. Bu sonuç da hastada görülen önemli belirtilerden poliürinin nedenini açıklamaktadır. Christensen ve ark. [118] tarafından yapılan çalışmada, otozomal çekinik CDI'ye neden olan P26L mutasyonu ile hastalığın otozomal baskın formuna neden olan Y21H mutasyonu incelenmiş ve her iki mutasyonun da *AVP-NP11* geninin 1. ekzonundaki AVP hormonunun kendisini kodlayan dizide yer aldığı belirtilmiştir. Neuro2A hücreleri ile yapılan karşılaştırmalı ekspresyon çalışmaları sonucunda, Y21H mutant öncül hormonunun ER'den çıkışında ve olgun Y21H-AVP ile NP11'ye işlenmesi sırasında sorunlar olduğu, sonuçta ER'de biriktiği gösterilmiştir. Buna karşılık, P26L mutant öncül hormonun ER'de birikmeyip salgı granülleri içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Radyoimmün

analiz (Radioimmunoassay; RIA) analizi sonucu hücre kültür ortamında ölçülen Y21H-AVP ve P26L-AVP, yabani tip (WT) ile karşılaştırıldığında, mutant proteinlerin miktarlarında azalmalar olduğu görülmüştür. Y21H-AVP'nin miktarındaki azalmanın, mutasyonun öncül hormonun katlanmasını, işlenmesini, hücre içi trafiğini bozması sonucu mutant hormonun ER'de birikmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. P26L-AVP'nin miktarındaki azalmanın ise, mutasyonun öncül hormonun katlanmasını veya hücre içi trafiğini etkilememesine rağmen, onun son işleme basamağı olan olgun Y21H-AVP hormonu ve NPII'ye enzimatik ayrılma basamağını etkilemesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Christensen ve ark. [119] tarafından 2013 yılında yapılan bir başka çalışmada, doğumundan sonraki ilk birkaç günde hipernatremi ve düşük yoğunluklu idrar belirtileri gösteren otozomal çekinik CDI'li bir birey rapor edilmiştir. Yapılan moleküler genetik analiz çalışmaları sonucunda, bireyin *AVP-NP11* genine ait her iki allelde yaklaşık 10 kilobazlık büyük bir delesyon olduğu görülmüştür. Bu delesyonun *AVP-NP11* geninin büyük bir kısmı (3. ekzon, 2. intron ve 2. ekzonun çoğunluğu) ve *AVP-NP11* geni ile *oksitosin (OXT)* geni arasındaki intergenik bölgedeki düzenleyici dizileri içerdiği belirtilmiştir. Dolayısıyla hastalıktan etkilenen bireydeki fenotipin, *AVP-NP11* geninin hatalı transkripsiyonundan kaynaklanabileceği ifade edilmiştir.

Otozomal çekinik CDI çalışmaları için Brattleboro sıçan modeli oluşturulmuştur [120]. Brattleboro sıçanları, *AVP-NP11* geninin ikinci ekzonunda tek bir guanin nükleotidinin delesyonu için homozigottur. Delesyon, taşıyıcı NP11'yi kodlayan dizide okuma çerçevesinin kaymasına neden olmakta ve normal stop kodonunun kaybıyla sonuçlanmaktadır [121]. Mutasyona uğramış alel, normal bir AVP hormonunu, fakat öncül hormonun taşınması ve işlenmesinde hatalara neden olan anormal bir taşıyıcı NP11 kodlamaktadır. Brattleboro sıçanları üzerinde yapılan çalışmalar, bu sıçanların normal sıçanlar ile karşılaştırıldığında salgıladıkları AVP miktarında azalmalar olduğunu, AVP eksikliğinin AQP2 hücre içi trafiğini etkileyerek AQP2 ifade seviyesinin azalmasına yol açtığını göstermiştir. Ayrıca, böbrek idrar konsantrasyonu için AVP eksikliğinin sonuçlarını anlamada bu sıçan modelinin değerli olduğu kanıtlanmıştır [19, 25, 33, 122-123].

Otozomal çekinik CDI'nin bir diğer formu *Wolfram Sendromu 1 (WFS1)* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır ve Wolfram sendromunda bir klinik bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. *WFS1* geni, 4. kromozomun kısa kolunda (4p) yer almaktadır ve beyin, pankreas gibi çeşitli dokularda ifade olmaktadır [29, 97]. Bu gen, ER'de transmembran olarak yerleşmiş bir protein olan wolframin proteinini kodlamaktadır. Bu protein, bir kalsiyum kanalı olarak işlev görebilmekte veya kalsiyum kanallarını aktive ederek pankreatik beta hücrelerinde ER homeostazını korumaktadır [124-127]. *WFS1* geninde meydana gelen mutasyonlar, DIDMOAD olarak da isimlendirilen Wolfram sendromuna neden olmaktadır. DIDMOAD, sendromda en sık görülen belirtiler olan Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optik Atrofi ve sağırılık (Deafness)'in ilk harflerinin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuş bir kısaltmadır. Bu belirtiler arasından DI, hastaların yaklaşık %70'inde görülmektedir ve çoğu hastada 20'li ve 30'lu yıllarda ortaya çıkmaktadır [97, 125, 128]. Hastalardaki DI'nin, AVP'nin kısmi veya ciddi eksikliğinden kaynaklandığı, arka hipofiz dejenerasyonunun histolojik kanıtı ve öncül hormonun hatalı işlenmesi ile ilişkili olduğu belirtilmekte, ancak hücre içinde AVP salgılanma trafiğinin nasıl bozulduğu bilinmemektedir [16, 129-130].

2.1.1.4.2.5. X'e Bağlı Çekinik CDI

CDI'nin bu formu, kalıtım özelliğinden dolayı sadece erkek bireyleri etkilemektedir. Poliüri, düşük idrar yoğunluğu, polidipsi gibi belirtiler doğumdan birkaç ay veya yıl sonra ortaya çıkmaktadır. Başlangıçta kısmi olarak görülen AVP eksikliğinin şiddeti yaşla birlikte artabilmektedir. Bugüne kadar test edilen tüm dişi bireylerin ise, taşıyıcı oldukları, AVP'yi normal olarak salgıladıkları ve hastalığa ilişkin herhangi bir belirti göstermedikleri görülmüştür [16].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, ailesel nörohipofizyal diabet insipidusun X'e bağlı çekinik kalıtım özelliği gösteren sadece 1 aile tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, hastalıktan etkilenen erkek bireylerin *AVP-NP11* ve *AVPR2* genlerinin tamamen normal olduğu bulunmuştur. Hastalıktan sorumlu gen veya genler henüz tanımlanmamış olmasına rağmen, fenotip *AVPR2* geninin bulunduğu bölge olan Xq28 kromozom bölgesine bağlanmıştır. CDI'nin bu formunun genetik arka planı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Kalıtım özelliğinin benzerliği göz

önüne alındığında, uygun tanı testleri yapılmadıkça bu hastalığın X'e bağlı çekinik NDI ile karıştırılabileceği belirtilmektedir [16, 29, 97].

2.1.2. Diabetes İnsipidus Tanısı

DI'nin tanısında idrar hacmi ve ozmolalitesi temel ölçütlerdir. DI tanısının onaylanabilmesi için, idrarın günlük atılım miktarının >50 ml/kg/gün olması gerekirken, idrar ozmolalitesinin ise <300 mOsm/kg olması gerekmektedir [16, 19]. Hipotonik poliüri doğrulandıktan sonra hasta öyküsü ve klinik belirtiler tanı için yararlı ipuçları sağlamaktadır. DI için klinik belirtiler genel olarak baş dönmesi, halsizlik, noktüri (idrara çıkmak için gece en az 1 kez uyanma), yorgunluk ve vücutta dehidratasyon varlığını belirten ateş, kuru cilt, kilo kaybı ile cilt turgorunda azalmadır. Küçük çocuklarda ise genellikle şiddetli dehidratasyon, kusma, kabızlık, ateş, uyku bozuklukları, sinirlilik, büyümenin yavaşlaması ve bazen zihinsel gerilik görülmektedir [40, 67, 87].

Çeşitli DI tiplerinin ayırıcı tanısı önemlidir, çünkü DI tiplerinin her birinin tedavi stratejisi farklıdır ve yanlış tedavinin uygulanması tehlikeli olabilmektedir. DI tipleri arasında ayırıcı tanıyı yapabilmek için iki aşamadan oluşan su kısıtlama testi uygulanmaktadır [29, 68, 87]. Bu testin amacı, hastanın idrar konsantrasyon yeteneğini gözlemlemek ve AVP'ye karşı yanıtını değerlendirmektir [117]. Bu amaçla, testin ilk aşamasında hastanın AVP salgılamasını uyarmak için güçlü bir uyarıcı olarak dehidratasyon yani hastanın yeterince susuz hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için hastanın sıvı alımı yaklaşık 4-18 saat kadar tamamen durdurulmaktadır. Testin başlangıcında ve testin uygulandığı süre boyunca hastanın vücut ağırlığı, idrar ozmolalitesi, idrar hacmi, plazma sodyum değeri ve plazma ozmolalite değerleri birer saat ara ile ölçülerek takip edilmektedir [72]. Test boyunca, hasta vücut ağırlığından %3-5'ini kaybettiğinde ve/veya AVP salınımını maksimum düzeyde uyaran seviyeler olan plazma sodyum düzeyi 150 mmol/L'den fazla olduğunda ve/veya plazma ozmolalitesi 300 mOsm/kg'den fazla olduğunda ve/veya idrar ozmolalitesi normal değere arttığında testin uygulanmasına son verilmelidir [67, 87, 97]. Testin bu ilk aşaması AVP salgılaması ve fonksiyonu normal olan primer polidipsi hastalarını, dehidratasyonun sonunda idrarı konsantre etme yeteneği olmayan CDI ve NDI'li hastalardan ayırmaktadır [68].

Su kısıtlama testinin ikinci aşamasında, hastanın serum AVP değeri ölçülmekte ve hastaya dışardan sentetik AVP analogu desmopresin (DDAVP) verilmektedir. DDAVP'nin ağızdan, burun içi, deri altı ve damar içi uygulama için uygun formülasyonları bulunmaktadır [36]. DDAVP uygulamasından 30-60 dakika sonra idrar ozmolalitesi ölçülmektedir [67, 72]. Ölçüm sonucunda, idrar ozmolalitesindeki artış %50 veya daha fazla ise kişiye CDI tanısı konulmaktadır. Eğer idrar ozmolalitesindeki bu artış %10'un altındaysa veya DDAVP'ye karşı herhangi bir yanıt oluşmazsa kişiye NDI tanısı konulmaktadır. Böylelikle su kısıtlama testinin ikinci aşaması özellikle NDI ve CDI'nin ayrımını yapmaktadır [29, 32, 131-132]. Bununla birlikte, idrar ozmolalitesindeki artışın %10 ile %50 arasında olduğu durumlarda sonuca göre kesin bir ayırım yapılamamaktadır. Bu gibi durumlarda, ayrımı yapabilmekte yardımcı olması için plazma AVP seviyeleri ölçülmektedir. NDI'li hiperozmolar hastalar yüksek AVP seviyelerine sahipken, CDI'li hastalar plazma ozmolalitelere göre ya AVP yanıtı olmamakta ya da çok düşük seviyede bir AVP yanıtına sahip olmaktadır. Fakat tanı için AVP seviyelerini kullanmanın dezavantaja sahip olduğu da belirtilmektedir. Bunun nedeninin hassas AVP radyoimmünoanalizlerin teknik olarak zor olması ve yöntem uzun sürdüğü için sonuçların ancak birkaç gün sonra elde edilebilmesidir. Ayrıca AVP stabil olmayan, kararsız bir yapıya ve kısa bir yarı ömüre sahiptir. Bu nedenle tanı için kesin bir ayırımın yapılamadığı bu gibi durumlarda, alternatif bir klinik çalışma olarak DDAVP uygulamasına 1-2 gün daha devam edilmektedir. Eğer kişide CDI mevcutsa, ardışık olarak uygulanan DDAVP dozlarına daha belirgin yanıtlar vermekte ve böylece tanı doğrulanmaktadır [34, 67-68, 97].

Plazma AVP seviyesinin belirlenmesindeki zorluklar nedeniyle, AVP seviyesinin belirteci olarak plazma copeptin ölçümü önerilmektedir. Copeptin, AVP hormonunun öncül yapısı olan Pre-pro-AVP-NPİİ'nin karboksil uç kısmındaki peptid kısmıdır ve ozmotik uyarılara yanıt olarak AVP ile eş molar miktarda nörohipofizden salgılanmaktadır. Bu nedenle plazma copeptin seviyesi aynı zamanda dolaşımdaki AVP konsantrasyonunu yansıtmaktadır. Ayrıca, copeptin'in, AVP'den farklı olarak, serum veya plazmada oda sıcaklığında birkaç gün boyunca stabil kaldığı ve bu nedenle ölçümünün daha kolay olduğu belirtilmektedir. Plazma copeptin ölçümü ile ilgili yapılan fizyolojik çalışmalar, plazma ozmolalitesindeki değişikliklere copeptin

yanıtlarının AVP yanıtı ile benzer olduğunu göstermiştir. Hipertonik tuz infüzyonu sonucu oluşan ozmotik uyarım sonucu sağlıklı bireylerde AVP salgılanmasında ve copeptin seviyesinde artış gözlenmiştir. CDI'li hastalarda ise bu artışın, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, daha az seviyede olduğu görülmüştür. Tüm bu bilgiler birlikte ele alındığında, plazma copeptin ölçümü, plazma AVP konsantrasyonunu belirleme yerine daha kolay, güvenilir bir yöntem olarak görülmekte ve böylelikle DI'nin tanısı için de umut verici bir belirteç olarak ortaya çıkmaktadır [29, 68, 131, 133-136].

DI'nin tiplerinden olan CDI ve NDI arasındaki ayırıcı tanı için, idrarda AQP2 seviyesinin ölçümünün kullanılabileceği belirtilmektedir. AQP2 böbrekte sentezlenmekte ve AVP'ye yanıt olarak idrarla atılmaktadır. AQP2'nin idrarda tespit edilmesinin, hücrede iki mekanizma yoluyla olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan ilki, AVP'nin, böbrek toplama kanalı hücresi içerisindeki AQP2 proteinlerini taşıyan veziküllerin apikal membrana hareketini arttırması ve apikal membranın bir kısmının ekzositoz ile idrara ulaşmasıdır. Diğer öngörülen mekanizma ise, AQP2 proteinlerini taşıyan endositotik veziküllerin doğrudan idrara salınmasıdır. Bu mekanizmalar ile AQP2'nin idrarla atılımındaki artışın, AQP2'nin apikal membrana artan hareketinden dolayı olduğu, bunun da AVP tarafından uyarılma sonucu olduğu belirtilmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmada, sağlıklı CDI ve NDI'lı bireylerden dehidratasyon süreci ve DDAVP uygulama sonrası idrar örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerde AQP2'nin idrarla atılımı ve AVP'ye yanıtı ölçülmüştür. Sonuçta, CDI'lı hastalarda dehidratasyon ile idrarda AQP2'nin miktarında herhangi bir artış olmazken, DDAVP'ye yanıt olarak idrarla atılımlarının arttığı gözlenmiştir. Bu da AQP2 ekspresyonunun CDI'lı hastalarda devam ettiğini göstermiştir. Buna karşılık, X'e bağlı veya otozomal NDI'li hastalarda DDAVP'ye yanıt olarak AQP2 miktarında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bu nedenle, DDAVP uygulamasını takiben AQP2 atılımında herhangi bir artışın olmaması, NDI'yi, CDI'dan ayırt etmede yardımcı olabilmektedir [87, 137].

DI'nin ayırıcı tanılarında, CDI'nin tanısı hipotalamus-hipofiz bölgesinin manyetik rezonans görüntülenmesi (MRI) ile de gerçekleştirilmektedir [68]. Bu görüntüleme, sella turcica'nın arka hipofizinde normal olarak saptanan sinyal yoğunluğunun mevcut olup olmadığını belirlemek için yapılmaktadır ve CDI'li hastalarda bu sinyal

genellikle ya küçüktür ya da bulunmamaktadır. Sinyal yoğunluğu görüntüleme sonucunda arka hipofizde parlak noktalar şeklinde görünmektedir ve parlak noktalar bu bölgede salgı vezikülleri içerisinde depolanan AVP içeriğini yansıtmaktadır. Dolayısıyla AVP hormonu eksikliği sonucu oluşan CDI'da parlak noktaların az olması ya da olmaması normaldir. Primer polidipsi hastaların MRI görüntülemesinde, sinyal ya normaldir ya da boyut veya yoğunluk bakımından artış göstermektedir. Çünkü primer polidipsi, aşırı sıvı alımı nedeniyle AVP salınımının baskılanmasından kaynaklanmaktadır ve AVP salınımı baskılandığından arka hipofizdeki AVP depoları artmıştır. DI hastalarının MRI görüntülemesinde ise, bazı hastalarda sinyal yoğun (parlak noktalar mevcut) iken, bazı hastalarda sinyal bulunamamıştır (parlak nokta görüntülenememiştir). Bu nedenle MRI'nin tek başına tanı amaçla kullanılmaması, biyokimyasal ve klinik çalışma sonuçları ile desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir [10, 68, 87].

CDI'da karşılaşılan ikinci en yaygın MRI anormalliği, 2-3 mm'den fazla genişlemesi patolojik olarak kabul edilen hipofiz sapının kalınlaşması veya genişlemesidir. Bunun sebebinin, bu bölgede meydana gelen primer veya metastatik tümörlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir. DI'nin tipleri arasındaki ayırıcı tanıda herhangi bir yanlışlık olmaması için, hastaya ait klinik veriler, hasta öyküsü, MRI gibi radyolojik veriler ile biyokimyasal verilerin birlikte kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir [16, 40, 68, 138-141].

2.1.3. Diabetes İnsipidus Tedavisi

Tüm DI tipleri için genel tedavinin amacı, önceden var olan su eksikliklerinin düzeltilmesi ve idrara çıkma yoluyla devam eden aşırı su kaybının azaltılmasını sağlamaktır. Gerekli olan spesifik tedavi, DI'nin tipine ve hastanın klinik durumuna bağlı olarak değişmektedir [29].

2.1.3.1. Gestasyonel DI Tedavisi

DI'nin tiplerinden biri olan gestasyonel DI için mümkün olan en iyi tedavi, burun içi DDAVP uygulamasıdır. Doğal AVP'nin aksine, AVP'nin sentetik bir analogu olan DDAVP, plasenta tarafından üretilen vazopressinaz (aminopeptidaz) enzimi tarafından yıkılmaya dirençlidir [27-28, 142]. Tedaviye genellikle en düşük DDAVP

dozu ile akşamları burun damlası ile başlanması önerilmektedir. Doz daha sonra semptomlara göre ve serum sodyum seviyelerinin düzenli kontrolü altında yavaşça arttırılabilmektedir. Plasental vazopressinaz endojen AVP'yi hızlıca metabolize ettiğinden, gerekli DDAVP dozu hamile olmayan hastalara göre biraz daha yüksek olabilmektedir. Ayrıca, DDAVP'nin vasküler tonu (kan damarının daralma derecesi) üzerindeki sınırlı etkisi nedeniyle preeklampsili kadınlar tarafından da tercih edilmektedir [28-29].

DDAVP anne sütüne çok az miktarda salgılanmaktadır [28]. Çocuğun sindirim sistemi tarafından DDAVP minimal düzeyde emilmekte, sıvı ve elektrolit bozukluklarının gelişimi için çok az risk oluşturmaktadır. Günümüze kadar DDAVP'den kaynaklanan herhangi bir olumsuz maternal veya fetal etki bildirilmemiştir [29]. Bu nedenle, emzirme döneminde DDAVP güvenle verilebilmektedir. Gestasyonel DI'nin tedavisinde, genellikle doğumdan itibaren 4 veya 6 hafta sonra DDAVP uygulamasına son verilmektedir. Çünkü bu süre içerisinde vazopressinazın kandaki seviyesi yok olmakta ve dolayısıyla DI belirtileri kaybolmaktadır. Bununla birlikte, doğumdan sonra kalıcı DI olgularında, DDAVP dozu gebelik öncesi doza indirgenebilmektedir [16-17, 143].

Gestasyonel DI hastalarında ikinci tedavi yöntemi hidroklorotiyaziddir [144]. Fakat hidroklorotiyazidin yenidoğan hipoglisemi ve yenidoğan DI gibi potansiyel komplikasyonları bulunmaktadır. Bu yan etkiler nedeniyle genellikle tercih edilmemektedir [28, 32, 144].

2.1.3.2. Primer Polidipsi Tedavisi

DI tipleri arasında primer polidipsi tedavisi diğerlerine göre farklılık göstermektedir. Çünkü tedavi öncelikle biyolojik ve farmakolojik müdahaleler yerine davranışsal müdahalelere dayanmaktadır [29].

Primer polidipsi tedavisi, hastanın psikolojik profiline ve eşzamanlı hiponatremi olup olmadığına bağlıdır ve çoğu zaman etkili bir tedavi yoktur. Bu durum da hastaları ömürlerinin kısalmasına katkıda bulunabilecek diğer tıbbi komplikasyon riski altında bırakmaktadır [29].

Primer polidipsi tedavisinde farmakoterapi olarak DDAVP uygulaması hastalarda poliüriyi azaltmak için kullanılabilir. Ancak bu tedavi, poliüriyi polidipsiden daha fazla azalttığından, fazla suyun vücutta hızlı bir şekilde tutulmasına ve hiponatremi gelişmesine neden olmaktadır. Sonuçta su zehirlenmesine neden olabileceği için bu tedavi fazla önerilmemektedir [1, 11, 16, 25]. Bununla birlikte, primer polidipsinin alt tiplerinden biri olan dipsojenik DI'li hastaların bazılarında DDAVP uygulaması plazma ozmolalitesini azaltarak tedavide başarılı olmuştur [29]. Klozapin adlı antipsikotik ilaç, sıvı alımını azaltarak su zehirlenmesi riski altında olan hastalarda sodyum seviyelerini normalleştirmektedir. Fakat yan etkilerinden dolayı tercih edilmemektedir [29, 32, 145].

Primer polidipsi tedavisinde davranışsal terapi olarak günlük kilo alımının izlenmesi su zehirlenmesini önleyebilmektedir. Yeni başlayan su zehirlenmesinin (genellikle vücut ağırlığında 5-8 kg artış) varlığını öngören işaretlere dayanarak yaklaşık 1-3 saat kadar kısa süren bir sıvı kısıtlama testi uygulanmaktadır. Primer polidipsili bazı hastalarda ise, tükürük akışını arttırmak ve sıvı alımının artmasına neden olan ağız kuruluğu hissini azaltmak için sert şekerlemeler (limon damlaları gibi) kullanılabilir [29].

2.1.3.3. Nefrojenik Diabetes İnsipidus Tedavisi

Nefrojenik DI'li hastalarda AVP salınımı normal olup, böbreklerinde AVP'ye karşı yetersiz cevap oluşmasından dolayı, tedavide dışarıdan AVP veya DDAVP uygulamasına karşı herhangi bir yanıt alınamamaktadır [16, 32].

Bu hastalığın tiplerinden biri olan edinilmiş NDI için en iyi terapötik yaklaşım, hastalığa neden olan etkenin (lityum vb.) ortadan kaldırılmasıdır [12, 32]. Tiazidler ve amilorid, lityum ile indüklenen NDI tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, böbrek distal tüplerindeki Na kanallarına etki ederek Na'nın geri emilmesini inhibe etmekte ve poliüriyi azaltarak idrar ozmolalitesini arttırmaktadır [32, 146-149]. Fakat bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, tiazidlerle uzun süreli tedavinin böbrek karsinomuna neden olabileceği gösterilmiştir [32, 150]. Bununla birlikte, tedavide indometazin gibi prostaglandin sentaz inhibitörleri de kullanılmaktadır. Indometazin türevi ilaçlar,

hücre içi cAMP seviyesini arttırarak böbrek hücrelerinin apikal membranındaki AQP2 kanallarının artışına neden olmaktadır [32, 151-152]. Bu ilaçların yan etkileri bulunmaktadır ve bunlar genellikle böbrek hasarı ile mide problemleridir [150, 153]. Bu ilaç tedavilerine ek olarak, edinilmiş NDI tedavisinde düşük sodyum diyeti de önerilmektedir. Sodyum kısıtlaması çözünen yükü azaltarak idrar hacmini azaltmaktadır [16, 154]. Bunun dışında, hipokalemi ve hiperkalsemi gibi çeşitli elektrolit bozukluklarının neden olduğu edinilmiş NDI olgularında, plazma kalsiyum veya potasyum seviyelerinin normalleşmesi ile elektrolit dengesi sağlanmakta ve böylece süreç geçici olabilmektedir [29].

Konjenital NDI, *AVPR2* ile *AQP2* genlerinde bulunan mutasyonlar sonucu meydana geldiğinden, tedavisi için mevcut yaklaşımlar genellikle hastalığı iyileştirmek yerine semptomları iyileştirmeye odaklanmaktadır [29, 36]. Bu nedenle tedavinin amacı, poliüriyi azaltmak, yeterli sıvı alımını sağlamak ve tekrarlayan hipernatremik dehidratasyon ataklarını önlemektir. Tedavide, düşük tuz içerikli diyet, yeterli sıvı alımını sağlamak, indometazin gibi prostaglandin sentaz inhibitörleri, tiazidler ile birlikte amilorid kullanımı önerilmektedir [19, 35].

Konjenital NDI için alternatif tedaviler geliştirme amacıyla farklı yaklaşımlar öne sürülmüştür [9, 36, 53, 155-156]. Konjenital NDI olgularının büyük çoğunluğunu oluşturan ve *AVPR2* geninde bulunan mutasyonların neden olduğu X'e bağlı NDI için tedavi yaklaşımları genel olarak 3 gruba ayrılmaktadır [9]. Bunlardan ilki, yanlış katlanarak ER'de takılı kalan *AVPR2*'lerin düzgün katlanmasına yardımcı olarak onların plazma membranına taşınmasının hedeflenmesidir [157-160]. Bu reseptörlerin taşıdıkları yanlış anlamlı mutasyonlar genellikle tam fonksiyon kaybına neden olmayıp, sadece ligand ve/veya G-proteine karşı afinitelerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle reseptörler kurtarıldıktan sonra normal fonksiyonlarını yerine getirebilmektedir. İkinci yaklaşım, ER'de takılı kalan *AVPR2*'lerin doğrudan uyarılmasıdır. Böylece düzgün katlanma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Üçüncü yaklaşım ise, *AVPR2*'yi tamamen atlayarak doğrudan *AQP2*'nin plazma membranına taşınarak buraya yerleşiminin uyarılmasıdır [9, 161-163].

AVPR2 mutasyonlarından en yaygın mutasyon tipi sınıf II mutasyonlarıdır ve reseptörün yanlış katlanarak ER'de takılı kalmasına neden olurlar. ER'de takılı kalan ve fonksiyonel olan bu reseptörlerin uygun katlanmalarının uyarılmasıyla, reseptörlerin ER'den çıkarak plazma membranına gidebileceği ve AVP'nin bağlanması ile normal fonksiyonunu gerçekleştirebileceği önerilmiştir. Bu amaçla küçük, hücre-geçirgen moleküller geliştirilmiştir ve bu moleküller farmakolojik şaperon olarak adlandırılmıştır. Farmakolojik şaperonlar, hedef proteine spesifik olarak bağlanabilmekte ve yanlış katlanmış mutant proteinleri stabilize ederek onların kendine özgü, doğal katlanmasını kolaylaştırmayı hedeflemektedir [36, 163-166].

Konjenital NDI olgularından *AQP2* geninde bulunan mutasyonların neden olduğu otozomal çekinik/baskın NDI olguları için de alternatif tedavi stratejileri önerilmektedir [9]. Bunlardan otozomal çekinik NDI'ye neden olan mutasyonlar, *AQP2*'nin yanlış katlanarak ER'de tutuklanmasına neden olmaktadır. *AVPR2*'de olduğu gibi, bu mutant proteinler de doğal konformasyonlarını almak için yeniden katlandıklarında genellikle fonksiyonlarını korumaktadır. Bu amaçla, doğal *AQP2* katlanmasını yeniden kurabilmelerini sağlayan, böylece ER'de tutulan *AQP2* mutantlarının ER'den çıkarak plazma membranına taşınmasını amaçlayan farmakolojik şaperonların geliştirilmesi gerekmektedir. Bu moleküllerin geliştirilmesi ile otozomal resefif NDI'nin potansiyel tedavisi sağlanmış olacaktır [9, 19]. Otozomal baskın NDI'ye neden olan mutasyonlar ise, proteinin hücre içi trafiğini etkileyerek hücrede apikal membrandan farklı yerlere taşınmasına neden olmaktadır. Otozomal baskın NDI'li hastalarda *AQP2* proteini zaten doğal konformasyonunda olduğu için, diğer NDI tiplerinde olduğu gibi, moleküler şaperonlara dayanan tedavi yaklaşımı uygulanamamaktadır. Bunun yerine, hücre içinde yanlış yönlendirmeye müdahale eden, proteinin normal olarak apikal membrana yeniden hedeflenmesini ve buraya taşınmasını sağlayan terapötikler için araştırma devam etmektedir. Otozomal baskın NDI'li hasta sayısı oldukça düşük olduğundan ve tiazid benzeri diüretiklerle yapılan geleneksel tedavi, semptomları hafifletip hastaları kısmen rahatlatılabildiğinden, bu tip NDI için yapılan araştırma sayısı, diğer alt tiplerden önemli ölçüde daha düşüktür [9, 62].

2.1.3.4. Santral Diabetes İnsipidus Tedavisi

Santral DI, AVP hormonunun yetersiz sentezi ve/veya salınımı ile karakterize bir DI tipi olduğundan, hormon replasman tedavisi bu hastalık için en iyi terapötik yaklaşımdır [32, 67, 167]. Bu amaçla, kas içinden verilen ve saflaştırılmış AVP formu olan pitressin onlarca yıl boyunca CDI için başlıca tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır [24, 32, 168-169]. Bu ilacın terapötik etkisi sadece birkaç saat sürdüğü için ve hipertansiyon, abdominal kramp, ishal, baş ağrısı, çarpıntı gibi çeşitli yan etkilerinden dolayı kullanılmamaktadır [32, 170]. Bunun yerine peptit sentezi için gelişen yeni yöntemler sayesinde azalmış yan etki ve gelişmiş fizyolojik etkileri ile birçok hormon analogunun sentezi sağlanmıştır. AVP hormonunun da sentetik bir analogu üretilmiş ve desmopressin (DDAVP) şeklinde isimlendirilmiştir. DDAVP sahip olduğu özellikler bakımından, sentezinden bu yana CDI tedavisine büyük katkı sağlamaktadır. DDAVP, daha etkili ve uzun süren bir antidiüretik etkiye sahiptir. Endojen AVP'nin 5-10 dakika olan yarı ömrü, DDAVP'de sisteinin amino grubunun çıkarılması ile 3,5 saate kadar uzamaktadır [68, 87]. Ayrıca yan etkileri azdır ve vazopressinaza karşı daha dirençlidir [24, 171-176]. DDAVP ağızdan (tablet), burun içi (damla veya sprey) veya parenteral (enjeksiyon) olarak uygulanabilmektedir. Burun içi veya ağız yoluyla alındığında maksimum plazma konsantrasyonlarına 40-55 dakikada ulaşmaktadır. Genellikle idrar çıkışı DDAVP uygulamasından 1-2 saat sonra azalmakta ve ilacın etki süresi 6-18 saat arasında değişmektedir. Diürez kontrolü için gereken dozajda geniş bireysel varyasyon bulunmaktadır [87, 177]. Bu nedenle her hasta için uygun doz bireysel olarak belirlenmelidir ve hastalar arasındaki tedaviye yanıtlardaki değişiklik sebebiyle uygun doz aralıkları da yine bireysel olarak belirlenmelidir [29]. Tedaviye düşük doz ile başlamanın güvenli olduğu unutulmamalı ve gerekirse doz artırılmalıdır [87, 177].

DDAVP, uzun süre ve aşırı miktarda uygulandığında hiponatremiye neden olmaktadır [68]. Bununla birlikte, hiponatremi başlangıçta spesifik semptomlara neden olmamaktadır ve sürekli antidiürez sırasında sıvı alımı devam ettiği takdirde hızla daha semptomatik seviyelere ilerleyebilmektedir. Hiponatremi semptomları arasında baş ağrısı, bulantı, kusma ve nöbet bulunmaktadır. Tedavi edilmezse, bu belirtiler komaya ve ölüme yol açabilmektedir [87]. Bu nedenle CDI tedavisi, aşırı DDAVP uygulaması sonucu ciddi hiponatremi riskine yol açmadan poliüri ve

polidipsiyi en aza indirecek şekilde tasarlanmalıdır. Buna ek olarak, DDAVP tedavisinden kaynaklanan ciddi hiponatremi, tedavinin başlaması sırasında serum elektrolit seviyelerinin sık sık izlenmesi ile önlenmektedir. Tedavi sırasında düşük serum sodyum konsantrasyonu geliştiren ve sıvı alımında önerilen azalmaya cevap vermeyen hastalarda, poliüre tekrarlanana kadar planlanan bir desmopresin dozu haftada bir veya iki kez geciktirilmekte ve böylece fazla tutulan sıvının atılmasına izin verilmektedir. Desmopresin kaynaklı hiponatremi genellikle kronik (>48 saat) olduğundan, serum sodyum seviyelerinin düzeltilmesi çok hızlı gerçekleştiğinde ortaya çıkan motor nöronların demiyelinizan bir hastalığı olan ozmotik demiyelinizasyon sendromundan (ODS) kaçınmak için bu hastaların akut tedavisine özen gösterilmelidir. Bu nedenle kontrollü bir oranda hipertonic (%3) NaCl kullanılarak hiponatremi düzeltilirken, DDAVP uygulamasına devam etmek de önerilmektedir [29, 177-181].

CDI sıklıkla hipotalamusun suprasellar bölgesinde yapılan ameliyattan sonra meydana gelmektedir [182]. Bununla birlikte, kardiyopulmoner baypas, böbrek nakli ile intrakraniyal (kafa içi) komplikasyonlarla ilişkili sinüs ve burun ameliyatlarından sonra gelişen CDI olgu raporları da bulunmaktadır [183-188]. CDI tanısı doğrulandıktan sonra, en iyi farmakolojik tedavi DDAVP'dir. Ameliyat sonrası olarak, DDAVP parenteral olarak (deri altı, kas içi veya damar içi olarak) uygulanabilmektedir. Emilim konusundaki endişeleri engellediğinden, damar içi uygulama genellikle tercih edilmektedir [34, 189]. Bununla birlikte, hasta bilinç kaybının azalması veya hipotalamik susuzluk merkezine zarar gelmesi nedeniyle susuzluğa cevap veremezse, sıvı dengesi intravenöz sıvılar kullanılarak sağlanmaktadır. DDAVP dozunun etkili olup olmadığını belirlemek için idrar ozmolalitesi ile hacmi izlenmekte ve hipernatremide iyileşmeyi sağlamak için serum sodyum konsantrasyonu sık sık (her 4-6 saatte bir) ölçülmektedir. İdrar ozmolalitesi, hacmi ve serum sodyum konsantrasyonu, tedavinin başlangıcı sırasında her 4-6 saatte bir ve daha sonra stabilizasyon sağlanana veya DI düzelene kadar günlük olarak kontrol edilmektedir. AVP veya DDAVP'nin sürekli uygulanması sırasında aşırı su verilmesi potansiyel olarak hiponatremiye neden olabileceğinden, su replasmanı hacmi konusunda dikkatli olunmalıdır. Ek doz DDAVP uygulanmadan önce poliüri geri dönüşüne izin verilmesi tavsiye edilmektedir, çünkü postoperatif DI

genellikle geçicidir ve endojen AVP sekresyonunun geri dönüşü, poliürinin geri dönüşü olmadığına belirgin hale gelmektedir [29, 68].

Ozmoresseptör hasarı veya fonksiyon bozukluğu sonucu ortaya çıkan CDI'li hastaların susama mekanizması aktif olmadığından, bu hastalar kendiliğinden su içmemektedir. Bu nedenle bu hastalara günlük sıvı alımı programı oluşturulmaktadır. Hastanın poliüri şikayeti de varsa, DDAVP reçete edilmektedir. Günlük sıvı alımı programının etkili olup olmadığı, hastanın serum sodyum konsantrasyonu ölçülerek periyodik olarak (hastanın ilk stabilitesine bağlı olarak her hafta, daha sonra her ay) izlenmektedir [29].

Pediyatrik hastalarda CDI'nin farmakolojik tedavisi yetişkinlerdekine benzemektedir. Sadece çok küçük hastalarda DDAVP'nin ağızdan veya burun içi uygulaması biraz daha zor olabilmektedir. Bu nedenle bu hastalarda tedavi bir süre boyunca parentel (deri altı) olarak uygulanmaktadır [29].

CDI'nin tedavisi için, DDAVP'den başka kullanılan ilaçlar da bulunmaktadır. Bunlar karbamazepin, klorpropamid, klofibrat ve tiazid diüretikleridir. Bu ilaçlar, antidiüretik etkiye sahiptir, CDI'li olgularda idrar hacmini azaltıp, idrar ozmolalitesini arttırmaktadır [17, 67, 72]. Karbamazepin'in etkisini hipofiz bezinden AVP salınımını uyarma yoluyla gösterdiği ve uzun süreli kullanımının hiponatremiye yol açtığı bildirilmiştir [67, 190-191]. Klorpropamid'in antidiüretik etkisini, AVP'nin nörohipofizyal salgısını artırarak veya CDI'li olguda çok az olan AVP etkisini güçlendirerek gösterebileceği belirtilmektedir [67, 192-193]. Klofibrat da CDI'li hastalarda AVP üretimini uyaran bir ilaçtır [72, 194]. Tiazid diüretikleri etkilerini distal tübüldeki sodyum ve klorür emilimini azaltarak, böylece proksimal tübülde daha fazla sodyum emilimine ve dolayısıyla su emilimine izin vererek göstermektedirler. Bu ilaçlardan herhangi biri ile tedaviye başlandığı takdirde, tedavinin etkinliğini izlemek önemlidir. Bu amaçla, idrar hacmi ile yoğunluğu ve hastanın elektrolit değerleri sürekli takip edilmelidir. İlacın etkisinin hastadan hastaya önemli ölçüde değişebileceği unutulmamalıdır [17, 72].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışmasının amacı, DI hastalığı ile ilişkili genlerden biri olan, *AVP-NP11* geninde grubumuz tarafından yapılan çalışmalar ile literatüre kazandırılan G45C ve 207_209delGGC mutasyonları [84, 88] ile Melo ve ark. tarafından tanımlanmış [195] ve grubumuz tarafından da tespit edilen G88V mutasyonunun [107] fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesidir. Tez çalışmasında bu mutasyonların, AVP proteinin yapısını fonksiyonel olarak ne şekilde etkilediğinin moleküler düzeyde belirlenmesi ve hastalığın seyrine olan etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

AVP-NP11 geninde belirlenen mutasyonların fonksiyonel analizleri kapsamında, mutasyonların AVP salınmasında önemli olup olmadığının belirlenmesi için, yabancı tip ve mutant *AVP-NP11*'nin ifadesi sağlanan Neuro2A hücrelerindeki AVP salınımları ELISA ve RIA olmak üzere iki ayrı yöntem ile tespit edilmiştir. Ayrıca yabancı tip ve mutant *AVP-NP11* prohormonları ve bunların işlenmiş ürünlerinin hücre içindeki trafiğinin belirlenip karşılaştırılabilmesi için hücreler floresan görüntüleme çalışmaları ile incelenmiştir.

Her üç mutasyona ait fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalar sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- 1) *AVP-NP11* genini taşıyan ifade vektörünün temin edilmesi
- 2) Bölgeye yönelik (Site-directed) mutagenез yöntemi kullanılarak oluşturulan mutant *AVP-NP11* gen dizilerini içeren uygun ifade vektörlerinin hazırlanması
- 3) Oluşturulan mutant *AVP-NP11* dizilerinin DNA dizi analizi yöntemi ile doğrulanması
- 4) Yabancı tip ve mutant *AVP-NP11* gen dizilerini içeren vektörlerin Neuro2A hücrelerine transfeksiyonu
- 5) Neuro2A hücrelerinden total protein izolasyonu
- 6) Örneklere ait izole edilen total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi
- 7) Hücre kültürü süpernatantlarında AVP düzeylerinin RIA ve ELISA yöntemleri ile belirlenmesi
- 8) Neuro2A hücrelerinin floresan görüntüleme çalışmaları

3.1. Fonksiyonel Analiz Çalışmaları Gerçekleştirilecek olan Mutasyonların Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında incelenen mutasyonlar, grubumuzca yapılan daha önceki çalışmalar ile tespit edilmiştir. DI hastalığına neden olan moleküler patolojilerin belirlenmesi amacıyla 2010 yılında grubumuzca başlatılan ve halen devam eden çalışmalarda, günümüze kadar santral veya nefrojenik DI tanısı konmuş 84 hastanın *AVP-NP11*, *AVPR2* ve *AQP2* genleri DNA dizi analizi yöntemi ile taranmış ve bu genlerde bulunan mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan *AVP-NP11* geninde bulunan ve daha önce fonksiyonel analiz çalışmaları literatürde yer almayan G45C, 207_209delGGC ve G88V mutasyonlarına ait çalışmalar, TÜBİTAK tarafından desteklenen SBAG 115S499 numaralı araştırma projesi ile bu doktora tezi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında fonksiyonel analizleri gerçekleştirilecek olan mutasyonların tespit edildiği DI'lı hastalar, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Kliniğine 2010-2015 yılları arasında başvuran bireylerden oluşmaktadır. Hastaların çok su içme ve sık idrara çıkma gibi şikâyetleri üzerine rutin taramaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan testler sonucunda hastaların idrar hacminin fazla olduğu, plazma ve idrar ozmolaliteilerinin düşük olduğu belirlenmiş ve sonuçta hastalara DI tanısı konulmuştur. DI tanısı konulduktan sonra hastaların kanları alınmış ve kanlarından fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'ların dizi analizi Sanger yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve *AVP-NP11* genindeki mutasyonlar tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalar ile bu şekilde tespit edilen mutasyonlardan, tez kapsamında fonksiyonel analizleri gerçekleştirilen mutasyonlara ait özellikler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

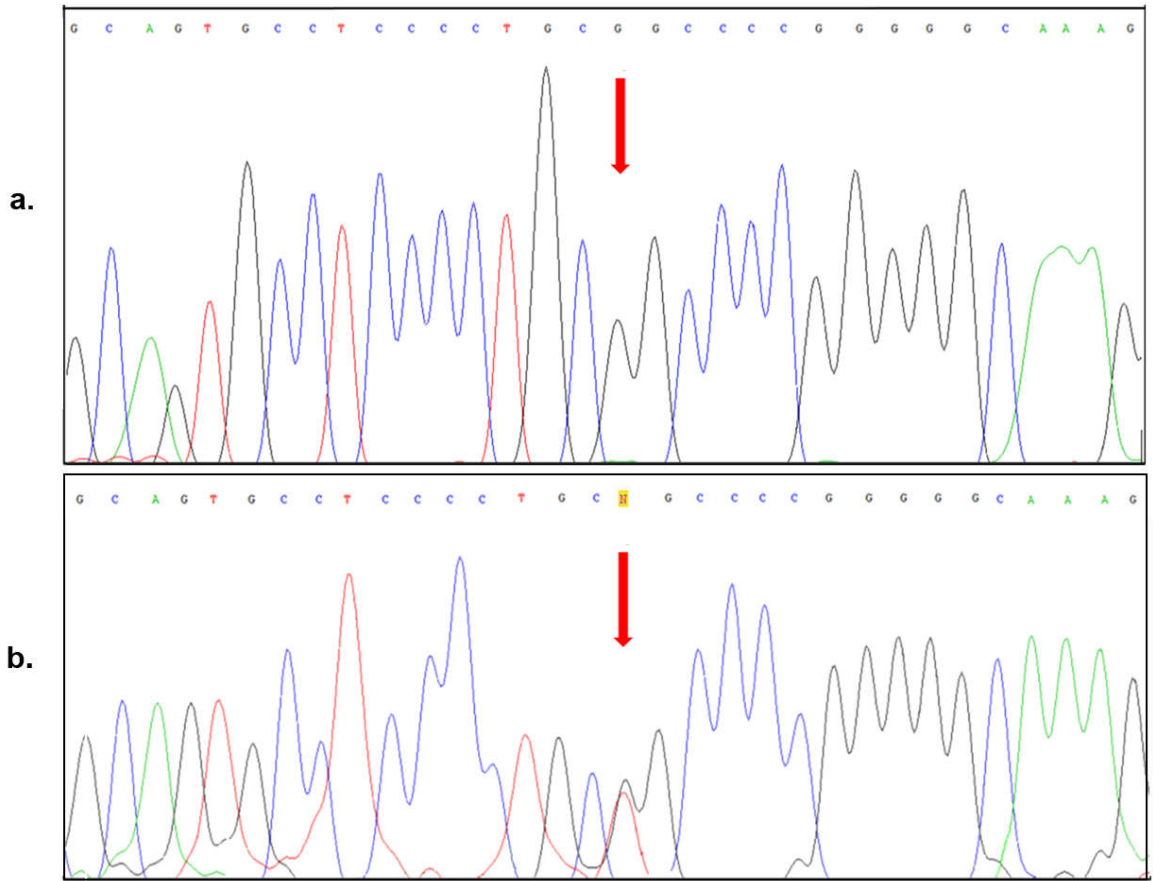
Çizelge 3. 1. Fonksiyonel analizi gerçekleştirilecek olan mutasyonlar.

Hasta	Tanı	Gen	Ekzon	İsim	Mutasyon	Kodon Numarası	Amino asit Değişimi
1.	Santral	<i>AVP-NP11</i>	2	G45C	GGC→TGC	45. Kodon	Gly→Cys (heterozigot)
2.	Santral	<i>AVP-NP11</i>	2	207_209delGGC	3 bç delesyon	69-70. Kodon	Thr-Ala kodonları delesyon
3.	Santral	<i>AVP-NP11</i>	2	G88V	GGC→GTC	88. Kodon	Gly→Val (heterozigot)

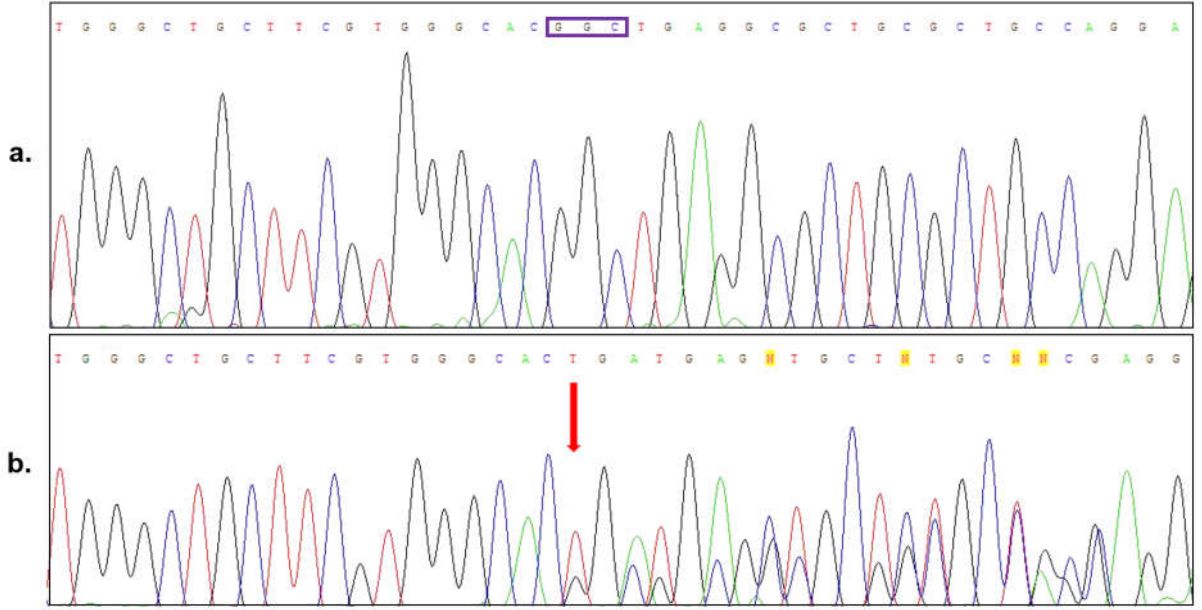
Tez çalışması kapsamındaki mutasyonlara sahip hastaların klinik özellikleri Çizelge 3.2'deki gibidir. Hastaların DNA dizi analizi sonucu elde edilen kromatogram görüntüleri ise Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Hastaların klinik özellikleri

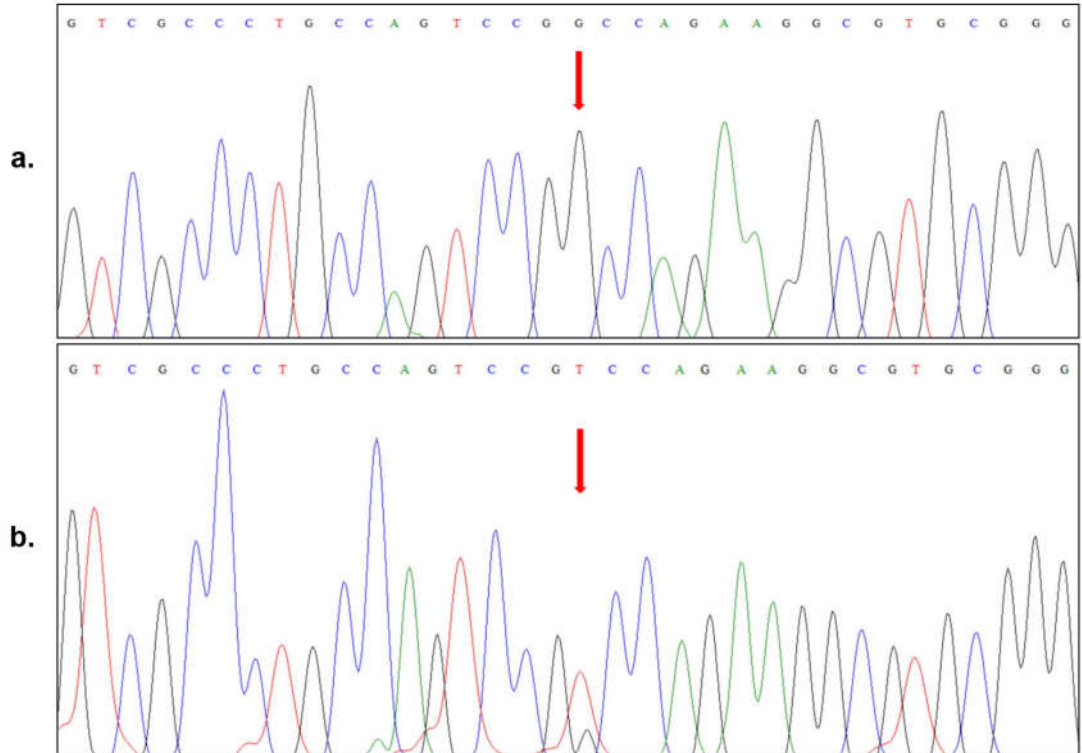
Mutasyon	Cinsiyet	Yaş	İdrar Ozmolalitesi (mOsm/kg H ₂ O)	Plazma Ozmolalitesi (mOsm/ kg H ₂ O)	İdrar Hacmi (L/gün)
G45C	Kadın	7	72	303	5
207_209delGGC	Erkek	23	85	292	20
G88V	Erkek	19	121	300	6.4



Şekil 3. 1. G45C mutasyonu (GGC→TGC) için hastanın DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü. a. Sağlıklı bireylerdeki DNA dizisi, b. Hastaya ait mutant dizi. Dizide mutasyonun yeri kırmızı ok ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. 207_209delGGC mutasyonu için hastanın DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü. a. Sağlıklı bireylerdeki DNA dizisi, b. Hastaya ait mutant dizi. 3 baz çiftlik delesyon (GGC) mor renkli kutu içerisinde gösterilmiştir. Delesyonun başladığı bölge ise kırmızı ok ile belirtilmiştir.



Şekil 3. 3. G88V mutasyonu (GGC→GTC) için hastanın DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü. a. Sağlıklı bireylerdeki DNA dizisi, b. Hastaya ait mutant dizi. Dizide mutasyonun yeri kırmızı ok ile gösterilmiştir.

3.2. AVP-NPII Genini Taşıyan İfade Vektörünün Temin Edilmesi

Yabancı tip *AVP-NPII* genini taşıyan hAVP-pL (pL_AVP_WT) ifade (ekspresyon) vektörü Sentegen firmasından temin edilmiştir.

Yabancı tip *AVP-NPII* dizisinin ilgili vektördeki yerleşiminin doğruluğunun belirlenmesi için, ilgili plazmid ilk olarak *E. coli* (DH5 α) hücrelerine transforme edilmiş ve sonrasında bakteriler ampisilinli LB agar plaklarına ekilmiştir. hAVP-pL vektöründe seçici olarak ampisiline direnç geni bulunduğundan dolayı, LB agar plakları hazırlanırken 75 mg/ml konsantrasyonda ampisilin eklenmiştir.

Transformasyon için kullanılan yöntem aşağıda belirtildiği gibidir;

- 1) Transforme edilmek istenen plazmid DNA'sından 1 μ l (1 μ g/ μ l) alınmış, 100 μ l kompetan hücreye (*E. coli*) eklenerek iyice pipetlenmiştir.
- 2) Hazırlanan karışım buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) 42°C'de 45 saniye inkübe edilmiştir.
- 4) Örnek tekrar buz üzerine alınarak 1-2 dakika inkübe edilmiştir.
- 5) Örneğin tamamı 250 μ l SOC medium içine eklenmiş ve 1 saat boyunca 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.
- 6) İnkübasyon sonrası ampisilinli LB agar plağına ekim yapılmış ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Bu aşamayı takiben ampisilinli LB agar plağında üreyen bakterilerden tek bir koloni alınarak 2 ml'lik ampisilinli LB broth besiyerinde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Plazmid DNA izolasyon protokolü aşağıda belirtildiği gibidir;

- 1) 1-10 ml'lik gecelik bakteri kültürü 5 dakika boyunca yüksek hızda santrifüj edilerek çöktürülmüştür.
- 2) Santrifüj sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve bakteri peleti 250 µl Hücre Resspansiyon Solüsyonu ile resüspanse edilmiştir.
- 3) zerine 250 µl Hücre Lizis Solüsyonu eklenmiş ve tüpler 4 kez alt üst edilerek iyice karıştırılmıştır.
- 4) 10 µl Alkalın Proteaz Solüsyonu eklenmiş ve tüpler tekrar 4 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Ardından tüpler 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 5) 350 µl Nötralizasyon Solüsyonu eklenmiş ve tüpler 4 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- 6) Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca en yüksek hızda (13.000 rpm) santrifüj işlemi gerekleştirilmifitir.
- 7) Santrifüj sırasında bir taraftan spin kolonları toplama tüplerine yerleştirilmifitir.
- 8) Santrifüj sonrasında elde edilen saydam lizat (süpernatant) hazırlanan spin kolonlara aktarılmıştır.
- 9) En yüksek hızda (13.000 rpm) oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- 10) 750 µl Yıkama Solüsyonu (etanol eklenmiş) eklenmiştir. Bir dakika boyunca en yüksek hızda santrifüj edilmiş ve altta kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- 11) 10. basamak 250 µl Yıkama Solüsyonu kullanılarak tekrar edilmiştir.
- 12) Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca en yüksek hızda (13.000 rpm) santrifüj edilmiş ve etanolün iyice uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- 13) Spin kolonları 1.5 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır.
- 14) 50 µl Nükleaz içermeyen H₂O spin kolonun tam üzerine konulmuş ve 1 dakika boyunca oda ısısında en yüksek hızda santrifüj edilmiştir.
- 15) Kolon çıkartılmış ve elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

Yöntem sonunda izole edilen plazmid DNA'sı agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilen plazmid DNA'ların içerisinde bulunan yabancı tip *AVP-NP11* gen dizilimi Sanger ve Next generation (hizmet alımı) DNA dizileme yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır.

3.3. Bölgeye Yönelik Mutagenез Yöntemi Kullanılarak Oluşturulan Mutant *AVP-NP11* Gen Dizilerini İçeren Uygun İfade Vektörlerinin Hazırlanması

Bölgeye yönelik mutagenез yöntemi, herhangi bir DNA dizisinde istenen mutasyonu oluşturmak için mutasyona özgü mismatch primerlerin kullanıldığı, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli moleküler biyolojik bir yöntemdir [196]. Bu amaçla ilk olarak mutant *AVP-NP11* gen dizilerini oluşturmak için, mutasyonun yer aldığı bölgeyi içine alacak şekilde, mutant nükleotidi içeren ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.

AVP-NP11 geninde bölgeye yönelik mutagenез yöntemi ile oluşturulacak olan G45C, 207_209delGGC ve G88V mutasyonları için tasarlanan primer dizileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Mutant *AVP-NP11* dizilerinin oluşturulması sırasında kullanılan primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi
hAVP_pL_XhoI_overlap forward (Dış F)	5'-AAAAAGCTCCTCGAGGAACTGAAAAACCAG-3'
hAVP_pL_SpeI_overlap reverse (Dış R)	5'-GAAACGCGCGAGGCAGCGGATCATAATCAG-3'
G45C F	5'-TGCCTCCCCTGcTgCCCCGGGGGCAAAG-3'
G45C R	5'-CTTTGCCCCCGGGGCaGCAGGGGAGGCA-3'
207_209delGGC F	5'-TGCTTCGTGGGCAC---TGAGGCGCTGCGC-3'
207_209delGGC R	5'-GCGCAGCGCCTCA---GTGCCACGAAGCA-3'
G88V F	5'-CCCTGCCAGTCCGtCCAGAAGGCGTGC-3'
G88V R	5'-GCACGCCTTCTGGaCGGACTGGCAGGG-3'

Ayrıca hAVP-pL vektöründe oluşturulan mutant dizilerin doğrulanması aşamasında kullanılmak üzere aşağıdaki şekilde sekans primerleri dizayn edilmiştir.

hAVP_pL_sekans_forward: 5'-AAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTG-3'

hAVP_pL_sekans_reverse: 5'-AGCTAATAATGGATAAAGCAATAGC-3'

AVP-NP11 geninde bölgeye yönelik mutagenез yöntemi ile oluşturulacak olan G45C, 207_209delGGC ve G88V mutasyonları için tasarlanan primerlerin gen dizisi üzerindeki yerleşimleri Şekil 3.4'te verilmiştir. Tasarlanan tüm primerlerin ilgili vektör üzerindeki yerleşimleri ise Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

AVP-NPII EKZON 1 (170 bç)

.....tccacgggaacacactgCGGacataaataggcagccagcagaggcagcagc
ACAGAGCCACCAAGCAGTGCTGCATACGGGGTCCACCTGTGTGCACCAGG**ATGCCTGACA**
CCATGCTGCCCGCTGCTTCCTCGGCCTACTGGCCTTCTCCTCCGCGTGCTACTTCCAGA
ACTGCCCGAGGGGCGGCAAGAGGGCCATGTCCGACCTGGAGCTGAGACAG
gtacttcccactgtggggccatctcagggctgccatagcgggagtgctgacaccctgggt
caggggctaggaaagagggaaagtcaggggtggtagcc.....

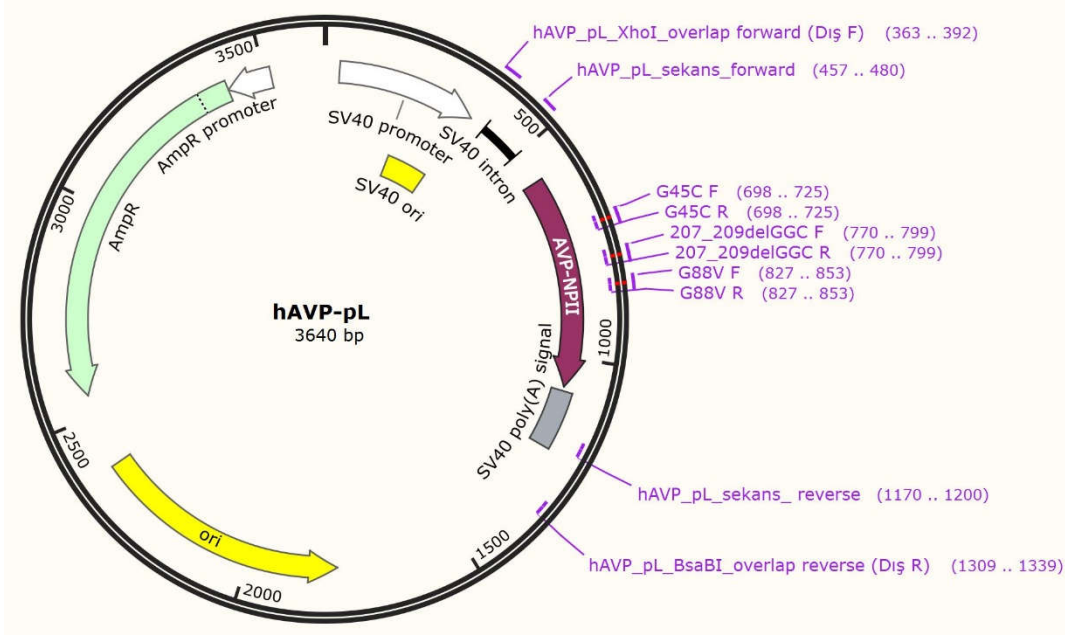
AVP-NPII EKZON 2 (202 bç)

.....ctccgagccctggaccccagcatccccgcctcgctgcgtt
ccccccaaccctcgactccggctccccctcccgctcaccgccccgctccccgcag
TGCCTCCCCTGCGGCCCCGGGGGCAAAGGCCGCTGCTTCGGGCCAGCATCTGCTGCGCG
GACGAGCTGGGCTGCTTCGTGGGCACGGCTGAGGCGCTGCGCTGCCAGGAGGAGAACTAC
CTGCCGTCGCCCTGCCAGTCCGGCCAGAAGGCGTGCGGGAGCGGGGGCCGCTGCGCCGCC
TTCGGCGTTTGCTGCAACGACG
gtgCGcgggcgggggcgggcctggggctggggggggcgagaccgcttgggtgggggggac
gCGggcctgCGgCGgggtggggctgCGtcgggcccggcagggaggggtgtgggcccccg

AVP-NPII EKZON 3 (247 bç)

caccgagctgCGcccgcaccagggcgcccgtgctcacacgtcctcccggcag
AGAGCTGCGTGACCGAGCCCGAGTGCCGCGAGGGCTTTCACCGCCGCGCCCGCCAGCG
ACCGGAGCAACGCCACGCAGCTGGACGGGCGGCCGGGGCCTTGCTGCTGCGGCTGGTGC
AGCTGGCCGGGGCGCCCGAGCCCTTCGAGCCCGCCAGCCCGACGCCTACTGAGCCCCGC
GCTCGCCCCACCGGCGCGCTCTTCGCGCCCGCCCTGCAGCACGGACAATAAACCTCCGC
CAATGCA
cggcctcgctctgtctcagtctctgCGggaagagggaaagggagagag.....

Şekil 3.4. Her üç mutasyon için tasarlanan primerlerin *AVP-NPII* gen dizisi üzerindeki yerleşimleri. İşaretli bölgeler sırasıyla G45C (GGC→TGC), 207_209delGGC ve G88V (GGC→GTC) mutasyonlarını işaret etmektedir. *AVP-NPII* gen dizisinin başlangıç ve bitiş kodonları kırmızı renk ile, intronik bağlantı dizileri mavi renk ile gösterilmiştir. [197] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 3. 5. hAVP-pL haritası ve tasarlanan primerlerin harita üzerinde gösterimi.

Mutant bir *AVP-NPII* gen bölgesi elde etmek için; *AVP-NPII* geninin 5' ucunda yer alan ileri primer (hAVP_pL_XhoI_overlap forward-Dış F) ile ilgili mutasyonu içine alan geri primer reaksiyona alınmıştır. Aynı şekilde, ilgili mutasyonu içine alan ileri primer ile *AVP-NPII* geninin 3' ucunda yer alan geri primer ile de (hAVP_pL_SpeI_overlap reverse-Dış R) ayrı bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Böylece, mutasyonun olduğu noktayı içeren 5' bölge ve 3' bölge ayrı ayrı elde edilmiştir (iki bölge birleştirildiğinde tam bir *AVP-NPII* geni oluşturmaktadır).

Her iki bölge için gerçekleştirilen bölgeye yönelik mutagenез işlemleri sonucunda elde edilen bant büyüklüklerine ilişkin bilgi Çizelge 3.4'te ve her bir primer çifti için gerçekleştirilen PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenlere ilişkin bilgi Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3. 4. *AVP-NP11* geni için bölgeye yönelik mutagenез işlemleri sonucunda elde edilen bant büyüklükleri

	G45C F	G45C R	207_209delGGC F	207_209delGGC R	G88V F	G88V R
hAVP_pL_XhoI_ overlap forward (Dış F)	-	390 bç	-	464 bç	-	518 bç
hAVP_pL_SpeI_ overlap reverse (Dış R)	659 bç	-	587 bç	-	530 bç	-

Çizelge 3. 5. S Bölgeye yönelik mutagenез işlemleri için gerçekleştirilen PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Kalıp DNA (yabanıl tip <i>AVP-NP11</i> geni içeren plazmid DNA)	2 µl
10X PZR Tamponu	5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	2 µl
İlgili mutasyonun dış forward primeri, ilgili mutasyonun dış reverse primeri (10 pmol/µl)	1.0 µl
İlgili mutasyonun reverse primeri, ilgili mutasyonun forward primeri (10 pmol/µl)	1.0 µl
DMSO (%100)	5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Steril distile H ₂ O	33.5 µl
Toplam Hacim	50 µl

PZR aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir:

96 °C 3'	1 döngü
94 °C 45 "	34 döngü
60 °C 1'	
72 °C 1'	
72 °C 10'	1 döngü
10 °C ∞	

PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülüp doğrulandıktan sonra ilgili gende oluşturulan mutant bölgeyi içeren 5' ve 3' fragmentleri Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kiti kullanılarak jelden saflaştırılmıştır. Böylece birleştirme reaksiyonunda kullanılacak olan PZR ürünü 1 ve PZR ürünü 2 (kısa PZR ürünleri) elde edilmiştir.

Daha sonra, mutant nükleotidi içeren *AVP-NP11* gen bölgesinin tamamını oluşturmak için, her iki PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak, *AVP-NP11* geninin 5' ucunda yer alan ileri primer ve genin 3' ucunda yer alan geri primer Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) ile reaksiyona alınmıştır. Reaksiyon koşulları ve bileşenlerine ilişkin bilgi (Çizelge 3.6) aşağıda verilmiştir.

PZR aşağıda belirtilen koşullarda yapılmıştır.

98 °C 30''	1 döngü
98°C 10''	34 döngü
60 °C 30''	
72 °C 1'	
72 °C 10'	1 döngü
10 °C ∞	

Çizelge 3. 6. *AVP-NP11* geninde bölgeye yönelik mutagenез işlemleri için gerçekleştirilen PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
2X Phusion High-Fidelity Master Mix	25 µl
İlgili genin vektörü üzerinde belirlenen dış forward primer (10 pmol/µl)	1.0 µl
İlgili genin vektörü üzerinde belirlenen dış reverse primer (10 pmol/µl)	1.0 µl
DMSO (%100)	1.5 µl
PZR ürünü 1	2 µl
PZR ürünü 2	2 µl
Steril distile H ₂ O	17.5 µl
Toplam Hacim	50 µl

Reaksiyon sonucu elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulanmıştır.

Agaroz jelde yürütülerek doğrulananan PZR ürünleri (oluşturulan mutant diziyi içeren *AVP-NP11* ürünleri), Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kiti kullanılarak jelden saflaştırılmıştır. Uygulanan kit protokolü aşağıdaki gibidir.

- 1) İstenilen ürünü içeren bant bölgesi agaroz jelden kesilerek ayrılmış ve 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur.
- 2) Her 10 mg jel parçasına 10 µl Membran Bağlama Solüsyonu eklenmiş ve 50-60°C'de jel tamamen eriyene kadar vortekslenerek inkübe edilmiştir.
- 3) SV Minikolonlar toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
- 4) Erimiş olan jel kolona aktarılmış ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 5) 13.000 rpm'de 1.5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda tüpte altta kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- 6) Kolon üzerine 700 µl Membran Yıkama Solüsyonu (etanol eklenen) eklenmiştir. 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş, santrifüj sonunda altta kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- 7) basamak 500 µl Membran Yıkama Solüsyonu ile tekrar edilmiş, ardından 13.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- 8) Santrifüj işlemi sonunda altta kalan kısım uzaklaştırılmış ve tüpler bir kez daha 1 dakika boyunca yüksek hızda santrifüj edilmiştir.
- 9) Minikolonlar dikkatli bir şekilde temiz 1.5 ml'lik tüplere aktarılmış ve kolon üzerine 50 µl nükleaz içermeyen H₂O konulmuştur. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiş ve 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 10) Minikolon çıkarılarak uzaklaştırılmış ve elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen mutant *AVP-NP11* dizileri, hAVP-pL vektörü içerisine *XhoI* ve *SpeI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak aktarılmıştır. Hem hAVP-pL vektörü hem de mutant PZR ürünlerinin bu enzimler ile kesim reaksiyonları aşağıdaki gibi hazırlanmış ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

	<u>Vektör (µl)</u>	<u>Mutant PZR ürünü (µl)</u>
DNA	43	7
10X Cut Smart Tampon (NEB®)	5	5
5U/µl <i>Xho</i> I (NEB®)	1	1
5U/µl <i>Spe</i> I (NEB®)	1	1
1U/µl FAST Alkalın Fosfataz (Thermo Fisher Scientific)	-	1
H ₂ O	-	35
Toplam Hacim	50	50

Kesim işleminin ardından kesim ürünlerinin 80°C'de 20 dakika inkübasyonu ile enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulandıktan sonra Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kiti kullanılarak jelden saflaştırılmıştır. Vektör ile her bir mutanta ait kesilmiş PZR ürünü (insert) aşağıda belirtildiği şekilde ligasyon reaksiyonuna alınmıştır. Ligasyon işlemi, 15-20 dakika boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

10X T4 DNA Ligaz Tampon (Thermo Fisher Scientific)	2 µl
5U/µl T4 DNA Ligaz (Thermo Fisher Scientific)	1 µl
Vektör (hAVP-pL vektör kesim ürünü)	1 µl
İnsert (Kesilmiş mutant PZR ürünü)	16 µl
Toplam Hacim	20 µl

Ligasyon işleminin ardından her bir örnek bakteri hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon için kullanılan yöntem, "AVP-NP11 genini taşıyan ifade vektörünün temin edilmesi" başlığında yer alan transformasyon yöntemi ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Oluşturulan Mutant AVP-NP11 Gen Dizilerinin DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Doğrulanması

Mutant AVP-NP11 dizilerinin doğrulanması için, transformasyon sonrası ampisilinli LB agar plaklarında üreyen bakteri kolonilerinden 5 tane seçilip 100 µl ampisilinli LB sıvı besiyeri içerisinde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası, bakterilerin mutant *AVP-NP11* dizisi içeren hAVP-pL vektörünü taşıyıp taşımadıklarını anlamak için koloni PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA kalıbı olarak 2 µl bakteri kültürü alınmış, bakterilerdeki vektörün *AVP-NP11* dizisini taşıyıp taşımadığını anlamak için gen bölgesinin içinde yer alan bir primer çifti seçilmiştir.

PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyon boyutu doğrulandıktan sonra uygun bakteri kültüründen 2 ml'lik gecelik kültür hazırlanmıştır. Ertesi gün bu bakterilerden kit ile plazmid DNA'sı izole edilmiş ve PZR ile tüm *AVP-NP11* dizisi yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jelde kontrol edildikten sonra DNA dizileme öncesi gerçekleştirilen PZR pürifikasyonu (PZR ürününün temizlenmesi) aşaması için Çizelge 3.7'de verilen reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3. 7. PZR ürününün temizlenme basamağını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
PZR ürünü	4 µl
Ekzonükleaz I USB® (10 U/µl)	0,4 µl
Shrimp Alkalen Fosfatase USB® (2 U/µl)	0,4 µl
Toplam hacim	4,8 µl

Tüp içerikleri Çizelge 3.7'de belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra PZR cihazında aşağıdaki program 1 döngü olarak şekilde uygulanmıştır.

37 °C 20 dakika

80 °C 20 dakika

95 °C 2 dakika

Örnekler işlemin ardından -20°C 'de saklanmıştır.

Plazmid DNA'ları içerisinde oluşturulan mutant tip *AVP-NP11* gen diziliminin DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulanması için, izole edilerek PZR reaksiyonu ile çoğaltılan ve ardından temizlenen örnekler DNA dizileme reaksiyonuna alınmıştır. DNA dizileme reaksiyonu için BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Dizi analizi reaksiyon bileşenleri ve koşulları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3. 8. Temizlenmiş PZR ürünlerinin DNA dizileme reaksiyonunda kullanılan bileşenlerin miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
PZR ürünü (Temizlenmiş)	1.5 µl
BigDye reaksiyon karışımı	0.6 µl
Primer (10 pmol / µl)	0.5 µl
Reaksiyon tamponu	0.95 µl
Steril distile H ₂ O	6.45 µl
Toplam hacim	10 µl

Hazırlanan örneklerin DNA dizileme reaksiyonu aşağıdaki programın 25 döngü halinde uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.

96 °C 10 saniye

50 °C 5 saniye

60 °C 4 dakika

Döngüler tamamlandıktan sonra aşağıda belirtilen protokol takip edilerek DNA dizileme sonrası pürifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

- 1) Her bir örnek tüpüne 2 µl 3M sodyum asetat eklenmiştir.
- 2) Tüplere 50 µl soğuk %100 'lük etil alkol ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- 3) Tüpler 20 dakika -20°C 'de bekletilmiştir.
- 4) Bekleme süresinin ardından örnekler 20 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- 5) Pelet üzerine 250 µl soğuk %70'lik etil alkol ilave edilmiş ardından 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- 6) Pelet 20 µl formamid ile çözülmüş ve vortekslenmiştir.
- 7) Örnekler spin edilerek sekans tüplerine aktarılmıştır.
- 8) Örnekler 95 °C 'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiş, -20 °C'de 3-4 dakika bekletilmiştir.

Hazırlanan örnekler ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

3.5. Yabancıl Tip ve Mutant *AVP-NPII* Gen Dizilerini İçeren Vektörlerin Neuro2A Hücrelerine Transfeksiyonu

Yabancıl ve mutant tip *AVP-NPII* gen dizisini içeren vektörler Neuro2A hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarılmıştır. Neuro2A hücreleri, Cell Lines Service (CLS) firmasından ticari olarak satın alınmıştır. Bu hücre hattı, fare (*Mus musculus*) nöroblastoma dokusundan elde edilmiştir.

3.5.1. Neuro2A Hücrelerinin Üretilmesi

Neuro2A hücreleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM L-glutamin, %1 esansiyel olmayan amino asit (NEAA), 1 mM sodyum pirüvat, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyerinde, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren ortamda üretilmiştir. Bu hücreler, ihtiyaç duyulan hücre miktarına göre 25 cm² veya 75 cm²lik hücre kültür kaplarında belirtilen koşullarda 2-3 gün inkübe edilerek çoğaltılmıştır.

3.5.2. Neuro2A Hücrelerinin Pasajlanması

- 1) Hücrelerin buldukları kültür kaplarının yüzeyini kaplama (confluent olma) durumları ışık mikroskobu altında incelenerek belirlenmiştir.
- 2) Confluent olan hücreleri yüzeyden kaldırmak için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada hücrelerin zarar görmemesine özen gösterilmiştir.
- 3) Hücreler 1X DPBS (yaklaşık 2-3 ml) ile 1 kez yıkanmıştır.
- 4) 1X DPBS ortamdaki uzaklaştırılmıştır.
- 5) Hücrelerin yüzeyden kalkması için 0,5 ml 1X Tripsin-EDTA eklenmiştir.
- 6) Tripsin-EDTA'nın kültür kabının üzerine iyice yayılması sağlanmış ve ardından kültür kabı 37°C'de 2-3 dakika inkübe edilmiştir.
- 7) İnkübasyon sonrası hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir. İnkübasyon aşamasının süresi önemlidir. Çünkü inkübasyon süresinin kısa olması hücrelerin kalkması için yeterli olmaz iken; bu süre uzadığında ise Tripsin-EDTA hücrelere zarar vermektedir.
- 8) Bu sırada yeni bir kültür kabı alınarak, üzerine pasaj numarası (1 artırılarak), işlem tarihi, yapan kişi, hücre ismi, özellikleri yazılmış ve hücre için kullanılan besiyerinden 4,5 ml konulmuştur.
- 9) Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı anlaşıldıktan sonra Tripsin-EDTA'nın etkisini nötralize etmek için ortama EMEM (%10 FBS, 2 mM L-glutamin 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) besiyeri eklenmiştir. 25 cm² kültür kabı için 5 ml, 75 cm² kültür kabı için 15 ml EMEM eklenmiştir.
- 10) Hücreler pipetleme işlemi ile homojen hale getirilmiştir.
- 11) 0,5 ml hücre hazırlanan yeni kültür kabına ekilmiştir.
- 12) Yeni kültür kabı %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırılmıştır.

3.5.3. Transfeksiyon İşlemi İçin Neuro2A Hücrelerinin Hazırlanması

Neuro2A hücreleri, pasaj işlemi sırasında bir kısmı yeni kültür kaplarına ekilirken, bir kısmı transfeksiyon işlemi için 6-kuyucuklu plak içerisine ekilmiştir. Bunun için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;

- 1) Pasaj işlemi sırasında, hücreler pipetleme işlemi ile homojen hale getirildikten sonra 1 ml'deki hücre sayısı thoma camı kullanılarak hesaplanmıştır.
- 2) 6-kuyucuklu plakta her bir kuyucuk içerisinde 160.000 hücre olacak şekilde (160.000 hücre/kuyucuk), hücre süspansiyonundan alınması gereken miktar hesaplanmıştır.
- 3) Hesaplanan miktardaki hücre ile ona uygun gerekli miktardaki besiyeri pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanmıştır.
- 4) Homojen hale gelen hücre ve besiyeri karışımından her bir kuyucuğa 2 ml olacak şekilde pipet yardımıyla dağıtılmıştır.
- 5) 6-kuyucuklu plağın üzerine gerekli bilgiler yazılarak (Hücre adı, hücre sayısı, tarih) %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırılmıştır.

6-kuyucuklu plak içerisine 160.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen Neuro2A hücreleri ertesi gün ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Transfeksiyon işlemi yapabilmek için, hücrelerin kuyucuk içerisinde homojen olarak dağılmış olması, sağlıklı görünmesi ve en az %50-60 oranında confluent olması gerekmektedir. O nedenle transfeksiyon işlemine geçmeden önce bu şartların sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilmiştir.

3.5.4. DNA/Besiyeri Karışımının Hazırlanması

Transfeksiyon işlemi öncesi, Neuro2A hücrelerinin kontrol edilmesinin ardından DNA/Besiyeri karışımları hazırlanmıştır. Neuro2A hücreleri içine transfekte edilecek DNA'lar (plazmidler);

- AVP-WT (Wild Type; Yabanıl tip)
- AVP-SDM1 (Site-Directed Mutagenesis 1; G45C mutasyonu içeren plazmid)
- AVP-SDM2 (Site-Directed Mutagenesis 2; GGC delesyonu içeren plazmid)
- AVP-SDM3 (Site-Directed Mutagenesis 3; G88V mutasyonu içeren plazmid)
- pL (AVP-NP11 geni içermeyen plazmid)

pEGFP (Transfeksiyonun etkinliğini kontrol etme amacıyla arttırılmış yeşil floresan proteinini (Enhanced Green Fluorescent Protein) içeren plazmid kullanılmıştır)

Transfeksiyonda kullanılacak olan plazmid DNA'ların konsantrasyonu 1.6 µg olarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra DNA/Besiyeri karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

- 1) 100 µl serum içermeyen EMEM besiyeri ependorf tüp içerisine koyulmuştur.
- 2) Uygun miktarda DNA, besiyeri bulunan ependorf içerisine eklenmiş ve birkaç kez pipetaj yapılarak iyice karışmaları sağlanmıştır.
- 3) DNA-Besiyeri karıştırıldıktan sonra 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Bu işlem her bir DNA için ayrı bir ependorf tüpünde gerçekleştirilmiştir. DNA/Besiyeri karışımının her bir DNA için hazırlanma içerikleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Ayrıca, her bir mutasyon için kaç adet kuyucuk kullanılmak istenirse, transfeksiyon karışımı ona göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3. 9. DNA/Besiyeri ve Lipofectamin 2000/Besiyeri Karışımlarının İçerikleri.

DNA (Plazmid)	DNA/Besiyeri Karışımı		Lipofectamin 2000/Besiyeri Karışımı	
	DNA Miktarı (µl)	EMEM Miktarı (µl)	Lipofectamin 2000 Miktarı (µl)	EMEM Miktarı (µl)
AVP- WT	2,92	100	1,6	100
AVP-SDM1	2,65	100	1,6	100
AVP-SDM2	3,54	100	1,6	100
AVP-SDM3	3,35	100	1,6	100
pEGFP	3,09	100	1,6	100
pL	3,26	100	1,6	100

3.5.5. Lipofectamin 2000/Besiyeri Karışımının Hazırlanması

Mutant ve yabanıl tip *AVP-NPII* gen dizisini içeren plazmidler Neuro2A hücrelerine transient (geçici) transfeksiyon yöntemi ile aktarılmıştır. Transfeksiyon işlemlerinde Lipofectamin 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılmıştır.

Lipofectamin 2000 ile transfeksiyon işleminde 1,6 µg DNA: 1,6 µl Lipofectamin 2000 (1:1) oranı ile transfeksiyon etkinliğinin en yüksek olduğuna karar verilmiştir. Buna göre Lipofectamin 2000/Besiyeri karışımları aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır:

- 1) 100 µl serum içermeyen EMEM besiyeri ayrı bir ependorf tüp içerisine koyulmuştur.
- 2) 1.6 µl Lipofectamin 2000 [1:1 DNA(µg) / Lipofectamin (µl) oranını sağlayabilmek için], besiyeri bulunan ependorf içerisine eklenmiş ve birkaç kez pipetaj yapılarak karışımları sağlanmıştır.
- 3) Lipofectamin 2000-Besiyeri karıştırıldıktan sonra 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Bu karışım, her bir DNA için ayrı bir ependorf tüpünde hazırlanmış ve içerikleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

DNA-besiyeri ile Lipofectamin 2000-besiyeri karışımının hazırlanması ve oda sıcaklığındaki inkübasyonu eş zamanlı yapılmıştır.

3.5.6. Transfeksiyon İşlemi

- 1) Beş dakika oda sıcaklığında bekleme süresinden sonra, DNA-besiyeri karışımı, Lipofectamin 2000-besiyeri bulunan tüp içerisine eklenmiş ve iyice karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 2) İnkübasyon süresi sırasında bir yandan 6-kuyucuklu plak üzerinde transfeksiyon gerçekleştirilecek kuyucuklar belirlenerek işaretlenmiştir. Bu kuyucuklarda bulunan serumlu besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak, 2 ml serumsuz besiyeri ile değiştirilmiştir.
- 3) İnkübasyon süresinin sonunda DNA-Besiyeri-Lipofectamin 2000 karışımından, transfeksiyon yapılması belirlenen kuyucuklardaki hücrelere 200 µl damla damla eklenmiştir. Bu işlem sırasında, karışımın kuyucuğa homojen bir şekilde dağılmasına ve hücrelerin zarar görmemesine dikkat edilmiştir.
- 4) 6-kuyucuklu plak %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırılmıştır.

- 5) Transfeksiyondan 5 saat sonra hücrelerin besiyeri değişimi yapılmıştır; hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış, yerine 1 ml taze EMEM besiyeri eklenmiştir.
- 6) Yabancı tip ve mutant DNA'ların, Neuro2A hücrelerinde yabancı ve mutant tip AVP-NPII olarak ifade edilmesi için transfeksiyondan sonra 48 saat beklenmiş ve transfeksiyon etkinliği pEGFP'in eş zamanlı transfeksiyonu ile kontrol edilmiştir.

Başarılı bir transfeksiyon için, hücre içine aktarılmak istenen DNA'nın transfeksiyon ajanı ile serum içermeyen besiyeri ortamında etkileşime girmesi gerekmektedir. Bu yüzden transfeksiyon işleminde sıklıkla serum içermeyen veya serum oranı azaltılmış besiyerleri tercih edilmektedir. Fakat serum içermeyen besiyeri ortamında hücrelerin uzun süre kalması, onların fizyolojik ve biyokimyasal yapısını olumsuz yönde etkileyerek ölmelerine neden olabilmektedir. Deney sürecini olumsuz yönde etkileyecek olan bu tip durumları en aza indirmek için, transfeksiyonun en etkin olarak gerçekleştiği süreden sonra (bu süre transfeksiyon ajanına göre değişmekle beraber genellikle transfeksiyondan sonraki 4-6 saattir) serumu azaltılmış besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak hücrenin gereksinim duyduğu besiyeri kültür ortamına eklenmektedir. Bunun dışında kullanılan transfeksiyon ajanı genellikle toksiktir ve bu yüzden transfeksiyon sonrasında besiyeri değişimi ile transfeksiyon ajanı ortamdan uzaklaştırıldığında toksisite de ortadan kalkmış olmaktadır [198-199]. Bu nedenle Neuro2A hücrelerinin transfeksiyon işlemi sırasında serumsuz besiyeri kullanılmış, transfeksiyondan 5 saat sonra ise bu besiyeri, hücrenin gereksinim duyduğu besiyeri (serum içeren) ile yer değiştirilmiştir.

Transfeksiyon için kullanılan Lipofectamin 2000 transfeksiyon ajan miktarı, kullanılan DNA miktarı ve serum içermeyen besiyeri miktarı, hücre sayısına ve kullanılan kültür kabına göre değişiklik göstermektedir.

3.6. Hücre Kültürü Süpernatantlarında AVP Düzeylerinin RIA ve ELISA Yöntemleri ile Belirlenmesi

Mutant ve yabancı tip *AVP-NPII* cDNA'larını geçici transfeksiyonla içine alan ve bunları ifade eden Neuro2A hücrelerindeki AVP miktarını ölçmek için radioimmunoassay (RIA) ve ELISA yöntemleri uygulanmıştır.

Transfeksiyon işlemi ve sonrasında 6-kuyucuklu plak içerisine ekilen hücre sayılarında meydana gelebilecek farklılık nedeniyle, AVP miktar ölçümleri, toplam hücre lizat proteininin miligramı başına pg olarak (pg/mg) ifade edilmesi sağlanmıştır. Bunun için RIA ve ELISA yöntemleri ile süpernatantlarında AVP düzeyleri belirlenecek örneklerin ilk olarak total protein miktarları mg/ml olarak belirlenmiş ve her bir örneğin protein miktarı yabancı tip protein miktarına eşitlenerek başlangıç hücre sayıları (total protein miktarları) eşitlenmiştir.

RIA ve ELISA yöntemleri için total protein miktarı belirlemeden önce örnekler şu şekilde hazırlanmıştır: Neuro2A hücrelerinin mutant ve yabancı tip *AVP-NPII* gen dizisini içeren plazmidler ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra her bir kuyucuk içerisinde bulunan 1 ml hücre süpernatanı RIA ve ELISA yöntemleri için kullanılırken, aynı kuyucuktaki hücrelerden de total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için 1 ml hücre süpernatanı ependorf tüplere aktararak 1000 g'de 2-8°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar 2 set halinde isimlerinin yazılı olduğu ependorf tüplere ayrılmıştır. Bu setlerden biri RIA yöntemi için ayrılırken, diğer set ise ELISA yöntemi için ayrılmıştır. Birbirinden bağımsız her bir 3 set transfeksiyonun sonunda örnekleri içeren tüpler, yöntemler gerçekleştirilene kadar -80°C'de bekletilmiştir.

6-kuyucuklu plaklarda bulunan ve total protein izolasyonu gerçekleştirilecek olan hücrelerin üzerinden süpernatant alındıktan sonra ise, hücrelerin üzerine 1 ml TRIzol G™ (PanReac AppliChem) eklenmiş ve pipet ucu yardımıyla kuyucuk içeriği iyice karıştırılarak pipetaj yapılmıştır. RNA/protein kompleksinin iyice ayrılması için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir örnek isimlerinin yazılı olduğu 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış, tüm setler tamamlanıp protein izolasyonu yöntemi gerçekleştirilene kadar -80°C'de bekletilmiştir.

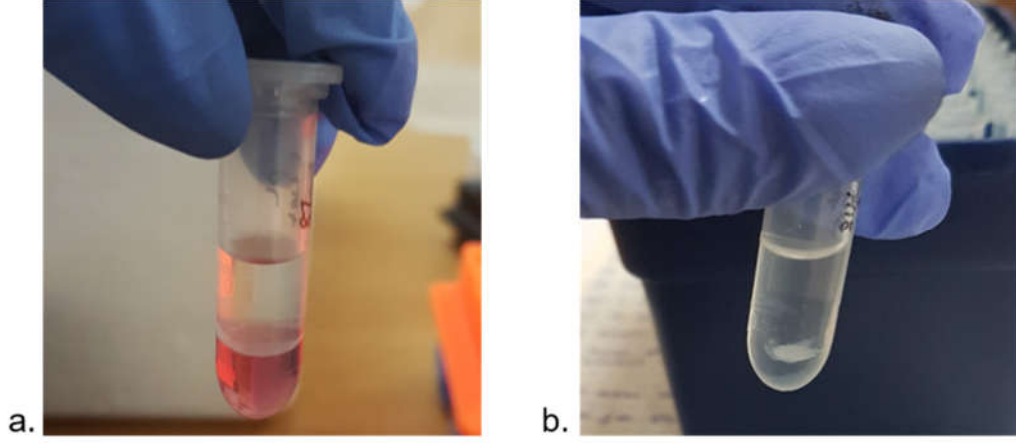
3.6.1. Neuro2A Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu

Hücrelerden total protein izolasyonu için TRltdy G™ (PanReac AppliChem) solüsyonu kullanılmıştır. İzolasyon yöntemi, aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir;

- 1) Daha önce 1 ml TRltdy G™ eklenmiş örnekler -80°C'den çıkarılmıştır.
- 2) Her bir örnek üzerine 200 µl kloroform eklenerek iyice pipetaj yapılmıştır.
- 3) Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 4) 12000 g'de 4°C'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- 5) Oluşan 3 katmandan en üst kısımdaki (RNA) uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.6.a).
- 6) 300 µl ethanol eklenerek tüpler alt üst edilmiştir.
- 7) Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
- 8) 2000 g'de 4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- 9) Süpernatant (protein) temiz bir tüpe aktarılmıştır.
- 10) 2 kat hacimde izopropanol eklenmiştir.
- 11) 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 12) 12000 g'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılmış, bu sırada pelletin kaybedilmemesine dikkat edilmiştir.
- 13) Protein pelleti 1 ml 300 mM guanidine hidroklorid (%95 ethanol içerisinde hazırlanır) ile yıkanmıştır (Şekil 3.6.b).
- 14) 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 15) 7500 g'de 4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- 16) Guanidine hidroklorid yıkaması ve santrifüj basamağı tekrarlanmıştır.
- 17) Supernatant uzaklaştırılmış ve pellet iyice kurutulmuştur.
- 18) Protein peleti %1 SDS içerisinde çözdürülmüştür.
- 19) Protein örneklerinin konsantrasyonları BCA Protein Assay Kit (TaKaRa) ile belirlenmiştir.

Örnekler küçük miktarlarda aliquotlanarak -20°C'de saklanmıştır.

Protein izolasyonu yöntemine ilişkin görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6. Protein izolasyonu yöntemine ilişkin görüntüler.

- a. Santrifüj sonrası meydana gelen ve yöntemin 5. basamağında elde edilen 3 katmanlı tabaka b. Protein pelletinin guanidine hidroklorid ile yıkanması basamağı

3.6.2. Örneklere Ait Total Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein izolasyonu tamamlandıktan sonra, protein örneklerinin konsantrasyonları BCA Protein Assay Kit (TaKaRa) ile belirlenmiştir. Bu kit, deterjan ile çözünür hale getirilmiş protein solüsyonları ile uyumludur ve yöntem son derece hassas bir kolorimetrik yöntemdir.

Bikinkoninik asit yöntemi (Bicinchoninic acid assay - BCA assay) bir tüp içerisinde iki aşamalı reaksiyona dayanmaktadır. İlk aşama, alkali bir ortamda proteininin peptid bağları ile Cu^{+2} iyonlarının Cu^{+} 'ya indirgenmesinden oluşmaktadır (Biüret reaksiyonu). İkinci aşama ise, bikinkoninik asitin 2 molekülü ile Cu^{+} iyonunun birleşerek 562 nm dalga boyunda ışığı güçlü bir şekilde emen mor renkli kompleksi oluşturmasıdır. Solüsyonda bulunan protein miktarı, absorpsiyonun ölçülmesi ve bilinen konsantrasyonlara sahip protein çözeltileri (standart çözeltiler) ile karşılaştırılmasıyla belirlenmektedir. Bu yöntem ile 0.02-2 mg/ml konsantrasyonları arasındaki protein miktarları belirlenebilmektedir [200-201].

3.6.2.1. BCA Protein Assay Kit İçin Reaktiflerin Hazırlanması

- Kit içerisinde bulunan Bovine Serum Albumin (BSA) standart solüsyonu 4°C'den oda sıcaklığına çıkarılmış ve oda sıcaklığına geldikten sonra kısaca vortekslenmiştir.
- BCA Reagent A ve BCA Reagent B düşük sıcaklıklarda çökebileceğinden dolayı, 20-37°C'ye getirilmiştir. Hafifçe çalkalanarak çökelti tamamen eridikten sonra kullanılmıştır.
- Working (Çalışma) Solüsyonunun Hazırlanması:
Ölçümden önce, BCA Reagent A ve Reagent B, 100:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Ölçüm için gerekli olan çalışma solüsyonun miktarının hesaplanması için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

Gerekli olan toplam çalışma solüsyonu miktarı (ml) = [(7 veya 8 standart eğri örneği+ örnek sayısı) × tekrar sayısı (n) +1] × reaksiyon başına kullanılan çalışma solüsyon miktarı (0,2 ml)

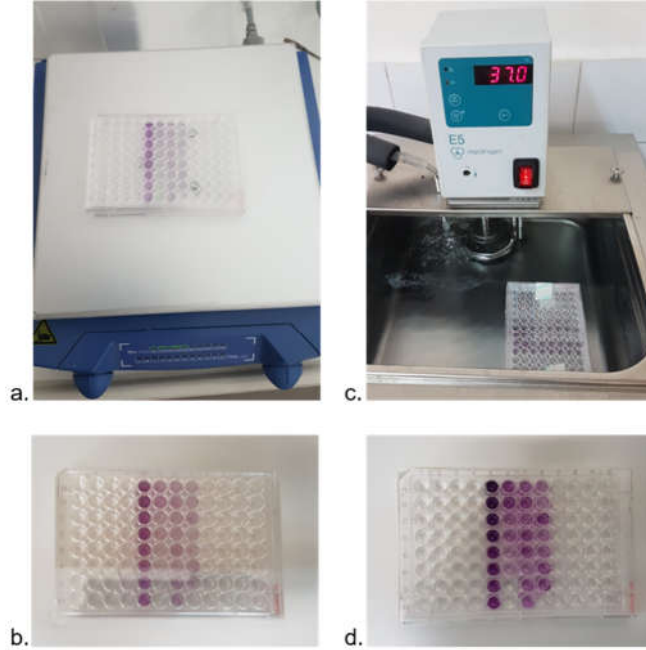
- BSA Standart Solüsyonunun Hazırlanması:
BSA standart solüsyonunun dilüsyonları hazırlanırken çözücü olarak deiyonize su kullanılmıştır. Standart solüsyonlarının hazırlanması için gereken miktarlar ve sonuçta tüplerde oluşan son konsantrasyonlar Çizelge 3.10'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 3. 10. BSA Standart Solüsyon Dilüsyonlarının Hazırlanması için Kullanılan Miktarlar ve Tüplerde Oluşan Son Konsantrasyonlar.

2 mg/ml BSA standart miktarı (µl)	Diluent (Çözücü) Miktarı (µl)	BSA'nın Son Konsantrasyonu (mg/ml)
120	0	2
90	30	1,5
60	60	1
45	75	0,75
30	90	0,5
15	105	0,25
10	150	0,125
0	120	0 (Blank)

3.6.2.2. Örneklere Ait Total Protein Konsantrasyonlarının BCA Protein Assay Kit ile Belirlenmesi

- 1) BCA Reagent A ve Reagent B yukarıda belirtilen formülden yararlanılarak 100:1 oranında karıştırılarak gerekli miktarda hazırlanmıştır.
- 2) 4°C'den çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmiş olan BSA standart solüsyonuna ait dilüsyonlar Tablo 1'deki miktarlar kullanılarak hazırlanmıştır.
- 3) BSA standart solüsyonunun her bir dilüsyonu ve miktarı belirlenecek örnekler 25'er µl olacak şekilde 96-kuyucuklu plağın kuyucuklarına dağıtılmıştır. Her bir standart ve örnek için en az 2 ölçüm gerçekleştirilmiştir (n=2).
- 4) Her bir kuyucuğa 200 µl çalışma solüsyonu eklenmiştir ve plak çalkalayıcı yardımı ile örneklerin iyice karışması sağlanmıştır (Şekil 3.7.a).
- 5) Plak 37°C'deki su banyosu içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir ve daha sonra oda sıcaklığına gelmesi için beklenmiştir (Şekil 3.7.b-d).
- 6) Plak (plate) okuyucu ile örneklerin 562 nm'de optik dansite değerleri okunarak kaydedilmiştir.



Şekil 3. 7. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi yöntemine ilişkin görüntüler. a. Plak çalkalayıcı ile örnekler ve çalışma solüsyonunun karışmasının sağlanması b. Örneklerin 37°C'deki su banyosu içerisine konulmadan önceki görüntüsü c. Örneklerin 37°C'deki su banyosu içerisinde inkübasyon aşaması d. Örneklerin su banyosundaki inkübasyon sonrası oda sıcaklığına gelmesi aşaması

Örnekler içerisindeki bilinmeyen protein konsantrasyonunu belirlemek için, örneğin OD değeri, bilinen BSA standart konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan standart eğri ile karşılaştırılarak GraphPad Prism 7 programı aracılığıyla belirlenmiştir.

3.6.3. AVP Miktarlarının Radioimmunoassay (RIA) Yöntemi ile Belirlenmesi

- RIA yönteminin uygulanması, öncelikle hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Fakat bu yöntem çok hassas bir yöntemdir ve ilk aşamada hizmet alımı şeklinde denenip düzgün sonuçlar elde edilememiştir. Sonuç itibarıyla hizmet alımı kısmından verim alınmadığından dolayı, yöntemine uygun kit (Vasopressin-RIA kit, DIAsource) (hassasiyet: 0.5 pmol/L) alınarak, yöntem Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü bünyesindeki laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Sadece örneklerin azot gazı altında uçurma işlemi ile yöntemin son basamağındaki gama sayacı (PC-RIA MAS, Stretec, Germany) ile okuma basamağı hizmet alımı şeklinde ClinLab Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.
- Bu yöntem ile hücre kültürü süpernatantlarında AVP düzeyleri Vasopressin-RIA kit (DIAsource) ile belirlenmiştir. Yöntem, bir tavşan anti-vazopressin antiserumu ve bir vazopressin izleyici (¹²⁵I) içermektedir ve test prensibi radyoaktivite ölçümüne dayanmaktadır.
- Yöntem, basamaklarda yer alan uzun inkübasyon süreleri nedeniyle gerçekleştirilmesi 3 gün sürmektedir.
- RIA yöntemi birbirinden bağımsız 3 set şeklinde gerçekleştirilmiştir. Daha önce 6-kuyucuklu plak içerisine ekilerek transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen Neuro2A hücreleri, transfeksiyon işleminden 48 saat sonra her bir kuyucuk içerisinde bulunan hücre süpernatantı alınarak santrifüj edilmiş ve RIA yöntemi için hazırlanmıştır.
- Örnekler, RIA yöntemi gerçekleştirilene kadar -80°C'de bekletilmiştir.
- RIA yöntemi uygulanacağı zaman örnekler, -80°C'den çıkarılmış ve çözüldükten sonra RIA yönteminin uygulanmasına başlanmıştır.

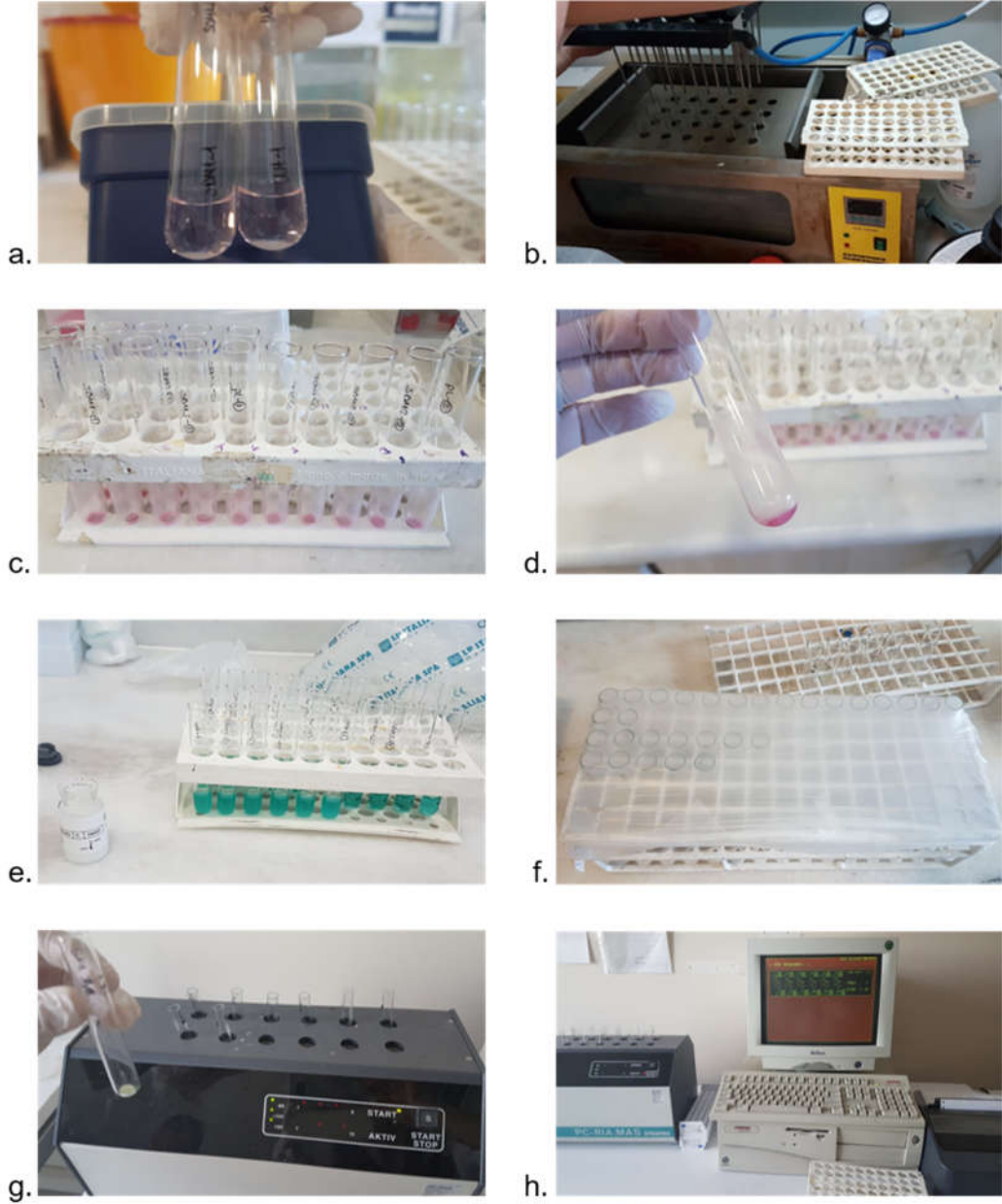
3.6.3.1. RIA Yöntemi Basamakları

- 1) Her bir hücre kültürü süpernatanı örneğinden 400 µl cam tüplerin dibine pipetlenmiştir.
- 2) Örneklerin üzerine 2 ml soğuk etanol yine tüplerin dibine doğru eklenmiştir. (Alkol eklenince kireç gibi beyaz çökelek oluşmaktadır).
- 3) Tüplerin kapakları kapatılarak 10 saniye vortekslenmiştir.
- 4) 3500 rpm'de 15 dakika 2-8°C'de santrifüj edilmiştir.
- 5) Santrifüj sonrası elde edilen süpernatan yeni ve temiz bir tüpe aktarılmıştır.
- 6) Tüplerin kapakları kapatılmış ve tüplere azot gazı altında uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 7) Azot gazı altında uçurma işlemi sonrası, örnekler cam tüplerin dibinde kurumuş haldedir. Tüplere 400 µl Reagent D (Assay Buffer) eklenmiştir ve kısaca vortekslenmiştir.
- 8) Cam tüplerden 300'er µl örnek pipetle çekilerek yeni küçük temiz tüplerin dibine doğru hızlıca bırakılmıştır. Bu aşamada örneklerin isimlerinin karışmamasına dikkat edilmiştir.
- 9) Örneğin üzerine Reagent A'dan (Anti-vazopressin) 200 µl yine tüplerin dibine doğru eklenmiştir.
- 10) Tüpler yaklaşık 10 saniye vortekslenerek, örnekler ile kit bileşenlerinin karışması sağlanmıştır.
- 11) Tüplerin üzeri parafilmle kapatılarak, örnekler 4°C'de 20-24 saat inkübe edilmiştir.
- 12) 20-24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, tüplere 200 µl Reagent B (¹²⁵I-vazopressin) eklenmiştir.
- 13) Tüpler 10 saniye vortekslenmiştir.
- 14) Tüplerin üzeri parafilmle kapatılarak, örnekler 4°C'de 20-24 saat inkübe edilmiştir.
- 15) 24 saatlik inkübasyon sonunda, tüplere Reagent C'den (Çift antikor katı faz) 100'er µl diplerine doğru eklenmiştir.
- 16) Tüpler 10 saniye kadar vortekslenerek, üzerleri parafilmle kapatılmıştır.
- 17) Örnekler 1 saat 4°C'de bekletilmiştir.
- 18) 2000 rpm'de 10 dakika 2-8°C'de santrifüj edilmiştir.

- 19) Santrifüj sonrası tüpler devrilerek içeriği boşaltılmış, tüplerin alt kısımlarındaki kalıntıların gama sayacı cihazı ile sayılması işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 20) Gama sayacı cihazı (PC-RIA MAS) ile sayılan CPM (Count Per Minute=Dakikadaki sayım) değerleri, bu değerlere karşılık gelen pmol/L değerlerine dönüştürülmüştür.
- 21) Son olarak elde edilen pmol/L değerleri pg/ml değerlerine dönüştürülmüştür.

RIA yönteminin uygulanmasına ilişkin görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.8).

RIA yöntemi sonucu, örnekler içerisindeki AVP miktarı pg/ml şeklinde belirlenmiştir. Örneklere ait elde edilen pg/ml değerleri, her bir proteinin total protein miktarı değerine (mg/ml) bölünerek, örneklere ait mg başına pg değerlerini (pg/mg) hesaplanmıştır. Böylece, yabanıl tip ve her bir mutant örneğinin, hücre kültürü ortamına salgılamış oldukları AVP miktarları karşılaştırılmış, her bir mutasyonun hücrelerdeki AVP salgılama kapasitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.



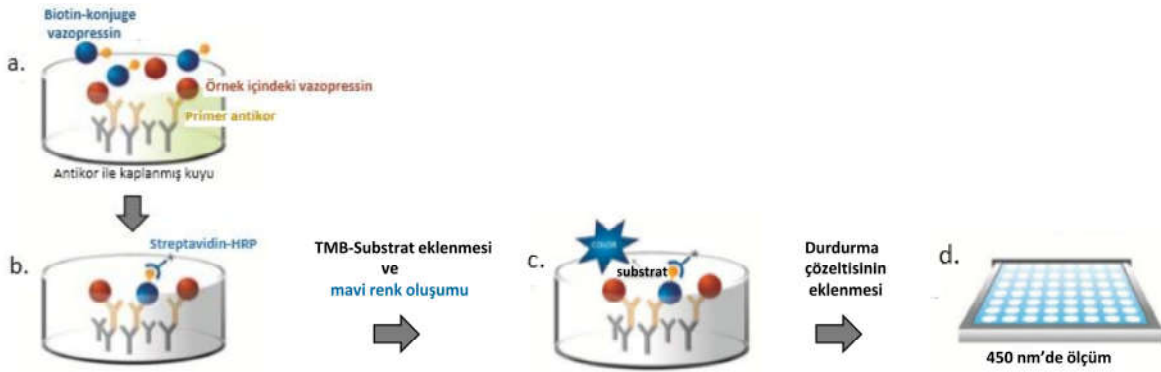
Şekil 3. 8. RIA yönteminin uygulanmasına ilişkin görüntüler.

a. RIA yönteminde etanol ekstraksiyonu sırasında alkol ekledikten sonra meydana gelen beyaz çökelek b. Azot gazı altında uçurma düzeneğinde örneklerin uçurulma aşaması c. Azot gazı altında uçuktan sonra örneklerden geriye kalan kurumuş kalıntı d. Örnek tüplerinde kurumuş kalıntının yakından görüntüsü e. Örneklerin üzerine tüplere Reagent C (Çift antikor katı faz) ekleme aşaması f. Tüplerin üzerinin parafilmle kapatılarak 4°C'de inkübasyon öncesi aşaması g. Santrifüj aşaması sonrası örnek tüplerinin dibinde oluşan kalıntı h. Gama sayacı cihazı ile tüplerin alt kısımlarındaki kalıntıların sayılması işlemi (AVP miktarının belirlenmesi).

3.6.4. AVP Miktarlarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Neuro2A hücrelerindeki AVP miktarını ölçmek için RIA yöntemine alternatif olarak Enzim-bağlı immünosorbent analiz (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) yönteminin gerçekleştirilmesi denenmiş ve hücre kültürü süpernatantlarında AVP düzeyleri Arg⁸-Vasopressin ELISA kit (Enzo) kullanılarak da belirlenmiştir.

Bu kit, yarışmalı ELISA ilkesine dayanmaktadır. Kit içerisinde sağlanan 96-kuyucuklu plağın her kuyucuğu hedefe özel yakalama antikorunu (keçi-anti-tavşan IgG antikorunu) ile önceden kaplanmıştır (Şekil 3.9). Hücre kültürü süpernatant örnekleri ve 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltiler (Şekil 3.10) antikor kaplı bu kuyucuklara eklenir. Aynı zamanda biotin-konjuge vazopressin solüsyonu ve ardından vazopressine karşı antikor (tavşan poliklonal antikor) içeren solüsyon eklenmektedir. Böylece standart ve örnekler içerisindeki antijen, biotin-konjuge vazopressin ile yarışmalı bir şekilde antikora bağlanmaktadır. Tipik sandviç ELISA testlerinin aksine, yarışmalı ELISA testlerinde örnekteki antijen miktarı ne kadar yüksekse, renk gelişimi ve optik dansite okuması da o kadar düşük olmaktadır.



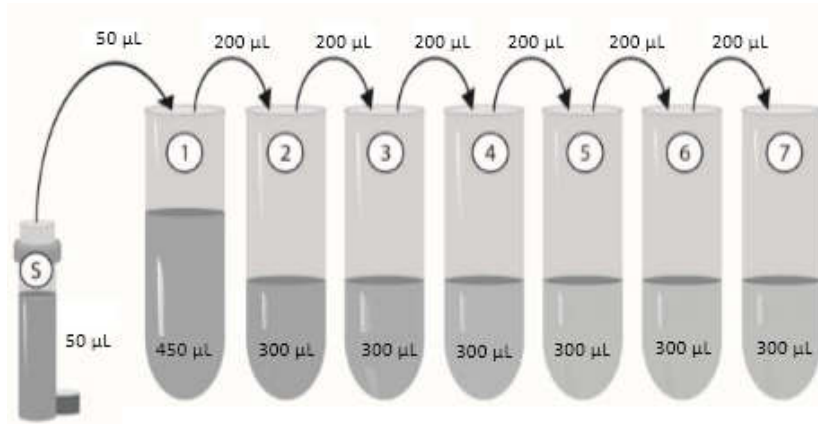
Şekil 3. 9. ELISA yöntemi prensip şeması.

- ELISA yöntemi, birbirinden bağımsız 5 set şeklinde gerçekleştirilmiştir. Daha önce 6-kuyucuklu plak içerisine ekilerek transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen Neuro2A hücreleri, transfeksiyon işleminden 48 saat sonra her bir kuyucuk içerisinde bulunan hücre süpernatantı alınarak santrifüj edilmiş ve ELISA yöntemi için hazırlanmıştır.
- Örnekler, ELISA yöntemi gerçekleştirilene kadar -80°C'de bekletilmiştir.

- Aynı RIA yönteminde olduğu gibi, ELISA yöntemi uygulanacağı zaman örnekler, -80°C 'den çıkarılmış ve çözüldükten sonra ELISA yönteminin uygulanmasına başlanmıştır.

3.6.4.1. ELISA Yöntemi için Reaktiflerin Hazırlanması

- ELISA yöntemine başlamadan önce, tüm reaktifler yarım saat önce 4°C 'den oda sıcaklığına çıkarılmış ve oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır.
- Yıkama Tamponu Hazırlama:
Yönteme başlamadan önce, her set için yıkama tamponu taze hazırlanmış ve yıkama tamponu konsantresi 1:20 oranında dilüe edilmiştir. Bunun için, 5 ml yıkama tamponu konsantresi üzerine 95 ml deiyonize su eklenmiş ve iyice çalkalanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- AVP Standart Hazırlama:
Hücre kültürü süpernatant örneklerinde bulunan AVP miktarını hesaplamak için 7 farklı konsantrasyonda AVP içeren standart hazırlanmıştır. Standartlar hazırlandıktan sonra 60 dakika içerisinde kullanılmaları gerektiğinden, yöntemine başlamadan hemen önce hazırlanmıştır. Standart hazırlamak için Şekil 3.10'daki şema ve Çizelge 3.11'deki değerler kullanılmıştır:



Şekil 3. 10. ELISA yöntemi için standart tüplerinin hazırlanma protokolü.

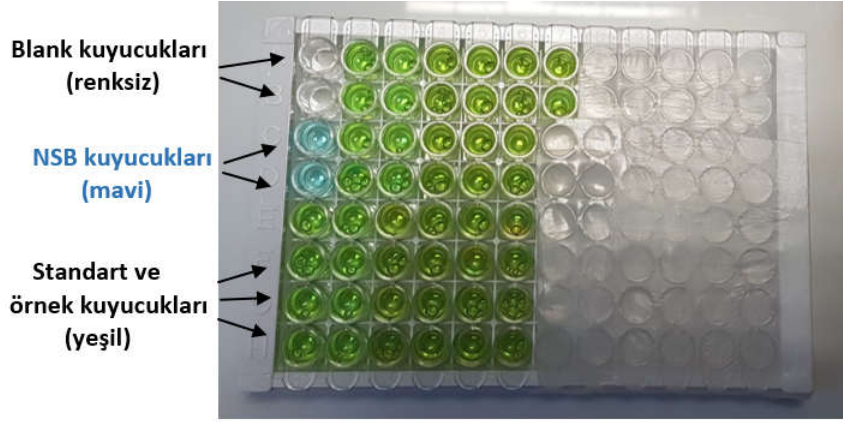
Çizelge 3. 11. ELISA yöntemi için hazırlanan standart tüplerde AVP'nin son konsantrasyonu.

Tüp	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7
Konsantrasyon (pg/mL)	1000	400	160	64	25.6	10.24	4.10

3.6.4.2. ELISA Yöntemi

- 1) ELISA kitinin içerisinde, tabanı keçi anti-tavşan IgG kaplı özel bir 96-kuyucuklu plak yer almaktadır. Bu plak üzerinde Non-specific binding (NSB) ve B0 (0 pg/ml standart) kuyucukları üzerine 100'er µl "Assay Buffer 28" eklenmiştir.
- 2) Daha önce hazırlanmış 7 adet standart solüsyonun her birinden ikişer tekrarlı olmak üzere 100'er µl uygun kuyucuklara eklenmiştir.
- 3) İçerisindeki AVP miktarı belirlenecek olan örneklerin her birinden de yine ikişer tekrarlı olacak şekilde 100'er µl uygun kuyucuklara eklenmiştir.
- 4) NSB kuyucukları üzerine 50'şer µl daha "Assay Buffer 28" eklenmiştir.
- 5) Blank kuyucukları hariç her kuyucuğun üzerine 50'şer µl "Blue Conjugate" eklenmiştir. (Bu solüsyon, içerisinde biotin-konjuge vazopressin içeren mavi bir solüsyondur).
- 6) Blank ve NSB kuyucukları hariç her kuyucuğun üzerine 50'şer µl "Yellow Antibody" eklenmiştir. (Bu solüsyon, içerisinde vazopressine karşı tavşan poliklonal antikor içeren sarı bir solüsyondur).

Not: Bu aşamada NSB kuyucukları hariç her kuyucuğun yeşil renkte olması gerekirken, NSB kuyucuklarının ise mavi renkte olması gerektiği, blank kuyucuklarının ise bu esnada boş ve renksiz olduğu kitin prosedüründe belirtilmiştir. Yöntemi uygulama esnasında da belirtilen renklerin oluştuğu gözlenmiş ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 11. ELISA yöntemi uygulanması sırasında kitin prosedüründe de belirtilen mavi ve yeşil renklerin oluşumu.

- 7) Eklenen solüsyonların karışması için plağa hafifçe vurulmuş ve plağın üzeri buharlaşmayı önlemek için yapışkan film ile kapatılarak 4°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.
- 8) İnkübasyon süresinin sonunda, plağın içeriği boşaltılmış ve her kuyucuğa 300 µl yıkama tamponu eklenerek kuyucuklar yıkanmıştır. Yıkama işlemi aynı şekilde 2 kez daha tekrarlanmış ve böylece toplamda 3 yıkama gerçekleştirilmiştir. Son yıkamadan sonra, kuyucukların içeriği boşatılmış ve kalan yıkama tamponunu tamamen ortadan kaldırmak için, hav bırakmayan havlu kağıt üzerinde plağa sıkıca vurulmuştur.
- 9) Blank kuyucuklar hariç her bir kuyucuğa 200 µl SA-HRP solüsyonundan eklenmiştir. (Bu solüsyon, Streptavidin-konjuge Horseradish peroksidaz enzimi içermektedir).
- 10) Plağın üzeri tekrar yapışkan film ile kapatılmış ve oda sıcaklığında plak çalkalayıcıda 240 rpm'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası basamak 8'deki gibi yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 11) Her bir kuyucuğa 200 µl TMB-substrate solüsyonundan eklenmiştir. (Bu solüsyon, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) and hidrojen peroksit içermektedir). Solüsyon eklendikten sonra kuyucuklarda mavi renk oluşumu gözlenmiştir.
- 12) Plağın üzeri tekrar kapatılmış ve oda sıcaklığında plak çalkalayıcıda 240 rpm'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 13) Her kuyucuğa durdurma çözeltilisinden 100 µl eklenmiş ve sarı renk oluşumu gözlenmiştir. Bu çözeltilinin eklenmesi, reaksiyonu durdurduğundan plağın

derhal okunması gerekmektedir. Bu nedenle, plak hızlı bir şekilde ELISA okuyucu cihazına yerleştirilerek, 450 nm’de optik dansite değerleri okunmuştur.

ELISA yöntemi sonucu, örnekler içerisindeki AVP miktarı pg/ml şeklinde belirlenmiştir. Örnekler için elde edilen pg/ml değerleri, her bir proteinin total protein miktarı değerine (mg/ml) bölünerek, örnekler için mg başına pg değerlerini (pg/mg) hesaplanmıştır.

3.7. Neuro2A Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışmaları

Hücre görüntüleme çalışmalarında yabancı tip ve mutant AVP proteinlerini takip edebilmek için *AVP-NPII* genini içeren dizi EGFP ile işaretlenmiştir ve Neuro2A hücrelerinin bu işaretli gen dizisini içeren plazmidler ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için 48-kuyucuklu plak içerisine 40.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde Neuro2A hücreleri ekilmiş ve ertesi gün 400 ng (0,4 µg) DNA: 0,4 µl Lipofectamin (1:1) oranı ile transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işleminin ardından 48 saatlik inkübasyon sonunda transfeksiyon etkinliği kontrol edilmiş ve hücre içerisinde ER’nin gözlenebilmesi için hücreler ER-İzleyici (ER-Tracker Red) (glibenclamide BODIPY TR) isimli boya ile boyanmıştır.

3.7.1. Neuro2A Hücrelerinin ER-İzleyici ile Boyanması Protokolü

- 1) Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra 30 dakika boyunca %4 formaldehit içeren 250 µl 1X PBS ile fikse edilmiştir.
- 2) Fiksasyondan sonra tekrar 1X PBS ile yıkanmıştır.
- 3) Yıkama sonrası PBS uzaklaştırılmıştır ve hücrelere 250 µl 1X PBS içerisinde 1 µM ER-Tracker™Red (BODIPY® TR Glibenclamide) (Thermo Fisher Scientific) içeren boya eklenmiştir.
- 4) 37°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 5) İnkübasyon sonrası boya uzaklaştırılmıştır ve 250 µl 1X PBST (%0.05 Tween-20 içeren 1X PBS) eklenip hücreler buz üzerinde 10 dakika boyunca inkübe edilerek permeabilize edilmiştir.
- 6) Hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır ve 1 µM DAPI (Sigma) ile 5 dakika boyunca inkübe edilerek boyanmıştır.

7) 1X PBS ile 2 defa yıkanan hücreler EVOS Flouid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) ile görüntülenmiştir.

3.8. İstatiksel Analiz

RIA ve ELISA yöntemlerine ait verilerin öncelikle normal dağılım gösterip göstermediği GraphPad Prism 7 programındaki Shapiro Wilk Normallik Testi ile incelenmiştir ve p değerleri >0.05 olması istatiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Veriler normal dağılım gösterdiği takdirde, her iki yöntemin kendi içerisindeki yabancı ve mutant tipleri arasında bir fark olup olmadığı parametrik bir test olan Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova) ile incelenmiş ve p değeri <0,05 istatiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Eğer gruplar arası fark varsa bu farkın hangi gruplar arasında olduğu ve anlamlı olup olmadığını değerlendirmek için ise Tukey Çoklu Karşılaştırma Yöntemi kullanılmıştır, p değeri <0,05 istatiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

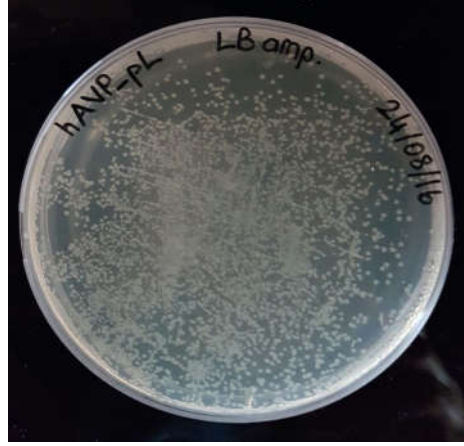
AVP değerlerinin ölçümünde literatürde genellikle RIA yöntemi kullanılmaktadır. RIA yönteminin çok hassas olması, azot gazı altında kurutma ve gama sayacında okuma basamaklarındaki gibi her laboratuvarında bulunmayan cihazlara ihtiyaç duyması ve yöntemde yer alan uzun inkübasyon süreleri nedeniyle gerçekleştirilmesi 3 gün sürmesinden dolayı, yapılan tez çalışmasında daha hızlı sonuç veren ve gerçekleştirilmesi kolay, alternatif bir yöntem olan ELISA yöntemi denenmiştir. ELISA yönteminin RIA yöntemi yerine kullanılabilirliği, iki yöntem arasındaki uyumun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan istatiksel bir analiz olan Bland-Altman yöntemi ile değerlendirilmiştir [202]. Bu istatistiksel analizde ilk aşama, iki yöntemden elde edilen ölçüm değerleri arasındaki farkın hesaplanması iken, ikinci aşama ise iki yöntem ile elde edilen bu ölçüm değerlerinin ortalamasının hesaplanmasıdır. Daha sonra yöntemlere ait fark değerlerine karşılık ortalama değerlerinin saçılım grafiği çizilmektedir. Ayrıca farkların ortalaması (\bar{d}) ve standart sapması (s) kullanılarak, " $\bar{d}-1,96s$ " ve " $\bar{d}+1,96s$ " formülleri yardımıyla uyum sınırları (alt ve üst sınırlar) olarak adlandırılan %95 güven aralıkları hesaplanmaktadır [203-

206]. Çizilen saçılım grafiğinde dikkat edilmesi gereken 4 önemli nokta vardır. Bunlardan birincisi, farklara ait ortalamanın (\bar{d}) 0 (sıfır) değerine yakın olması gerekmektedir [207]. İkincisi, alt ve üst sınırlar olarak adlandırılan %95 güven aralıklarının birbirine yakın olması gerekmektedir [208]. Üçüncüsü, iki yonteme ait fark değerlerinin normal dağılım göstermesi gerekmektedir [203, 205]. Son olarak yöntemlere ait fark değerlerinin %95'inin bu uyum sınırları içerisinde olması beklenmektedir [205]. Bu doğrultuda, yapılan tez çalışmasında, yabancı tip ve her bir mutant için ELISA ve RIA yöntemleri ile ölçülen AVP değerlerinin normalize değerleri ile gerekli istatistiksel hesaplamalar yapılmış ve \bar{d} , s ve %95 güven aralıkları belirlenmiştir. Hesaplanan değerler kullanılarak Bland-Altman saçılım grafiği, GraphPad Prism 7 programı yardımıyla çizilmiştir.

4. SONUÇLAR

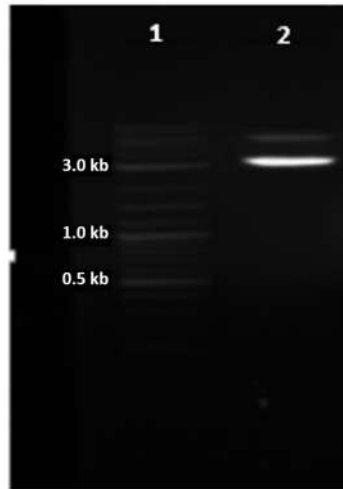
4.1. AVP-NPII Genini Taşıyan İfade Vektörü İzolasyonu

Ticari olarak temin edilen hAVP-pL (pL_AVP_WT) plazmidinin transformasyon sonucu elde edilen plak görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. hAVP-pL plazmidinin transformasyon sonrası plak görüntüsü.

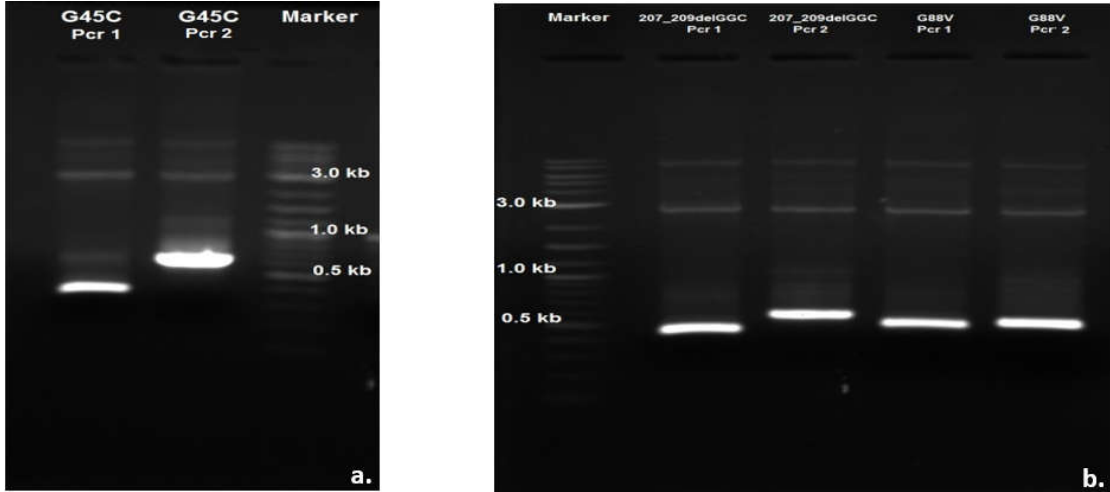
Ampisilinli LB agar plağında üreyen bakterilerden (Şekil 4.1) tek bir koloni alınarak elde edilen bakteri kültüründen izole edilen plazmid DNA'sının agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.2'deki gibidir.



Şekil 4. 2. hAVP-pL vektörünün % 1'lik agaroz jel görüntüsü. [1: marker, 2: hAVP-pL vektörü (3640 bç)]

4.2. Bölgeye Yönelik Mutagenез Yöntemi Kullanılarak Oluşturulan Mutant *AVP-NPll* Gen Dizilerini İçeren Uygun İfade Vektörlerinin Hazırlanmasına İlişkin Sonuçlar

AVP-NPll gen dizisinde ilgili mutant nükleotidi içeren ve birleştirme reaksiyonunda kullanılacak olan kısa PZR ürünlerinin (PZR ürünü 1 ve PZR ürünü 2) %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4. 3. *AVP-NPll* geni G45C, 207_209delGGC ve G88V mutantlarına ilişkin kısa PZR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüleri

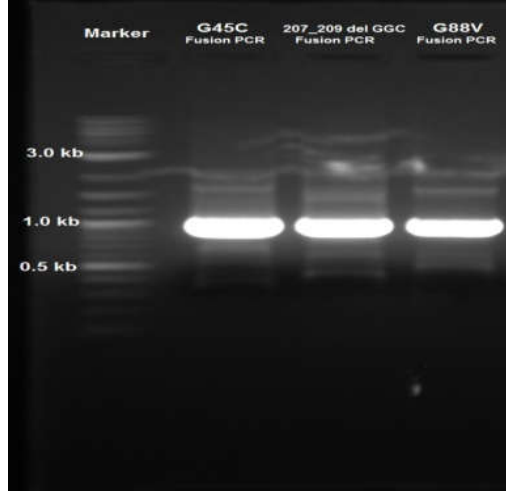
a. G45C mutantına ilişkin kısa PZR ürünleri:

(hAVP_pL_XhoI_overlap forward+G45C R: 390 bç,
hAVP_pL_SpeI_overlap reverse + G45C F: 659 bç);

b. 207_209delGGC ve G88V mutantlarına ilişkin elde edilen kısa PZR ürünleri:

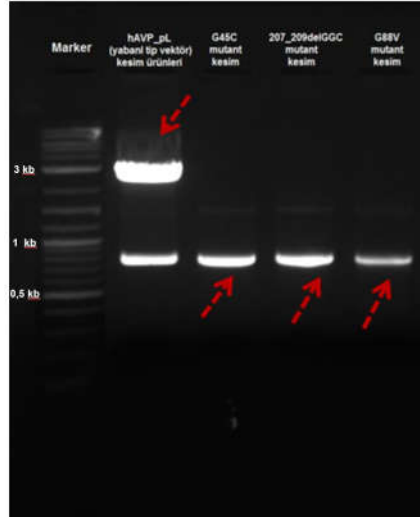
(hAVP_pL_XhoI_overlap forward+207_209delGGC R: 464 bç,
hAVP_pL_SpeI_overlap reverse+207_209delGGC F: 587 bç,
hAVP_pL_XhoI_overlap forward + G88V R: 518 bç,
hAVP_pL_SpeI_overlap reverse + G88V F: 530 bç).

İlgili mutant nükleotidi içeren *AVP-NPll* gen bölgesinin tamamını oluşturmak için, her iki kısa PZR ürününü agaroz jelden saflaştırılmış ve birleştirme reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü ise Şekil 4.4'teki gibidir.



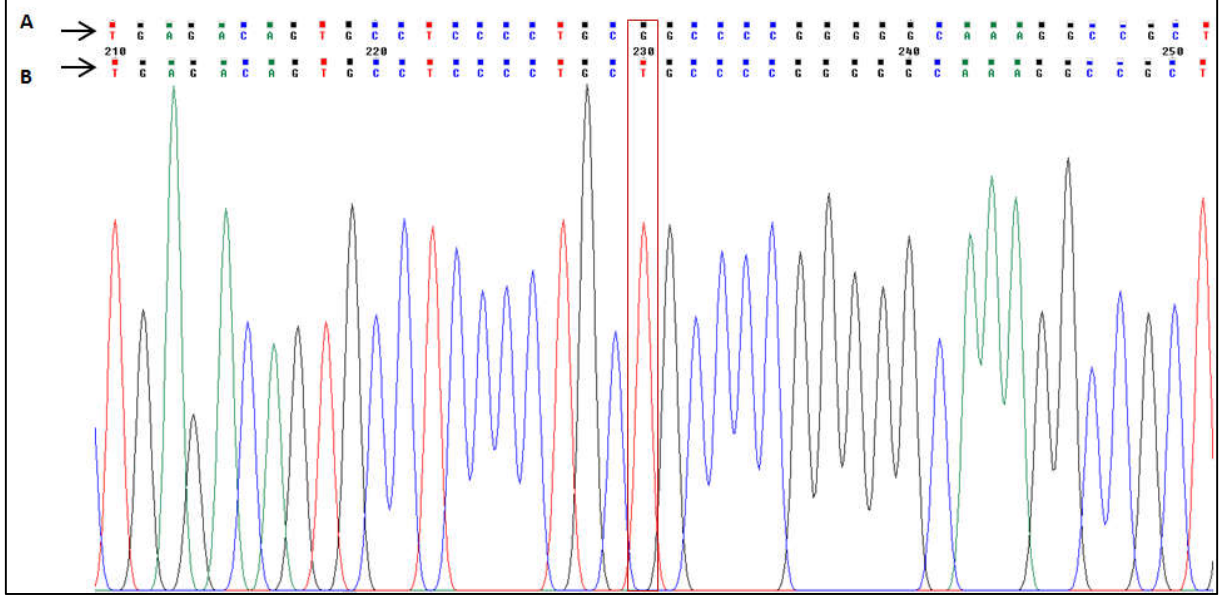
Şekil 4. 4. *AVP-NPII* geni G45C, 207_209delGGC ve G88V mutantlarına ilişkin uzun PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü (PZR ürün boyutu yaklaşık 1049 bp'dir).

Elde edilen mutant *AVP-NPII* dizilerinin, hAVP-pL vektörü içerisine *XhoI* ve *SpeI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak aktarılmasına ilişkin kesim sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir.

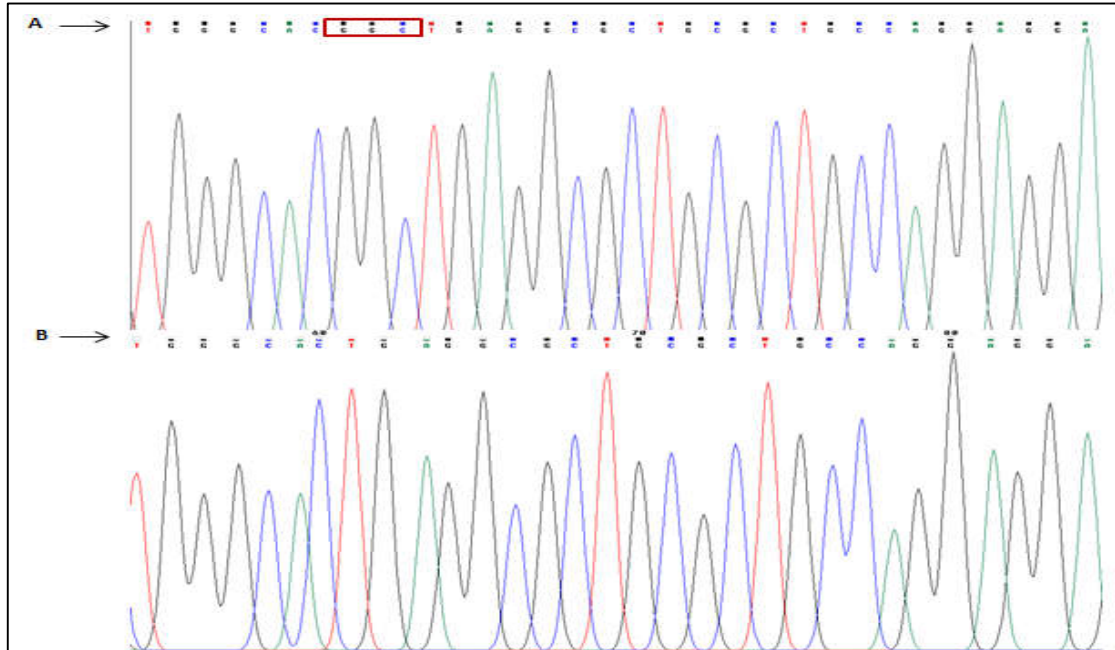


Şekil 4. 5. hAVP_ pL vektörü ve G45C, 207_209delGGC ve G88V uzun PZR ürünlerinin *XhoI* ve *SpeI* ile kesimleri sonucu agaroz jel görüntüsü (Kırmızı ok ile gösterilen bantlar jelden pürifiye edilerek ligasyon ile birleştirilmiştir).

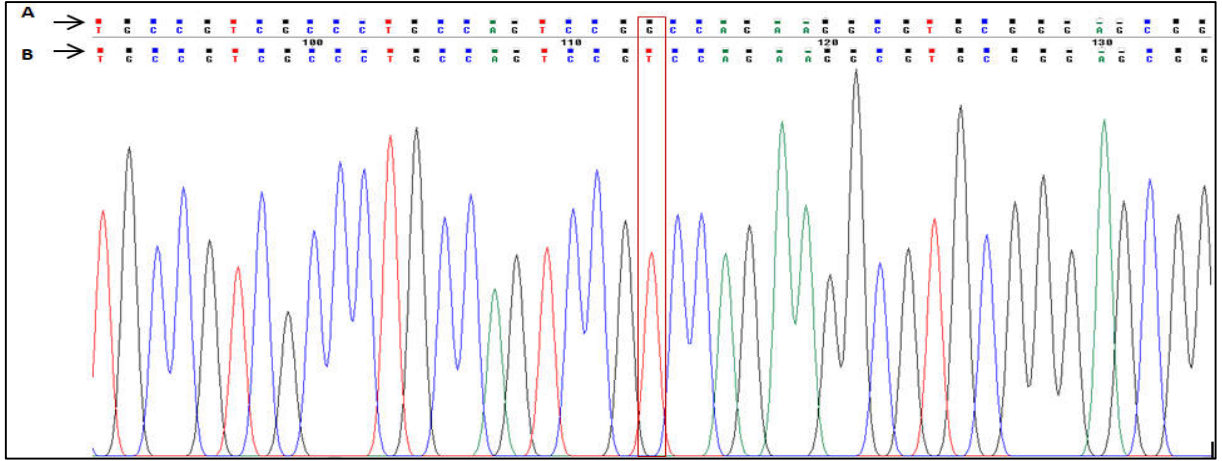
AVP-NPII gen dizisinde oluşturulan G45C, 207_209delGGC ve G88V mutasyonlarını içeren plazmid DNA'larının DNA dizi analizi yöntemi sonucunda elde edilen kromatogram görüntüleri Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4. 6. G45C mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü. A: yabanıl tip *AVP-NPII* dizisi, B:G45C mutasyonunu içeren *AVP-NPII* dizisindeki GGC→TGC dönüşümü.



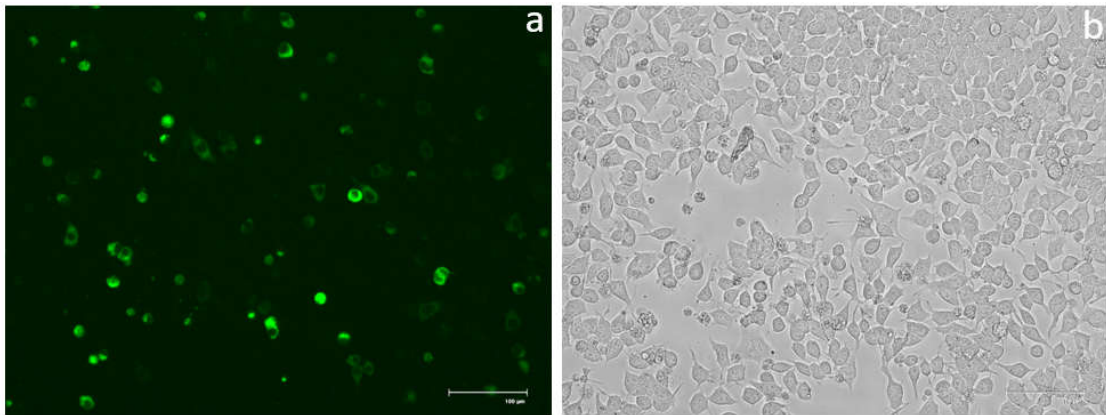
Şekil 4. 7. 207_209delGGC mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü. A: yabanıl tip *AVP-NPII* dizisi, B: 3 baz çiftlik (GGC) delesyon taşıyan örneğin kromatogram görüntüsü.



Şekil 4. 8. G88V mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü. A: yabanıl tip *AVP-NPII* dizisi, B: G88V mutasyonunu içeren *AVP-NPII* dizisindeki $GGC \rightarrow GTC$ dönüşümü.

4.3. Yabanıl Tip ve Mutant *AVP-NPII* Gen Dizilerini İçeren Vektörlerin Neuro2A Hücrelerine Transfeksiyon Sonuçları

Yabanıl tip ve mutant *AVP-NPII* gen dizilerini içeren vektörlerin Neuro2A hücrelerine transfeksiyon etkinliğinin pEGFP'in eş zamanlı transfeksiyonu ile kontrol edilmesine ilişkin görüntü Şekil 4.9'daki gibidir.

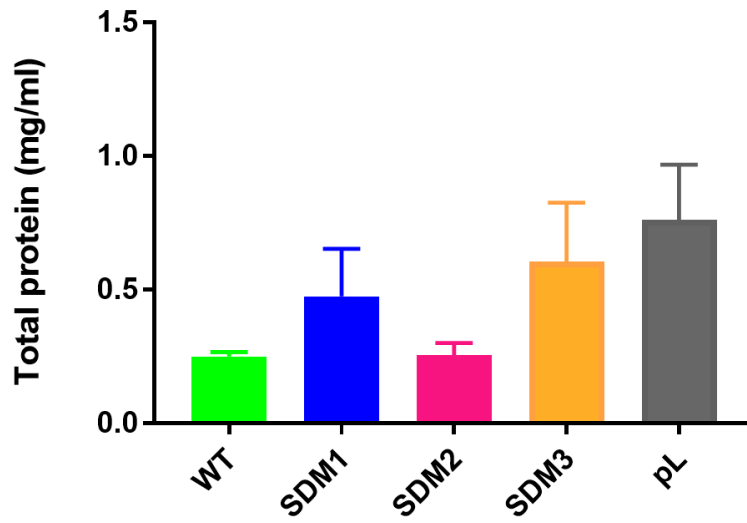


Şekil 4. 9. pEGFP ile transfekte edilen Neuro2A hücrelerinin 48 saat sonraki görüntüsü. a. Transfekte edilen Neuro2A hücrelerine ait görüntü b. Aynı Neuro2A hücrelerin eş zamanlı beyaz ışık altındaki görüntüsü.

4.4. Hücre Kültürü Süpernatantlarında AVP Düzeylerinin RIA ve ELISA Yöntemleri ile Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

4.4.1. Örneklerin BCA Protein Assay Kit ile Belirlenmiş Total Protein Konsantrasyonları

Birbirinden bağımsız gerçekleştirilen 3 set transfeksiyon sonucunda, 3 sette yer alan örneklere ait total protein konsantrasyonları (mg/ml) ortalamaları Şekil 4.10'da verilmiştir.

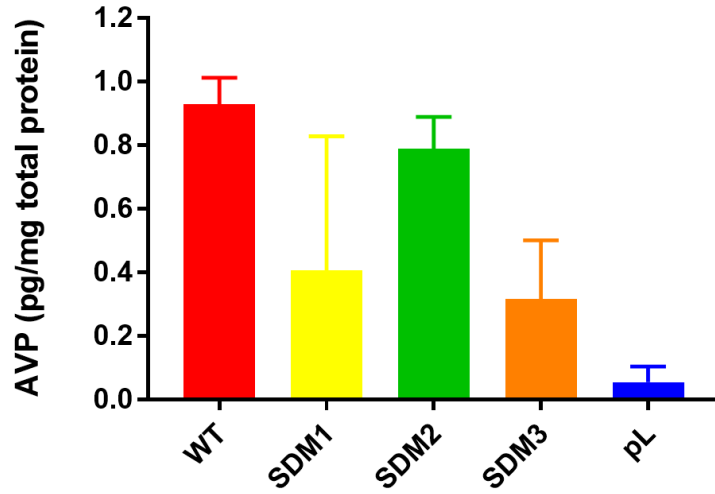


Şekil 4. 10. Örneklerin total protein konsantrasyonu (mg/ml) ortalamalarına ait grafik (WT: Yabanıl tip AVP, SDM1: G45C mutant, SDM2: 207_209delGGC mutant, SDM3: G88V mutant, pL: içerisinde AVP-NPII geni bulunmayan plazmid).

4.4.2. AVP Miktarlarının Radioimmunoassay (RIA) Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

RIA yöntemi sonucunda, örneklerin hücre kültürü süpernatantlarındaki AVP miktarı pg/ml şeklinde belirlenmiştir. Örneklere ait elde edilen bu değerler, her bir örneğin total protein miktarı değerine (mg/ml) bölünerek, örneklere ait mg hücre proteini başına pg AVP değerleri (pg/mg) hesaplanmıştır. Ardından veriler Minimum-Maksimum Normalizasyon (Feature Scaling) yöntemi kullanılarak 0-1 değerleri

arasına yayılarak normalize edilmiştir. RIA yöntemi birbirinden bağımsız 3 set şeklinde gerçekleştirilmiştir ve her bir örnek için 3 adet AVP miktar değerinin ortalamasına ilişkin sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir. Buna göre, hücre kültür süpernatantında en fazla AVP miktarına (ortalama \pm SEM) yabancı tip örneği sahiptir ($0,92 \pm 0,04$ pg/mg). Mutant *AVP-NP11* gen dizileri ile transfekte olan hücrelerden salınan AVP miktarlarındaki sıralama ise, 207_209delGGC mutanıtı ($0,78 \pm 0,05$), G45C mutanıtı ($0,40 \pm 0,20$), G88V mutanıtı ($0,31 \pm 0,10$) şeklinde iken, kontrol için analiz edilen pL örneği için $0,05 \pm 0,02$ değeri elde edilmiştir.

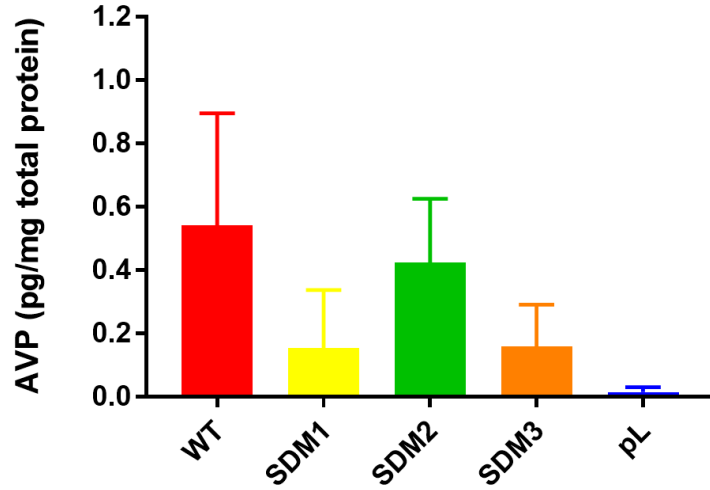


Şekil 4. 11. Transfekte Neuro2A hücrelerinin hücre kültürü ortamına salgılamış oldukları AVP'nin RIA analizi ile ölçüm sonuçlarının sütun grafiği ile gösterimi (WT: Yabancı tip AVP, SDM1: G45C mutanıt, SDM2: 207_209delGGC mutanıt, SDM3: G88V mutanıt, pL: içerisinde *AVP-NP11* geni bulunmayan plazmid).

4.4.3. AVP Miktarlarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

ELISA yöntemi sonucunda örneklerin hücre kültürü süpernatantlarındaki AVP miktarı da pg/ml şeklinde belirlenmiştir. RIA yönteminde olduğu gibi, pg/ml şeklinde belirlenen AVP değerleri daha sonra her bir örneğin kendine ait total protein miktarı değerine (mg/ml) bölünmesi ile, örneklere ait mg başına pg AVP değerleri (pg/mg) hesaplanmıştır. Ardından veriler Minimum-Maksimum Normalizasyon (Feature Scaling) yöntemi kullanılarak 0-1 değerleri arasına yayılarak normalize edilmiştir ve her bir örnek için 5 adet AVP miktar değerinin ortalamasına ilişkin sonuçlar Şekil 4.12’de verilmiştir. Buna göre, hücre kültür süpernatantında en fazla AVP miktarına

(ortalama \pm SEM) yabancı tip örneği sahiptir ($0,54 \pm 0,15$ pg/mg). Mutant *AVP-NP11* gen dizileri ile transfekte olan hücrelerden salınan AVP miktarlarındaki sıralama, 207_209delGGC mutanıtı ($0,42 \pm 0,09$), G88V mutanıtı ($0,16 \pm 0,05$), G45C mutanıtı ($0,15 \pm 0,08$) şeklinde iken, kontrol için analiz edilen pL örneği için $0,01 \pm 0,01$ değeri elde edilmiştir.

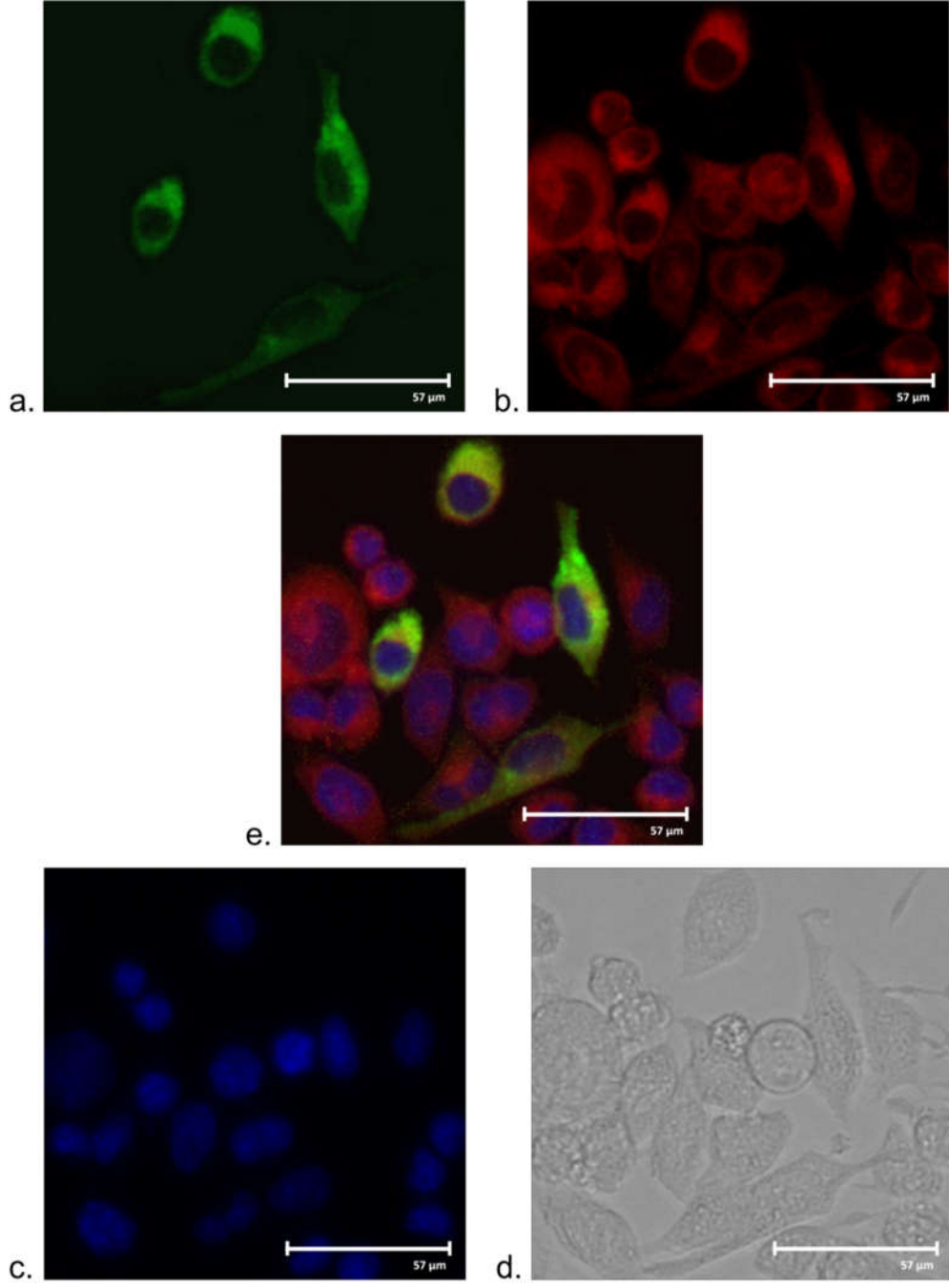


Şekil 4. 12. Transfekte Neuro2A hücrelerinin hücre kültürü ortamına salgılamış oldukları AVP'nin ELISA analizi ile ölçüm sonuçlarının sütun grafiği ile gösterimi (WT: Yabancı tip AVP SDM1: G45C mutanıt, SDM2: 207_209delGGC mutanıt, SDM3: G88V mutanıt, pL: içerisinde *AVP-NP11* geni bulunmayan plazmid).

4.5. Neuro2A Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar

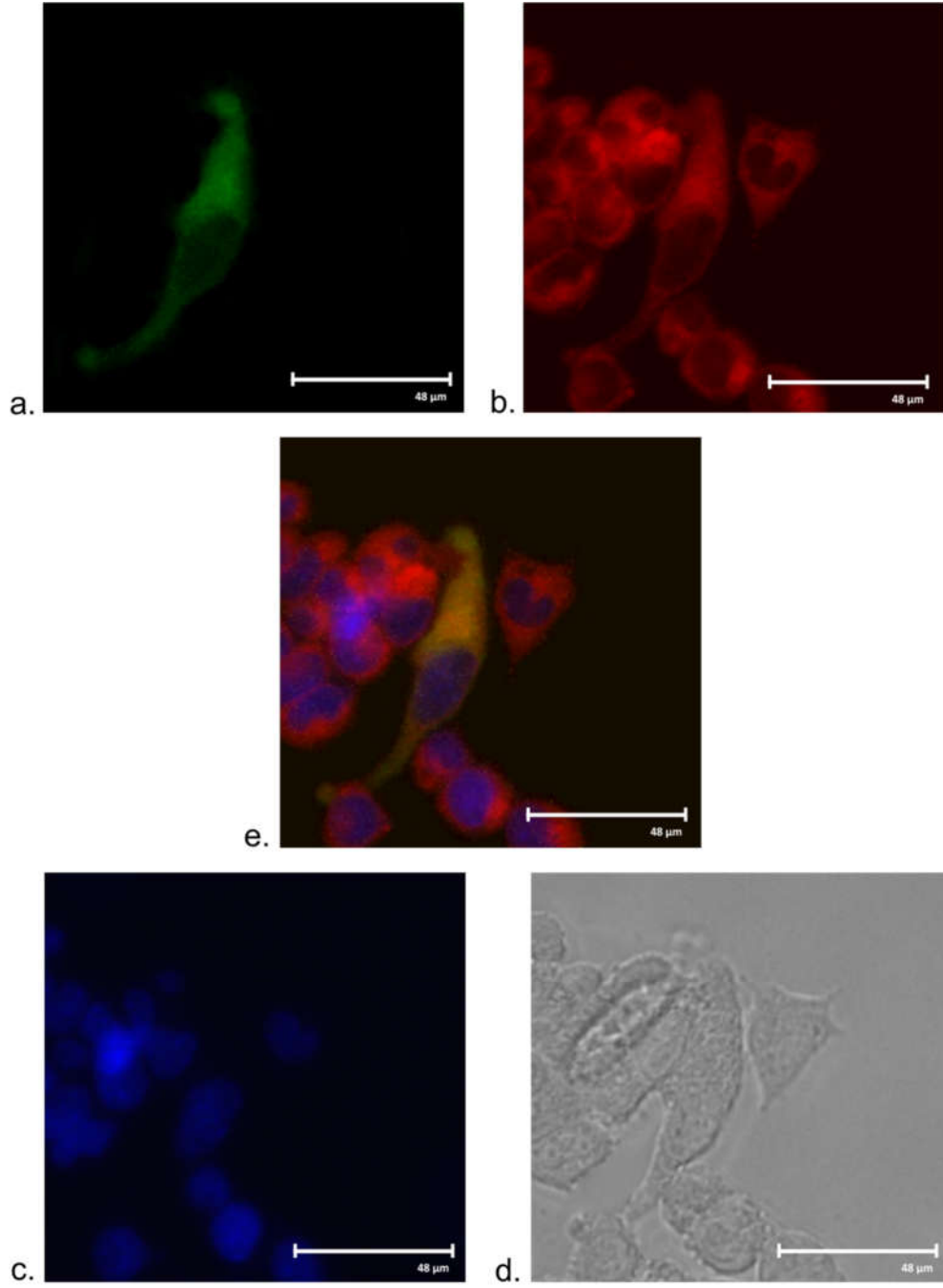
AVP-NP11 genini içeren dizinin EGFP ile işaretli olması nedeniyle, AVP proteinleri mikroskop altında yeşil renkte görüntülenmiştir. Hücre içerisinde ER ise, ER-Tracker™Red (BODIPY® TR Glibenclamide) (Thermo Fisher Scientific) ile kırmızı renkte görüntülenirken, hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte görüntülenmiştir.

Boyama yöntemi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'daki gibidir.



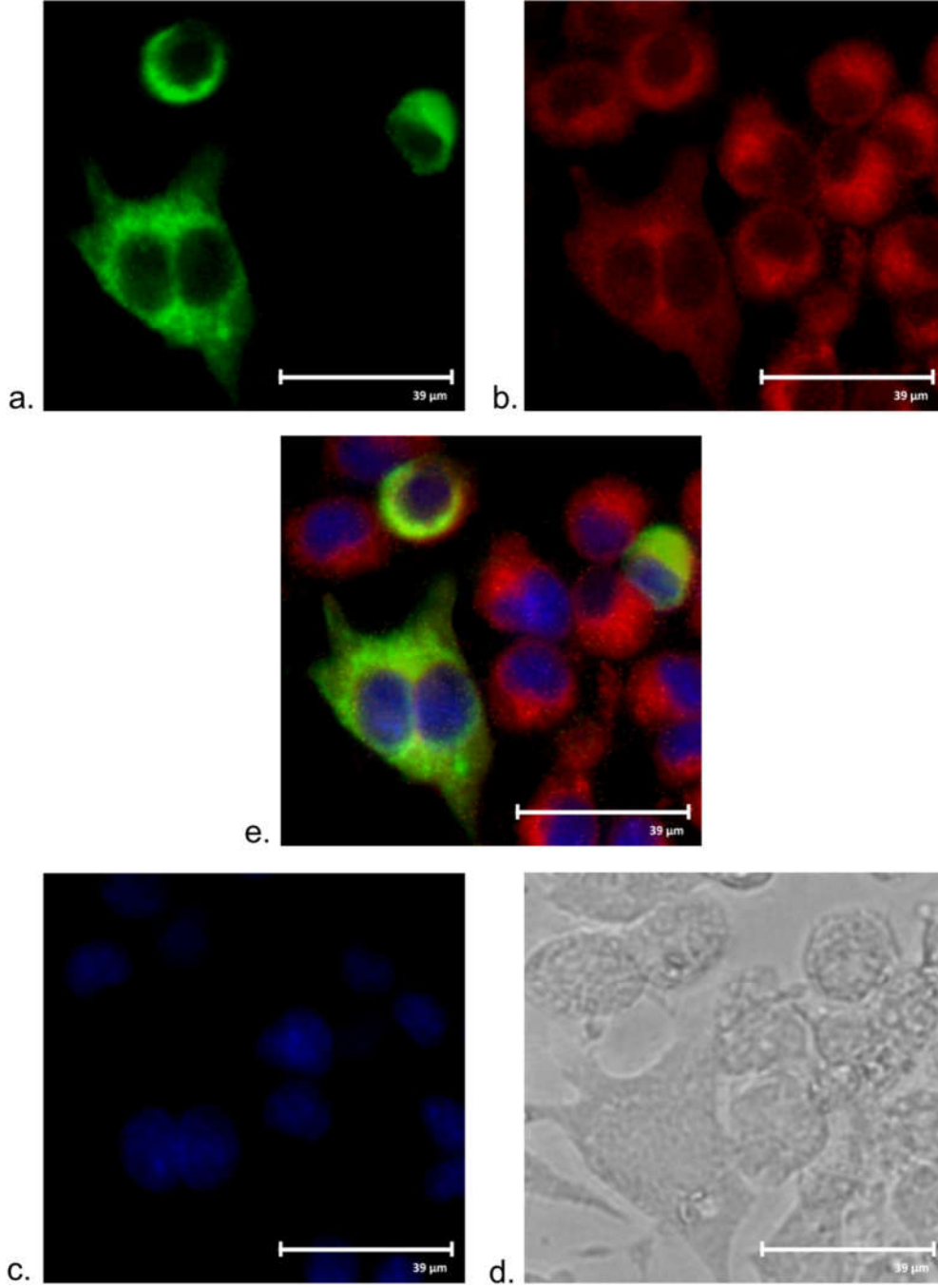
Şekil 4. 13. Yabancıl tip AVP ifade eden Neuro2A hücresi.

a. EGFP ile işaretlenmiş AVP, b. ER-izleyici ile boyanan görüntü, c. DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, d. Beyaz ışık altındaki görüntü, e. Birleştirilmiş görüntü.



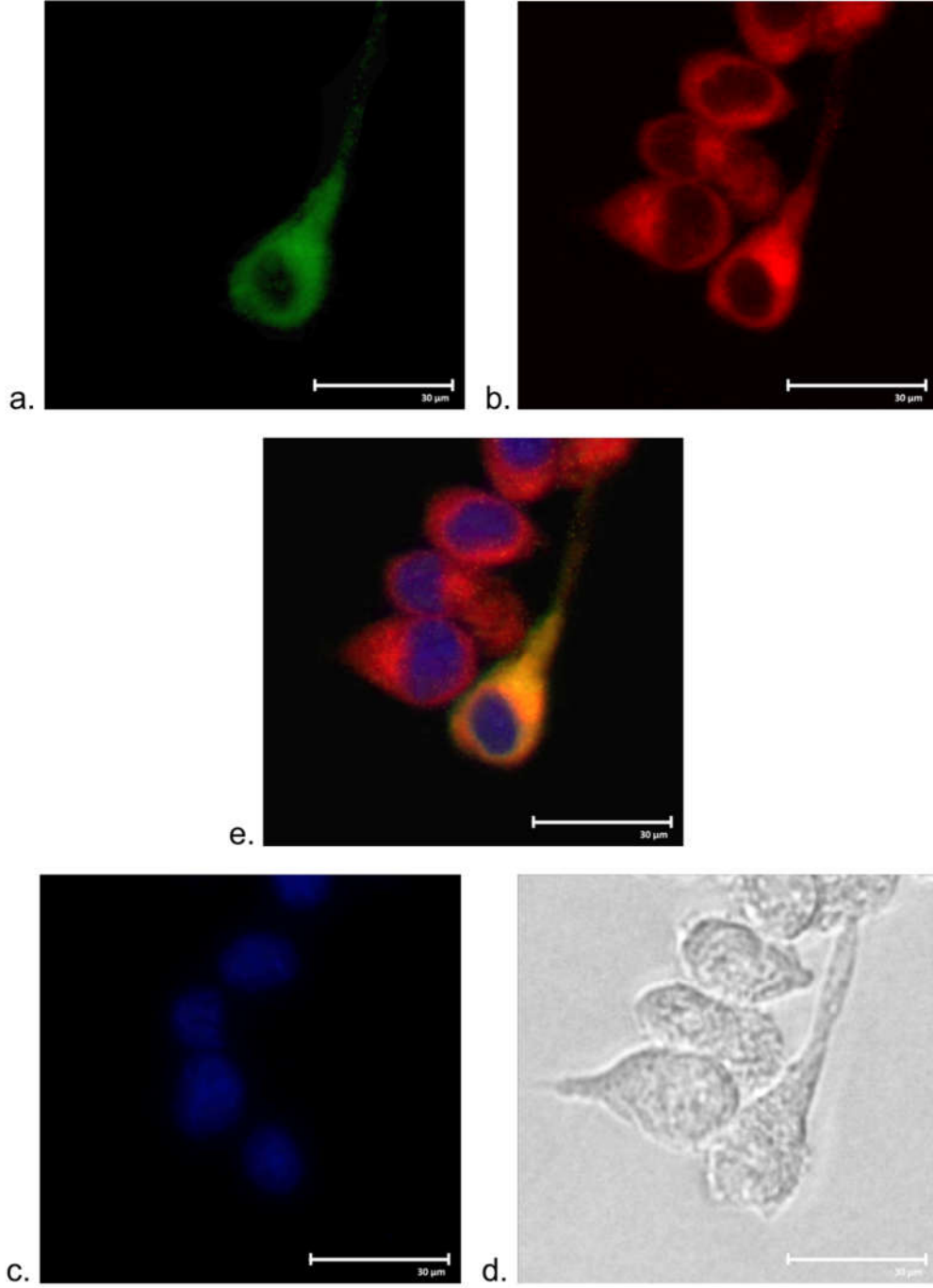
Şekil 4. 14. G45C mutant AVP ifade eden Neuro2A hücresi.

a. EGFP ile işaretlenmiş AVP, b. ER-izleyici ile boyanan görüntü, c. DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, d. Beyaz ışık altındaki görüntü, e. Birleştirilmiş görüntü. Mutant proteini ifade eden hücrede, ER'nin kırmızı rengi ile mutant proteinin (yeşil) çakıştığı bölgeler turuncu/sarı olarak görülmektedir.



Şekil 4. 15. 207-209delGGC mutant AVP ifade eden Neuro2A hücresi.

a. EGFP ile işaretlenmiş AVP, b. ER-izleyici ile boyanan görüntü, c. DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, d. Beyaz ışık altındaki görüntü, e. Birleştirilmiş görüntü.



Şekil 4. 16. G88V mutant AVP ifade eden Neuro2A hücresi.

a. EGFP ile işaretlenmiş AVP, b. ER-izleyici ile boyanan görüntü, c. DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, d. Beyaz ışık altındaki görüntü, e. Birleştirilmiş görüntü. Mutant proteini ifade eden hücrede, ER'nin kırmızı rengi ile mutant proteinin (yeşil) çakıştığı bölgeler turuncu/sarı olarak görülmektedir.

4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları

4.6.1. RIA Yöntemine Ait Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

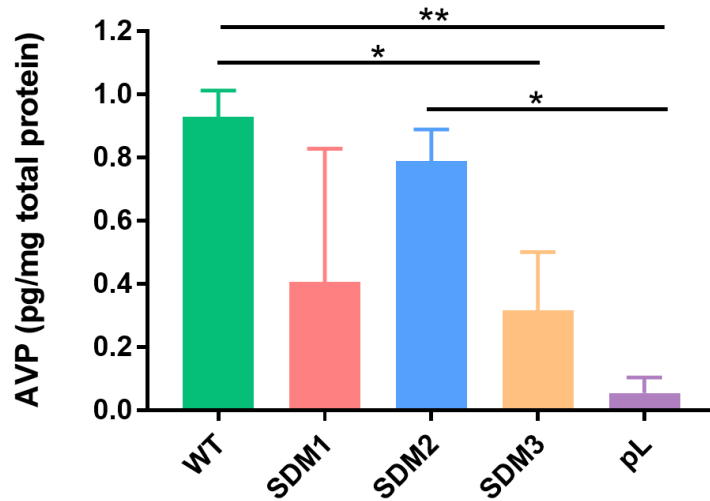
■ RIA yöntemi içerisindeki her gruba (WT, SDM1, SDM2, SDM3, pL) ait verilerin, Shapiro Wilk Normallik Testi sonucunda normal dağılım gösterdiği gözlenmiştir (p değerleri > 0.05).

■ Veriler normal dağılım gösterdiğinden dolayı, gruplar (yabanıl tip ve mutant tipler) arasında fark olup olmadığı parametrik testlerden Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova) ile değerlendirildiğinde, gruplara ait AVP miktar ortalamaları arasında fark olduğu bulunmuştur (p değerleri < 0.05).

■ Gruplar arasındaki farkın hangi gruplar arasında olduğu ve anlamlılık düzeyi Tukey çoklu karşılaştırma yöntemi ile değerlendirildiğinde;

- WT - SDM3 (p=0,037)
- WT - pL (p= 0,004)
- SDM2 - pL (p=0,013)

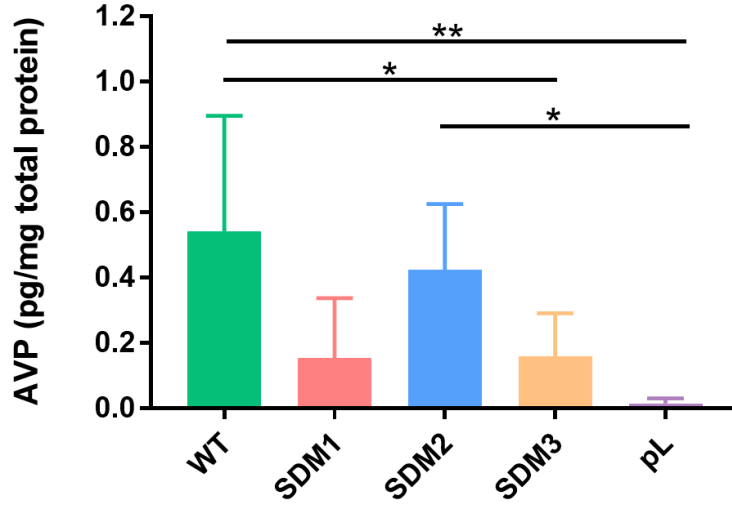
grupları arasında fark bulunmuş ve istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4. 17. RIA yöntemi içerisindeki gruplara ait AVP miktarı ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesi (WT: Yabanıl tip AVP SDM1: G45C mutant, SDM2: 207_209delGGC mutant, SDM3: G88V mutant, pL: içerisinde AVP geni bulunmayan plazmid) (*anamlı fark vardır, **daha fazla anlamlı fark vardır).

4.6.2. ELISA Yöntemine Ait Verilerin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

- ELISA yöntemi içerisindeki her gruba (WT, SDM1, SDM2, SDM3, pL) ait veriler normal dağılım göstermektedir (p değerleri > 0.05).
 - RIA yöntemine ait verilerde olduğu gibi, ELISA yöntemine ait veriler de normal dağılım gösterdiğinden dolayı, gruplar (yabanıl tip ve mutant tipler) arasındaki fark parametrik testlerden Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova) ile değerlendirilmiş ve gruplara ait AVP miktar ortalamaları arasında fark olduğu bulunmuştur (p değerleri < 0.05).
 - Gruplar arasındaki farkın hangi gruplar arasında olduğu ve anlamlılık düzeyinin Tukey çoklu karşılaştırma yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda;
 - WT - pL (p= 0,006)
 - SDM2 - pL (p=0,041)
- grupları arasında fark bulunmuş ve istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.18'de verilmiştir.



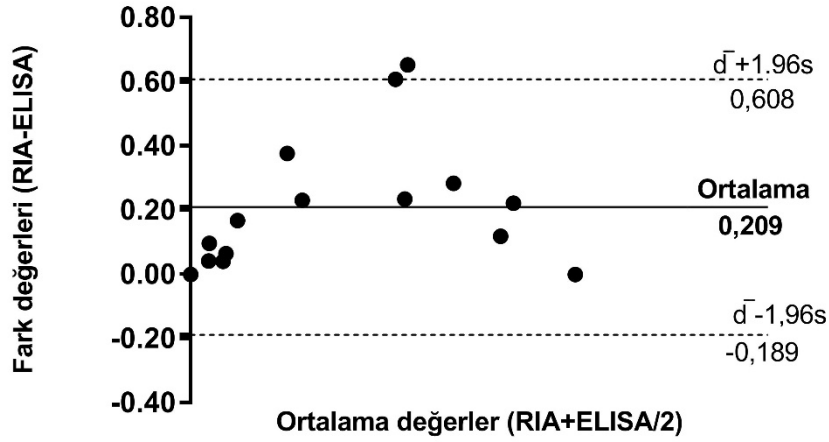
Şekil 4. 18. ELISA yöntemi içerisindeki gruplara ait AVP miktarı ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesi (WT: Yabanıl tip AVP SDM1: G45C mutant, SDM2: 207_209delGGC mutant, SDM3: G88V mutant, pL: içerisinde AVP geni bulunmayan plazmid) (*anlamlı fark vardır, **daha fazla anlamlı fark vardır).

4.6.3. RIA ve ELISA Yöntemleri Arasındaki Uyumun Bland-Altman İstatistiksel Yöntemi ile Değerlendirilmesi

RIA ve ELISA yöntemlerinin kendi aralarında yeterince uyumlu olup olmadıklarının bir diğer ifade ile, ELISA yönteminin RIA yöntemi yerine kullanılabilirliğinin belirlenmesi için gerçekleştirilen Bland-Altman Yöntemine ilişkin saçılım grafiğinin çizilebilmesi için hesaplanan istatistiksel değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir. İki yöneme ait fark değerlerinin normal dağılım gösterdiği görülmüştür ($p=0.083$). Hesaplanan istatistiksel değerlere göre çizilen Bland-Altman saçılım grafiği ise Şekil 4. 19'daki gibidir.

Çizelge 4. 1. Bland-Altman Yöntemine İlişkin İstatistiksel Değerler.

Farkların Ortalaması (\bar{d})	Farkların Standart Sapması (s)	Alt Sınır	Üst Sınır
0,209	0,203	-0,189	0,608



Şekil 4. 19. Bland-Altman saçılım grafiği (d̄: farkların ortalaması, s: fark değerlerine ait standart sapma).

Şekil 4.9'da yer alan Bland-Altman saçılım grafiğinde de görüldüğü üzere, fark değerlerinin genellikle sıfır değerine yakın olduğu (0,209), bu değerlerin %95'inin güven aralıkları içerisinde bulunduğu ve %95 güven aralıkları çizgilerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Ailesel nörohipofizyal diabetes insipidus, *AVP-NP11* geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu hastalığa neden olduğu bilinen, yayınlanmış mutasyonların sunulduğu HGMD veri tabanında *AVP-NP11* gen bölgesi için 75 adet farklı mutasyon bulunmaktadır. Bu mutasyonlar genellikle genin ikinci ekzonunda yer almaktadır ve bunların büyük çoğunluğu (62 adet) tek baz değişiklikleri sonucu oluşan yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlardır [75, 78, 79]. Yapılan bu tez çalışması kapsamında, diabetes insipidus tanılı hastaların *AVP-NP11* geninde tanımlanmış üç farklı mutasyonun fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu mutasyonlardan G45C ve G88V mutasyonları tek baz değişiklikleri sonucu oluşan yanlış anlamlı mutasyon grubunda iken, 207_209delGGC mutasyonu ise küçük delesyon grubu mutasyonlara örnektir. Mutasyonların üçü de genin ikinci ekzonunda NP11'yi kodlayan kısımda yer almaktadır ve bu üç mutasyonun da tespit edildiği hastalar, ailesel nörohipofizyal DI'nin otozomal baskın kalıtım özelliğinden dolayı sahip oldukları mutasyonlar açısından heterozigottur. Bu mutasyonlar için gerçekleştirilen fonksiyonel analiz çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve bu verilerin literatürde yapılan benzer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırması aşağıda yer almaktadır.

5.1. G45C Mutasyonuna İlişkin Fonksiyonel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirildiği mutasyonlardan biri olan G45C mutasyonu, daha önce grubumuz tarafından yapılan çalışmalar ile literatüre kazandırılmıştır [88]. Bu mutasyon, *AVP-NP11* geninin 2. ekzonunda bulunan NP11'yi kodlayan dizide (45. kodonda) yer almaktadır. Tek baz değişimi (**GGC**→**TGC**) sonucu oluşan yanlış anlamlı mutasyondur; dizideki tek baz değişikliği, alifatik radikal gruba sahip nonpolar yapıdaki glisin amino asidinin yerine yüksüz radikal gruba sahip polar yapıdaki sistein amino asidinin gelmesi ile sonuçlanmaktadır. Protein dizisindeki amino asit değişimi, öncül hormon yapısının katlanarak fonksiyonel üç boyutlu yapısını almasında önemli bir yere sahiptir. Bu öncül yapının ER içerisinde doğru bir şekilde katlanmasının ise, yapıda kritik olarak yerleşen amino asitlerin dizideki konumuna bağlı olduğu belirtilmektedir. Bu amino

asitlerden biri, molekülün serbestçe dönmesini sağlayan glisin kalıntısıdır. Bir diğeri sistein kalıntısıdır, çünkü öncül hormon yapısı katlanırken dizide bulunan sistein kalıntıları arasında disülfid bağları oluşarak öncül hormonun konformasyonu stabilize edilmektedir ve yabanıl tip öncül hormon yapısında toplam 8 adet disülfid bağı bulunmaktadır [11, 87]. G45C mutasyonu sonucunda oluşan mutant proteinde diziden glisin kalıntısının eksilmesi ve nonpolar yapıdaki glisin amino asidinin polar yapıdaki sistein amino asidine dönüşümü ile proteinin (hormonun) yapısındaki polarite değişikliği sonucu mutant proteinin doğal konformasyonunu kazanmasında hatalara neden olabileceği ve yapıya fazladan bir adet sistein amino asidi girmesi sonucu disülfid bağların yanlış şekilde oluşabilmesinden dolayı öncül hormonun katlanması ve stabilizasyonunda hatalara neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

Mutant proteinler için gerçekleştirilen fonksiyonel analiz çalışmalarından RIA analizi sonucuna göre, G45C mutantı yabanıl tip ile karşılaştırıldığında, yabanıl tipe ($0,92 \pm 0,04$ pg/mg) göre hücre besiyeri süpernatantında daha düşük seviyede ($0,40 \pm 0,20$ pg/mg) AVP miktarına sahiptir (Şekil 4.11). Diğer mutantlar ile karşılaştırıldığında ise, G88V mutantının sahip olduğu AVP miktarına ($0,31 \pm 0,10$ pg/mg) yakın olduğu görülmektedir. Tez çalışması kapsamında RIA yöntemine alternatif bir yöntem olarak denenen ELISA yöntemi sonuçları da benzer sonuçlar içermektedir (Şekil 4.12). Bu yöntemde göre de, G45C mutantı ($0,15 \pm 0,08$ pg/mg) yabanıl tip örneğine ($0,54 \pm 0,15$ pg/mg) göre hücre besiyeri süpernatantında daha düşük seviyede AVP miktarına sahiptir. Diğer mutantlar ile karşılaştırma yapıldığında, en düşük AVP miktarına sahip olan mutantın, G45C mutantı olduğu görülmektedir. Bunun yanında G88V mutantı ($0,16 \pm 0,05$ pg/mg) ile oldukça yakın AVP miktarına sahip olduğu da dikkat çekmektedir. Bu durum da gerçekleşen mutasyonların AVP hormonunda benzer etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Mutasyonlar sonucunda öncül hormon yapısındaki amino asitlerin değişimi sonucu proteinin yani hormonun ER'de katlanması sırasında oluşan hatalar, mutant proteinin ER'den taşınmasını ve hücreden salınmasını etkileyebilmektedir [15, 103-104]. Bir diğer fonksiyon analiz çalışmalarından olan floresan görüntüleme çalışmalarının sonuçları da ELISA ve RIA analiz sonuçlarını destekler niteliktedir. Şekil 4.14'te de görüldüğü gibi, ER'nin kırmızı rengi ile mutant proteinin yeşil renginin çakıştığı bölgeler turuncu/sarı olarak görülmektedir. Bu sonuca bağlı

olarak, mutant proteini ifade eden Neuro2A hücresi içerisinde G45C mutant proteinin ER'de takılı kalmış olduğu yorumu yapılmıştır.

5.2. 207-209delGGC Mutasyonuna İlişkin Fonksiyonel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirildiği bir diğer mutasyon olan 207-209delGGC mutasyonu da daha önce grubumuz tarafından yapılan çalışmalar ile literatüre kazandırılmış mutasyonlardan biridir [84]. Bu mutasyon, küçük delesyon grubu mutasyonlara örnektir. *AVP-NPII* geninin 2. ekzonunda bulunan NPII'yi kodlayan dizide 3 baz çiftlik delesyonun gerçekleşmesi sonucu oluşmuştur. Mutasyon, dizide treonin amino asidini kodlayan 69. kodonun (ACG) üçüncü nükleotidi olan G nükleotidi ile birlikte alanin amino asidini kodlayan 70.kodonun (GCT) ilk iki nükleotitidi olan GC nükleotidlerinin (GGC) delesyonu sonucu meydana gelmekte ve delesyonun ardından dizide çerçeve kayması görülmemektedir. Çünkü 69. kodonda delesyondan sonra geriye kalan AC nükleotidi ile 70.kodonda T nükleotidinin birleşmesi ile ACT kodonu treonin amino asidini kodlamaktadır, yabancı tip dizide de 69. kodon treonin amino asidini kodlamaktadır. Yabancı tip dizide treonin amino asidinden sonra sırasıyla alanin ve glutamin amino asitleri gelmektedir. 207-209delGGC mutant dizisinde ise treonin amino asidinden sonra gelen alanin amino asidi diziden çıkmış olmakta ve amino asit dizisi treonin amino asidinden sonra glutamin amino asidi olarak devam etmektedir. Sonuçta çerçeve kayması görülmemekte ve yabancı tip dizi ile mutant dizi arasındaki tek fark olarak sadece alifatik radikal gruba sahip ve nonpolar yapıdaki alanin amino asidi delesyona uğramaktadır (Şekil 5.1).

Fonksiyonel analiz çalışmalarından RIA analizi sonucuna göre, 207-209delGGC mutantı ($0,78 \pm 0,05$ pg/mg) hücre besiyeri süpernatantında yabancı tipte ($0,92 \pm 0,04$ pg/mg) görülene yakın seviyede AVP miktarına sahip iken, diğer mutantlara göre de oldukça yüksek AVP miktarına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). ELISA yönteminde elde edilen benzer sonuçlarda da, bu mutantın ($0,42 \pm 0,09$ pg/mg) yabancı tipte ($0,54 \pm 0,15$ pg/mg) oldukça yakın miktarda AVP hormonuna sahip olduğu Şekil 4.12'de görülmektedir. Şekil 4.15'deki floresan görüntüleme çalışma sonucu da, RIA ve ELISA olmak üzere her iki yöntemin sonucunu

desteklemektedir. Şekilde, yabancı tip örneğinde olduğu gibi (Şekil 4.13), mutant proteinin hücrenin ER kısmında takılı kalmış olabileceğini belirten herhangi bir turuncu veya sarı renk oluşumu görülmezken, mutant proteini ifade eden Neuro2A hücrelerinin tüm kısımları yeşil renge görülmektedir.

a.	193	TGCTTCGTGGGCACGGCTGAGGCGCTGCGCTGC	225	Yabancı DNA Dizi
b.	65	Cys-Phe-Val-Gly-Thr-Ala-Glu-Ala-Leu-Arg-Cys	75	Yabancı Amino Asit Dizi
↓				
c.	193	TGCTTCGTGGGCACGGCTGAGGCGCTGCGCTGC	225	Yeşil bölge: delesyon
d.	193	TGCTTCGTGGGCAC [Yeşil] TGAGGCG CTGCGCTGC	225	Mutant DNA Dizi
e.	193	TGCTTCGTGGGCACTGAGGCGCTGCGCTGC	225	Mutant DNA Dizi
f.	65	Cys-Phe-Val-Gly-Thr-Glu-Ala-Leu-Arg-Cys	75	Mutant Amino Asit Dizi
↓				
g.	65	Cys-Phe-Val-Gly-Thr-Ala-Glu-Ala-Leu-Arg-Cys	75	Yabancı Amino Asit Dizi
h.	65	Cys-Phe-Val-Gly-Thr-Glu-Ala-Leu-Arg-Cys	75	Mutant Amino Asit Dizi

Şekil 5. 1. 207-209delGGC mutantına ait *AVP-NP11* DNA ve amino asit dizilerinin gösterimi ve yabancı tipe ait diziler ile karşılaştırılması. Şekilde *AVP-NP11* DNA dizisinin 193-225 nükleotitleri arasındaki bölge ve bu bölgeye karşılık gelen amino asit dizisi (65-75 kodonları arası) gösterilmektedir. a. Yabancı *AVP-NP11* DNA dizisi b. Yabancı dizinin kodlamış olduğu yabancı amino asit dizisi c. ve d. Yabancı *AVP-NP11* DNA dizisi üzerinde delesyona uğrayan nükleotitlerin yeşil renk ile gösterimi e. Delesyon sonrası oluşan mutant *AVP-NP11* DNA dizisi f. Mutant DNA dizisinin kodlamış olduğu mutant amino asit dizisi g ve h. Yabancı ve mutant *AVP-NP11* DNA dizisinin karşılaştırılması

Not: *AVP-NP11* DNA dizisinde kodonların ve kodonların kodlamış olduğu amino asitlerin takibini kolaylaştırmak amacıyla kodonlar birer aralıkla sarı renk ile işaretlenmiştir. Yabancı tip dizide yer alan ve mutant dizide bulunmayan alanin amino asidi ise mavi renk ile vurgulanmıştır.

Fonksiyonel analiz çalışmalarının her birinden elde edilen sonuçlar birlikte ele alındığında, 207-209delGGC mutanıtı yabancı tip örneği ile oldukça benzer sonuçlara sahiptir. Bu durum da gerçekleşen delesyonun öncül AVP hormonun yapısında, katlanmasında veya hücre içi trafiği sonucu hücreden salınmasında önemli herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Delesyon sonucunda mutant amino asit dizisinde yabancı tip diziden farklı olarak sadece alanin amino asidi bulunmamaktadır.

Tek amino asit eksikliğinin öncül hormonun yapısında ve bu öncül hormonun hücrede işlenerek AVP, NPII ve glikopeptid kısımlarına ayrılarak hücreden salınmasında etkisiz olabileceği sonucuna varılmıştır.

5.3. G88V Mutasyonuna İlişkin Fonksiyonel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirildiği bir diğer mutasyon G88V mutasyonudur. Bu mutasyon, 2008 yılında Melo ve ark. tarafından literatüre kazandırılmış olup [195], grubumuz tarafından yapılan çalışmalar sırasında Diabetes insipidus'lu bir hastada da tanımlanmıştır [107]. G88V mutasyonu, *AVP-NPII* geninin 88. kodonunda meydana gelmiştir, bu da genin 2. ekzonundaki NPII'yi kodlayan diziyeye karşılık gelmektedir. G45C mutasyonunda olduğu gibi, tek baz değişimi (GGC→GTC) sonucu oluşan yanlış anlamalı mutasyondur. Dizideki tek baz değişikliği sonucunda, alifatik radikal gruba sahip nonpolar yapıdaki glisin amino asidi yine aynı özelliklere sahip olan valin amino asidine dönüşmüştür. Glisin amino asidi küçük bir yan zincire sahip iken, valin amino asidi glisine oranla biraz daha büyük dallanmış bir yan zincire sahiptir [209]. Glisin, protein yapılarının oluşmasında kritik öneme sahip bir amino asit olduğundan, diziden glisin amino asidinin eksilmesi öncül proteinin (hormonun) katlanarak fonksiyonel olan doğal konformasyonunu kazanmasında hatalara neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

RIA analizi sonucuna göre, G88V mutant örneği, yabancı tip ve diğer mutantlar içerisinde hücre besiyeri süpernatantında en düşük seviyede AVP miktarına ($0,31 \pm 0,10$ pg/mg) sahip mutanttır. Bunun yanında, bu miktarın G45C mutantın sahip

olduğu AVP miktarına ($0,40 \pm 0,20$ pg/mg) oldukça yakın olduğu Şekil 4.11'de görülmektedir. ELISA yöntemi sonucuna göre ise, G88V mutantından çok küçük bir farkla, hücre besiyeri süpernatantında G45C mutantı en düşük seviyede AVP miktarına ($0,15 \pm 0,08$ pg/mg) sahiptir. G88V mutant örneğine ait AVP miktarının da aslında G45C mutant örneğine eşit sayılabilecek kadar çok yakın bir değere ($0,16 \pm 0,05$ pg/mg) sahip olduğu Şekil 4.12'de görülmektedir. G88V mutant proteinini ifade eden Neuro2A hücrelerinin mikroskop görüntüleri de RIA ve ELISA yöntemlerinin sonucunu desteklemektedir. Şekil 4.16'da görüldüğü üzere, mutant proteini ifade eden Neuro2A hücreesindeki sarı/turuncu renk oluşumu mutant proteinin ER'de takılı kalmış olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç itibarıyla, tez çalışmasında fonksiyon analizleri gerçekleştirilen tüm mutasyonlar ve analiz sonuçları birlikte ele alındığında, delesyon gerçekleşen mutant örneğin yabancıl tip örnekle benzer sonuçlar verdiği ve bu nedenle gerçekleşen delesyonun öncül hormon üzerinde olumsuz herhangi bir etkiye sahip olmadığı yorumu yapılmıştır. Burada delesyonun 3 nükleotit gibi küçük boyutta olması ve sonucunda yabancıl tip amino asit dizisinden farklı olarak sadece alanin amino asidinin eksik olmasının öncül hormonun katlanarak üç boyutlu yapısını alması, buna bağlı olarak hücre içindeki trafiğini çok fazla etkilemediği sonucuna varılmıştır. Diğer yandan, çalışmada yer alan tek baz değişimi (nokta) mutasyonların daha etkili sonuçlara sahip olduğu görülmüştür. Bu mutasyonların sonucunda meydana gelen amino asit değişimlerinin öncül hormonun katlanarak doğal konformasyonunu kazanmasında olumsuz etkiye veya hataya neden olabileceği, yanlış katlanan mutant hormonun hücrede ER kontrol mekanizmasından geçemeyerek ER içerisinde takılı kalabileceği ve böylece bir sonraki basamak olan Golgi aygıtına ilerleyemeyeceği ve haliyle burada gerçekleşen işleme basamakları gerçekleştiremeyeceğinden öncül hormonun AVP, NPII ve glikopeptid kısımlarına ayrılamadığı düşünülmüştür. Sonuçta, AVP'nin, kendisinin taşıyıcı proteini olan NPII'ye bağlanamadığı ve böylece hormonun sentezlendiği hücreden, hücrenin içinde bulunduğu besiyerine salınamadığı yorumu yapılmıştır. Mutant AVP hücre besiyerine salınamadığı için, hücre besiyeri süpernatantlarındaki AVP miktarının ELISA ve RIA ölçümü sonucunda düşük seviyede bulunduğu düşünülmüştür. Besiyerinde düşük seviyede de olsa AVP miktarının ölçülmesi ise, mutant öncül hormonların az bir kısmının ER'den kaçarak işlendiği ve hücre içi trafiği sonucunda

hücreden salınabildiği ve bu durumun yabancı tip hormonda görülenden çok daha yavaş bir hızda gerçekleşmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir [14]. Buna karşılık, herhangi bir mutasyon içermeyen yabancı tip örneğinde, AVP'nin hücre içi trafiğinde herhangi bir hata olmamasından dolayı normal olarak hücre besiyerine salınabildiği ve bu nedenle burada ölçülen AVP miktarının mutant örneklerle göre oldukça yüksek bulunduğu yorumu yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında yer alan G45C ve G88V mutasyonları ile sırasıyla aynı kodonda oldukları tespit edilen G45R (NP11'deki pozisyonu NP14G) ve G88S (NP11'deki pozisyonu NP57G) yanlış anlamlı mutasyonlarına ilişkin fonksiyonel analiz çalışmaları Nijenhuis ve ark. [210] tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında bu mutasyonlara ek olarak, E78G (NP11'deki pozisyonu NP47E) ve G96V (NP11'deki pozisyonu NP65G) mutasyonları da incelenmiş ve tüm mutasyonların hastalığın otozomal baskın tipine neden olduğu belirtilmiştir. Çalışmaya göre, öncül hormonların işleme süreci immünopresipitasyon deneyleri ile araştırılırken, hücreden salınma durumları radyoimmünoanaliz yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada, yapılan tez çalışması ile uyumlu olarak, mutant proteinlerin hücreden salınma seviyelerinin değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca öncül hormonların işleme sürecinde de mutantlar arası fark olduğu belirtilmiştir. Öncül hormonların işlenmesi ve hücreden salınması değerlendirildiğinde, yabancı tip örneğine oranla, en fazla olumsuz etkiye G45R ve G96V mutantlarının sahip olduğu görülmüştür. Bu öncül mutant hormonların vazopressin-NP11 ara ürün yapısına işlenmesinde hata olduğu ve hücreden en düşük seviyede salınan mutant proteinler olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık G88S mutantı nispeten daha olumlu bir işleme ve hücreden salınma sergilemiştir. Ayrıca yapılan immünofloresan çalışmalar ile NP11'ye karşı antikor içeren immüno-boyama sonucunda, yabancı tip proteinin hücre gövdesi boyunca dağılmış halde bulunduğu görüntülenmiştir. Buna karşılık, mutant öncül hormonların genellikle ER'de agregatlar (kümeler) halinde bulunduğu belirtilmiştir. İmmünofloresan çalışmaları sonucu elde edilen verilerin tez çalışmasında yapılan hücre görüntüleme sonuçları ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Tek farklılık olarak, tez çalışmasında mutant proteinlerin biraraya gelerek oluşturduğu agregat yapılarının görüntüleme yönteminin farkından dolayı gözlenemediği düşünülmektedir. Tez çalışması ile Nijenhuis ve ark.'nın çalışması birlikte ele alındığında, aynı kodonda meydana gelen farklı mutasyonların farklı

etkilere sahip olduğu görülmüştür. Tez çalışmasında hücreden salınan en düşük seviyedeki AVP'nin G45C ve G88V mutantlarına ait olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olduğu gözlenirken, Nijenhuis ve ark.'na ait çalışmada [210] G45R ve G96V mutantlarında en düşük seviyede AVP ölçülürken, G88S mutanti daha yüksek miktara sahiptir. Meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan amino asit değişiklikleri öncül hormonda yapısal değişikliklere neden olmakta ve bu değişikliğin boyutuna göre öncül hormon katlanması, işlenmesi, hücre içi trafiği ve hücreden salınması etkilenmektedir. Eubanks ve ark. [211] tarafından DI hastalığına neden olan çeşitli mutasyonların (G17V, G57S, G57R) NPII'nin katlanma ve fonksiyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada da bu veriler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada, mutasyonların öncül hormonun konformasyonel stabilitesini ve katlanma verimliliğini azaltacak yapısal sonuçlara sahip olduğu belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında fonksiyon analizleri gerçekleştirilen mutasyonların üçü de ailesel nörohipofizyal DI'nin otozomal baskın formuna neden olmaktadır. Bu hastalığın otozomal baskın formuna neden olan ilk mutasyonun (G88S) 1991 yılında tespit edilmesinin ardından [106], yapılan çalışmalarla birçok mutasyon tespit edilmiştir ve edilmeye devam etmektedir [105, 212-215]. Bu mutasyonların hastalığın patogenezi için oluşturduğu etki ve bu patogeneizde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması için çeşitli çalışmalar da yapılmıştır [19, 112-113, 116, 216-217]. Çalışmalardan elde edilen sonuca göre, hastalığın otozomal baskın formuna neden olan mutasyonlar, sentezlenen mutant öncül hormonların yanlış katlanmasına, yanlış katlanan proteinlerin ER'de birikerek sitotoksik protein kümeleri oluşturmasına sebep olmaktadır. Hücre için toksik etkilere sahip bu protein kümeleri, sentezlenmiş oldukları magnoselüler hücrelerin fonksiyon kaybına yol açarak bu hücrelerin ölümünü tetiklemesine ve böylece ilerleyen nöron kaybına neden olmaktadır [112-113, 216-217]. Ayrıca, ER'de protein kümeleri şeklinde biriken mutant öncül hormonların, yabanıl tip öncül hormon ile heterodimer yapısı oluşturdukları da belirtilmiştir [18-19, 116]. Bu durumda mutant öncül hormon, yabanıl tip öncül hormonun da işlenmesini engellemekte, onun hücre içi trafiği ve hücreden salınması üzerinde baskın negatif bir etkiye sahip olmaktadır. Yapılan tez çalışmasında fonksiyonel analizleri gerçekleştirilen 3 mutant örneğinden 2'sinin de yanlış katlanma sonucu ER'de tutuklu kalmasına ilişkin sonucun literatürde elde edilen bu veriler ile tutarlı sonuçlara sahip olduğu görülmektedir. Bunun dışında, tez

çalışması kapsamında hücre ölümü veya mutant ve yabanıl tip arasında heterodimer yapının oluşup oluşmadığını incelemeye yönelik herhangi bir analiz yer almadığından bu konuda herhangi bir yorum yapılamamıştır.

Ailesel nörohipofizyal DI'nin otozomal baskın formuna neden olan bir sinyal peptid mutasyonu ve bu mutasyonu taşıyan genin hücredeki etkilerinin araştırıldığı çalışma sonucunda da tez çalışması ile benzer sonuçlar elde edilmiştir [101]. *AVP-NP11* geninin 1. ekzonunda yer alan sinyal peptidi kodlayan dizide meydana gelen nokta mutasyonu sonucu alanin amino asidi treonin amino asidi ile yer değiştirmiştir. Mutant genin, transfekte edildiği hücreler üzerindeki etkisi AVP miktar ölçümleri, immünositokimya ve western blot yöntemleri ile araştırılmıştır. Mutant geni ifade eden hücrelerde, yabanıl tip geni ifade eden hücrelere oranla AVP miktarının 8 kat kadar azaldığı RIA yöntemi ile belirlenmiştir. Western blot analizleri sonucunda, mutant gende sinyal peptidin kesilmeyerek korunduğu mutant ve yabanıl tip protein bantlarının ağırlık farkından anlaşılmıştır. Ayrıca mutant öncül hormonların ER'de biriktiği yapılan immünositokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda *AVP-NP11* gen dizisinde meydana gelen mutasyonun, sinyal peptidin kesilip çıkarılma sırasındaki hatalardan dolayı sinyal peptidini koruyan anormal bir öncül hormon oluşumuna neden olduğu ve bu öncül hormonun ER'de birikerek, daha fazla işleme ve hücreden salınma olayları için nörosalgı veziküllerine taşınmadığı yorumu yapılmıştır. Mutant geni ifade eden hücrelerde, hücreden salınan AVP miktarının azalması ve bu mutant proteinlerin hücre içinde genellikle ER'de yoğun bir şekilde görülmesi tez çalışmasından elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Siggaard ve ark. [101] tarafından yapılan bu çalışma ve tez çalışmasındaki mutasyonların *AVP-NP11* geni üzerindeki bulunduğu ekzonlar farklı olmasına rağmen benzer sonuçlar elde edilmesinin, mutasyonlar sonucu oluşan anormal mutant öncül hormonların hücre içindeki trafiklerinin genelde aynı şekilde ilerlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ailesel nörohipofizyal DI'nin otozomal baskın ile resesif formuna neden olan mutasyonlar (sırasıyla Y21H ve P26L) sonucu oluşan mutant öncül hormonların hücre içindeki trafiklerini karşılaştırmak için Christensen ve ark. tarafından bir çalışma yapılmıştır [118]. Mutasyonlardan Y21H mutasyonu, 9 amino asitten oluşan AVP hormonun 2. pozisyonunda amino asit değişimine neden olurken, P26L mutasyonu hormonun 7. pozisyonunda amino asit değişimine neden olmaktadır. Çalışmanın sonucunda

Y21H mutant öncül hormonunun ER'den taşınmasının ve dolayısıyla normalde ER'den çıktıktan sonra gerçekleşen işleme sürecinin bozularak ER'de takılı kaldığı, buna rağmen P26L mutantının hücre içi trafiğinde herhangi bir hata olmadığı ve ER içinde takılı kalmadığı belirtilmiştir. Fakat hücrelerden salınan AVP miktarları RIA analizi ile hücre kültürü ortamında belirlendiğinde, her iki mutanta ait AVP miktarının yabancıl tipe oranla azaldığı gösterilmiştir. Buna göre, P26L mutantının hücre içi trafiğinde herhangi bir hata olmamasına rağmen, son işleme basamağı olan AVP ve NPII peptidlerine ayrılması basamağının mutasyondan etkilendiği belirtilmiştir. Bunun nedeni olarak ise, AVP öncül hormonunda P26L mutasyonunun meydana geldiği bölge olan AVP (hormon) peptidinin karboksil uç kısmının Rose ve ark. [218] tarafından belirtildiği gibi, NPII'nin katlanmasında herhangi bir öneme sahip olmamasıdır. Bunun dışında, yapılan kristal yapı çalışmalarında da belirtildiği üzere, hormonların karboksil uç kısımları nörofizin peptidine bağlanmada çok zayıf katılım göstermektedir [219]. Christensen ve ark. tarafından yapılan bu çalışma ile, hastalığın otozomal baskın formuna neden olan mutasyonların genellikle AVP öncül hormonun NPII peptidinin katlanması ve/veya dimerizasyonu ve sonrasında ER'den taşınması için önemli olan amino asit kalıntılarını değiştiren mutasyonlar olduğu hipotezi desteklenmiş olmaktadır. Hastalığın otozomal baskın formuna neden olan 3 farklı mutasyonun incelendiği tez çalışmasında da, 207_209delGGC mutasyonu hariç diğer 2 mutasyonun (G45C ve G88V) fonksiyonel analiz çalışmalarının sonucu bu hipotezi destekler niteliktedir.

Tez çalışması kapsamında nokta (tek baz değişimi) mutasyonu sonucu meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlardan iki tanesinin (G45C ve G88V) fonksiyonel analizleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde de ailesel nörohipofizyal DI'ye neden olan ve tek baz değişimi sonucu oluşan yanlış anlamlı mutasyonlara ilişkin benzer çalışmalar tarandığında, farklı mutasyonların da AVP öncül hormonu üzerinde genel olarak benzer etkilere sahip olduğu görülmüştür. Christensen ve ark. [14] yapmış olduğu bir çalışmada, otozomal dominant ailesel nörohipofizyal DI'ye neden olan *AVP-NP11* genindeki iki farklı nokta mutasyonun (Y21H ve V67A) AVP prohormonun hücresel taşınmasını nasıl etkilediği insan teratokarsinom (NTera2/D1) ve fare nöroblastoma (Neuro2A) hücre hatları kullanılarak araştırılmıştır. Çalışılan mutasyonlardan Y21H, *AVP-NP11* geninin AVP peptidini kodlayan dizide bulunurken, V67A mutasyonu, tez çalışmasında incelenen mutasyonlara benzer

olarak, taşıyıcı proteini (NPll) kodlayan dizide yer almaktadır. Yapılan immünopresipitasyon deneyleri sonucunda mutant prohormonların işlenmesi ve salınmasının yabancı tip prohormona kıyasla azaldığı gösterilirken, RIA analizi sonucunda, NTera2/D1 hücre kültürü ortamında her iki mutanta ait AVP miktarının yabancı tipe oranla büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Konfokal mikroskop görüntülerinde ise, yabancı tip proteinin büyük çoğunluğunun Neuro2A hücrelerinde sitozole dağılmış halde ve nöron hücre uzantılarının uç kısımlarındaki veziküler yapılarda olduğu gözlenirken, her iki mutant prohormonun da genel olarak ER'de lokalize olduğu, V67A mutantının ayrıca ER'nin dış kısmında çekirdek etrafında biriktiği gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ele alındığında, mutasyonların, düzgün bir şekilde katlanamayan ve sonuç olarak ER protein kalite kontrol mekanizmaları tarafından tutulan mutant hormon öncüllerinin üretilmesine yol açtığı ileri sürülmüştür. Christensen ve ark.'nın çalışmadan elde ettiği sonuçlardan RIA analizi ve hücre görüntüleme çalışmalarına ait sonuçlar, tez çalışmasından elde edilen sonuçlarla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Buna karşılık, tez çalışmasında yabancı tip proteinin hücre uzantılarının uç kısımlarındaki veziküler yapılarda gözlenememesinin, görüntülemelerin daha detaylı sonuç veren konfokal mikroskopta yapılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hedrich ve ark. [220] tarafından yapılan bir çalışmada, otozomal baskın ailesel nörohipofizyal DI'ye neden olan *AVP-NPll* genindeki çeşitli mutasyonlar (G96D, C98G, A159T) incelenmiştir. Bu mutasyonlardan G96D ve C98G, NPll'yi kodlayan 2. ekzonda de yer alırken, A159T glikopeptidi kodlayan 3. ekzonda yer almaktadır. Yapılan RIA analizi sonucunda, G96D ile C98G mutantı transfekte edilmiş hücrelerin besiyeri süpernatantlarında AVP miktarının yabancı tiptekine oranla büyük ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçları destekler nitelikte olan immünositokimyasal analiz sonucunda, mutant AVP-NPll proteinlerinin ER'nin bulunduğu kısım olan çekirdek etrafındaki sitoplazmada biriktiği gösterilmiştir. A159T mutasyonunu taşıyan hastada, diabetes insipidus hastalığına ilişkin herhangi bir belirti görülmemekle birlikte, hücre besiyeri süpernatantlarındaki AVP miktarı yabancı tipe görülene yakın miktarda olduğu belirtilmiştir. Hücre görüntüleme çalışmalarında da yabancı tip ve A159T mutant AVP-NPll proteinleri Neuro2A hücrelerinin dendritik kısımlarında salgı vezikülleri ile birlikte görülmüştür. Çalışmanın sonucunda 3. ekzondaki A159T mutasyonunun herhangi bir patolojik etkisi olmadığı, hastalığa

neden olan bir mutasyon olmadığı ve nadir bir polimorfizm olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir. İkinci ekzondaki mutasyonların neden olduğu mutant proteinlerin hücre içi trafiklerinde bir hata olduğu, bu nedenle ER'de birikerek salgı granüllerinin de bulunduğu hücrelerin uç kısımlarına taşınmadığı, buna bağlı olarak da AVP salınımında belirgin bir azalma olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 2. ekzonun AVP'nin hücreden uygun bir şekilde salınmasında önemli bir bölge ve mutasyonlar için sıcak nokta (hot spot) olarak değerlendirilmesi önerilmiştir. Hedrick ve ark.'nın çalışmasında, yapılan tez çalışmasına benzer olarak otozomal baskın ailesel nörohipofizyal DI tipi ele alınmış ve hastalığa neden olan mutasyonların genellikle ilgili genin 2. ekzonunda bulunduğu belirtilmiştir. Yapılan RIA ve immünohistokimyasal analizleri sonucunda elde edilen verilerin, tez çalışmasından elde edilen sonuçlarla oldukça benzer olduğu görülmektedir. Bununla birlikte tez çalışmasından farklı olarak konfokal mikroskop ile hücre uzantılarının ucunda salgı granülleri gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında ailesel nörohipofizyal DI'ye neden olan farklı bir mutasyon çeşidi olarak delesyon mutasyonuna (207-209delGGC) ait fonksiyonel analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında incelenen bu küçük delesyon grubu mutasyon (207-209delGGC) hariç, *AVP-NP11* geninde tanımlanmış 5 adet daha küçük delesyon mutasyonu bulunmaktadır [79]. Bunlardan 3 baz çiftlik delesyonlar olan C59Delta/A60W (177-179deltaCGC) ve delGlu47 mutasyonları 2. ekzonda NP11'yi kodlayan dizide bulunmaktadır [221-223]. Tek baz çifti delesyonu (G227del) mutasyonu *AVP-NP11* geninin 1. ekzonunda sinyal peptidi kodlayan kısımda yer alırken, üç baz çiftlik delesyon (CTT veya TTC) aynı ekzonun AVP'yi kodlayan dizinin 3. pozisyonunda bulunmaktadır [108, 224]. *AVP-NP11* geninin 2. intronunda tespit edilen tek nükleotitik (G) delesyon da genin splice site bölgesinde yer almaktadır [98]. Literatürde bu mutasyonlardan sadece *AVP-NP11* geninin 1. ekzonunda AVP'yi kodlayan dizide meydana gelen mutasyona ait fonksiyonel analiz çalışmaları bulunmaktadır [108]. Mutasyon, 3 baz çiftlik delesyon sonucunda AVP'nin 3. pozisyonundaki fenilalanin amino asidinin delesyonu ile sonuçlanmaktadır. Çalışmada, mutant AVP'nin hücredeki ifadesinin sonuçları incelenmiş ve bunun için hücrelerden salınan AVP miktarları RIA yöntemi ile belirlenmiştir. Yabancıl tip AVP ifade eden Neuro2A hücrelerinden ortama AVP'nin salındığı, buna karşılık mutant tip AVP ifade eden hücreler ile transfekte olmayan

hücrelerde AVP'nin hücre kültürü ortamına salınmadığı görülmüştür. Transfekte hücreler tarafından hücre kültürü ortamına salınan nörofizin peptidine ilişkin immüno blot analizlerin sonucunda yabancı tip ve mutant genlerin benzer seviyede ifade edildiği gözlenmiştir. Ayrıca propidyum iyodür ile boyanmış hücrelerin akış sitometrik analizi, mutant AVP'yi ifade eden Neuro2A hücrelerinde, yabancı tip AVP'yi ifade eden hücreler ile karşılaştırıldığında, apoptoz oranının arttığını ortaya koymuştur. Çalışmanın sonucunda mutant protein ürünlerinin hücrelere sitotoksik etkisinin olduğu ve AVP peptidini kodlayan dizideki delesyonun AVP'nin NP1I'ye düzgün bir şekilde bağlanmasını etkilediği belirtilmiştir. Wahlstrom ve ark. [108] tarafından yapılan çalışmada incelenen delesyon ile tez çalışmasında yer alan 207-209delGGC delesyonun her ikisi de 3 baz çiftlik kısa delesyon grubu mutasyonları olmalarına rağmen her iki çalışmada mutant genin hücredeki ifade miktarında farklılıklar gözlenmektedir. Bu farklılığın, delesyonun gen dizisinde ve dolayısıyla amino asit dizisinde meydana gelen değişimin büyüklüğü ve etkisine bağlı olarak öncül hormon yapısındaki farklılıklardan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Bunlara ek olarak, AVP düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan RIA yöntemi yerine ELISA yönteminin kullanılabilirliğini test eden, bir yöntem karşılaştırma analizi olan Bland-Altman analiz sonuçlarına göre, yöntemlere ait fark değerlerinin sifıra yakın olmasından, bu değerlerin %95 güven aralığında kalmasından ve alt-üst güven aralıkları arasındaki farkın az olmasından dolayı ELISA'nın RIA yöntemi yerine kullanılabilceği gösterilmiştir. Diğer bir ifade ile, ELISA yöntemi ile belirlenen AVP değerlerinin, geleneksel kullanılan yöntem olan RIA yöntemi ile elde edilen AVP değerleri ile oldukça benzer olduğu ve ELISA yönteminin RIA yöntemi için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, ailesel nörohipofizyal DI'ya neden olduğu daha önce tespit edilmiş fakat fonksiyonel analizleri henüz gerçekleştirilmemiş mutasyon (G88V) ile grubumuzca literatüre kazandırılan yeni mutasyonların (G45C ve 207-209delGGC) fonksiyonel analiz çalışmalarının bu tez çalışması ile gerçekleştirilmesi, çalışmanın özgünlüğünü yansıtmaktadır. Ayrıca bu konuda ülkemizde yapılan ilk çalışma olması açısından son derece büyük öneme sahiptir. Mutant öncül hormonlara ait fonksiyonel analiz çalışmaları, *AVP-NP1I* gen dizisinde meydana gelen değişikliklerin proteinin kritik bölgelerinin aydınlatılması, bu değişikliklerin proteinin

fonksiyonu üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunun anlaşılmasını sağlayacaktır. Böylece hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılması ile erken tanı ve tedavi yaklaşımları ile birlikte tedavide daha hızlı ve etkili sonuç verebilecek yeni farmakolojik ajanların geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ailesel nörohipofizyal DI nadir kalıtsal bir hastalık olarak tanımlandığı için bu gibi hastalıklarda popülasyonlardaki hasta sayısının az olması ve bu nedenle örnek toplamadaki zorluklar göz önüne alındığında, çalışmadan elde edilen sonuçlar son derece önemlidir. Bunun dışında, AVP miktarını belirlemek için geleneksel olarak kullanılan RIA yönteminin gerçekleştirilmesindeki zorluklar nedeniyle daha hızlı sonuç veren ve gerçekleştirilmesi daha kolay olan ELISA yönteminin alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermesi çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Baylis, P.H. and Thompson, C.J., Diabetes insipidus and hyperosmolar syndromes, in Principles and practice of endocrinology and metabolism, Becker, K.L., (Ed)., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA, 285-292, **2001**.
- [2] Robertson, G.L., Physiology of vasopressin, oxytocin and thirst, in Principles and practice of endocrinology and metabolism, Becker, K.L., (Ed)., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA, 285-292, **2001**
- [3] Verbalis J.G. and Berl T., Disorders of Water Balance, in: Brenner BM. Brenner and Rector's the Kidney, Saunders, 459-491, **2007**.
- [4] Benelam B. and Wyness L., Hydration and health: a review, Nutrition Bulletin, 35 (1), 3-25, **2010**.
- [5] Robertson G.L., Physiology of ADH secretion, Kidney Int Suppl, 21, 20-26, **1987**.
- [6] Mavani G.P., DeVita M.V., Michelis M.F., A Review of the Nonpressor and Nonantidiuretic Actions of the Hormone Vasopressin, Front Med (Lausanne), 2:19, **2015**.
- [7] Juul K.V., Bichet D.G., Nielsen S., Norgaard J.P., The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors, Am J Physiol Renal Physiol, 306, 931-940. **2014**.
- [8] Morello J.P., Bichet D.G., Nephrogenic diabetes insipidus, Annu Rev Physiol, 63, 607-630, **2001**.
- [9] Wesche D., Deen P.M. and Knoers N.V., Congenital nephrogenic diabetes insipidus: The current state of affairs, Pediatr. Nephrol., 27(12), 2183-2204, **2012**.
- [10] Bichet D.G., Genetics and diagnosis of central diabetes insipidus, Ann Endocrinol 73(2), 117-27, **2012**.
- [11] Hansen L.K., Rittig S., Robertson G.L., Genetic basis of familial neurohypophyseal diabetes insipidus, Trends Endocrinol Metab., 8(9), 363-72, **1997**.

- [12] Saborio P., Tipton G.A., Chan J.C., Diabetes insipidus, *Pediatr Rev.*, 21(4),122-9, **2000**.
- [13] Czernichov P., Central diabetes insipidus, in *Hypothalamic-Pituitary Development, Genetic and Clinical Aspects*, Rappaport R., Amselem S. (Eds), Karger, vol 4, 162–174, **2001**.
- [14] Christensen J.H., Siggaard C., Corydon T.J., Robertson G.L., Gregersen N., Bolund L., Rittig S., Impaired trafficking of mutated AVP prohormone in cells expressing rare disease genes causing autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus, *Clinical Endocrinology*, 60(1), 125-36, **2004**.
- [15] Ye D., Dong F., Lu W., Zhang Z., Lu X., Li C., Liu Y. A., Missense mutation in the *arginine-vasopressin neurophysin-II* gene causes autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus in a Chinese family, *Clinical Endocrinology*, 78(6), pp. 920-5, **2013**.
- [16] Babey M., Kopp P., Robertson G.L., Familial forms of diabetes insipidus: clinical and molecular characteristics, *Nat Rev Endocrinol.*, 7(12):701-14, **2011**.
- [17] Oiso Y., Robertson G.L., Nørgaard J.P., Juul K.V., Clinical review: Treatment of neurohypophyseal diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab.*,98(10):3958-67, **2013**.
- [18] Koufaris C., Alexandrou A., Sismani C., Skordis N., Identification of an *AVP-NPII* mutation within the AVP moiety in a family with neurohypophyseal diabetes insipidus: review of the literature, *Hormones (Athens)*, 14(3):442-6, **2015**.
- [19] Moeller H.B., Rittig S., Fenton R.A., Nephrogenic diabetes insipidus: essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment., *Endocr Rev.*, 34(2):278-301, **2013**.
- [20] Bösel I., Römler H., Hermsdorf T., Thor D., Busch W., Schulz A., Schöneberg T., Involvement of the V2 vasopressin receptor in adaptation to limited water supply, *PLoS One*, vol. 4, no. 5, pp. 1–10, **2009**.
- [21] Küçükkaya B., Kan B., Heterotrimerik G proteinleri, *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry]*, 32 (1) ; 39–50, **2007**.

- [22] Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A.S., McNamara J.O., Williams S.M., G-Proteins and their molecular targets, in Neuroscience, Sinauer Associates Inc., U.S., **2001**.
- [23] Nielsen S., Kwon T.H., Christensen B.M., Promeneur D., Frokiaer J., Marples D., Physiology and pathophysiology of renal aquaporins, *J Am Soc Nephrol*, 10, pp. 647-663, **1999**.
- [24] Qureshi S., Galiveeti S., Bichet D.G., Roth J., Diabetes insipidus: celebrating a century of vasopressin therapy, *Endocrinology*, 155(12):4605-21, **2014**.
- [25] Fujiwara T.M., Bichet D.G., Molecular biology of hereditary diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol.*,16(10):2836-46, **2005**.
- [26] Wallia A., Bizhanova A., Huang W., Goldsmith S.L., Gossett D.R., Kopp P., Acute diabetes insipidus mediated by vasopressinase after placental abruption, *J Clin Endocrinol Metab.*, 98(3):881-6, **2013**.
- [27] Durr J.A., Hoggard J.G., Hunt J.M., Schrier R.W., Diabetes insipidus in pregnancy associated with abnormally high circulating vasopressinase activity, *N Engl J Med.*, 316(17):1070-4, **1987**.
- [28] Aleksandrov N., Audibert F., Bedard M.J., Mahone M., Goffinet F., Kadoch I.J., Gestational diabetes insipidus: a review of an underdiagnosed condition, *J Obstet Gynaecol Can.*,32(3):225-31, **2010**.
- [29] Christ-Crain M., Bichet D.G., Fenske W.K., Goldman M.B., Rittig S., Verbalis J.G., Verkman A.S., Diabetes insipidus. *Nat Rev Dis Primers.*, 5(1):54, **2019**.
- [30] Robertson G.L., Differential diagnosis of polyuria, *Annu Rev Med.*, 9:425-42, **1988**.
- [31] Goldman M.B., Robertson G.L., Luchins D.J., Hedeker D., The influence of polydipsia on water excretion in hyponatremic, polydipsic, schizophrenic patients, *J Clin Endocrinol Metab.*, 81(4):1465-70, **1996**.
- [32] Abbas M.W., Iqbal M.A., Iqbal M.N., Javaid R., Ashraf A., Diabetes insipidus: the basic and clinical review, *Int J Res Med Sci.*, 4(1):5-11, **2016**.
- [33] Hendy G.N., Bichet D.G., Diabetes insipidus, *Baillieres Clin Endocrinol Metab.*, 9(3):509–524, **1995**.
- [34] Verbalis J.G., Diabetes insipidus, *Rev Endocr Metab Disord.*, 4(2):177-85, **2003**.

- [35] Atmıs B., Melek E., Haliloğlu B., Karabay Bayazit A., Anarat A., A case of congenital nephrogenic diabetes insipidus with *aquaporin 2* gene mutation, *Cukurova Med J*, 43(4):1065-1067, **2018**.
- [36] Bockenhauer D., Bichet D.G., Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus, *Nat Rev Nephrol.*, 11(10):576-88, **2015**.
- [37] Christensen S., Kusano E., Yusufi A.N., Murayama N., Dousa T.P., Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium in rats, *J Clin Invest.*, 75(6):1869-79, **1985**.
- [38] Kortenoeven M.L., Schweer H., Cox R., Wetzels J.F., Deen PM., Lithium reduces aquaporin-2 transcription independent of prostaglandins, *Am J Physiol Cell Physiol.*, 302(1):C131-40, **2012**.
- [39] Marples D., Christensen S., Christensen E.I., Ottosen P.D., Nielsen S., Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla, *J Clin Invest.*, 95(4):1838-45, **1995**.
- [40] Fenske W., Allolio B., Clinical review: Current state and future perspectives in the diagnosis of diabetes insipidus: a clinical review, *J Clin Endocrinol Metab.*, 97(10):3426-37, **2012**.
- [41] Knoers N.V.A.M., Levtchenko E.N., Nephrogenic diabetes insipidus in children, in *Pediatric Nephrology*, 7th edition, Avner E.D., Harmon W.E., Niaudet P., (Eds), Heidelberg, Springer, 1307-27, **2016**.
- [42] Birnbaumer M., Seibold A., Gilbert S., Ishido M., Barberis C., Antaramian A., Brabet P., Rosenthal W., Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone, *Nature*, 357(6376):333-5, **1992**.
- [43] D'Alessandri-Silva C., Carpenter M., Ayoob R., Barcia J., Chishti A., Constantinescu A., Dell K.M., Goodwin J., Hashmat S., Iragorri S., Kaspar C., Mason S., Misurac J.M., Muff-Luett M., Sethna C., Shah S., Weng P., Greenbaum L.A., Mahan J.D., Diagnosis, treatment, and outcomes in children with congenital nephrogenic diabetes insipidus: A pediatric nephrology research consortium study, *Front Pediatr.*, 21;7:550, **2020**.
- [44] Bichet D.G., Birnbaumer M., Lonergan M., Arthus M.F., Rosenthal W., Goodyer P., Nivet H., Benoit S., Giampietro P., Simonetti S., Fish A., Whitley C.B., Jaeger P., Gertner J., New M., DiBona F.J., Kaplan B.S.,

- Robertson G.L., Hendy G.N., Fujiwara T.M., Morgan K., Nature and Recurrence of AVPR2 Mutations in X-linked Nephrogenic Diabetes Insipidus, *Am J Hum Genet.*, 55(2): 278–286, **1994**.
- [45] Faerch M., Christensen J.H., Corydon T.J., Kamperis K., de Zegher F., Gregersen N., Robertson G.L., Rittig S., Partial nephrogenic diabetes insipidus caused by a novel mutation in the *AVPR2* gene, *Clin Endocrinol (Oxf)*., 68(3):395-403, **2008**.
- [46] Rege T., Polsani S., Jim B., A rare case of congenital diabetes insipidus, *Front Med (Lausanne)*, 2:43, **2015**.
- [47] Zhang M., Yu Q., Chen C., Han J., Cheng B., Tian D., A novel AVPR2 missense mutation in an Asian family with inherited nephrogenic diabetes insipidus: A case report., 98(17):e15348, **2019**.
- [48] Namatame-Ohta N., Morikawa S., Nakamura A., Matsuo K., Nakajima M., Tomizawa K., Tanahashi Y., Tajima T., Four Japanese Patients with Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus due to the *AVPR2* Mutations, *Case Rep Pediatr.*, 2018:6561952, **2018**.
- [49] Bichet D.G., Bockenhauer D., Genetic forms of nephrogenic diabetes insipidus (NDI): Vasopressin receptor defect (X-linked) and aquaporin defect (autosomal recessive and dominant), *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30:263-276, **2016**.
- [50] Robben J.H., Knoers N.V.A.M., Deen P.M.T., Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F257-F270, **2006**.
- [51] Bichet D.G., Fujiwara T.M., Nephrogenic diabetes insipidus, in the metabolic and molecular basis of inherited disease, Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. (eds), New York: McGraw Hill, 4181-204, **2001**.
- [52] Arthus M.F., Lonergan M., Crumley M.J., Naumova A.K., Morin D., De Marco L.A., Kaplan B.S., Robertson G.L., Sasaki S., Morgan K., Bichet D.G., Fujiwara T.M., Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol.*, 11(6):1044-54, **2000**.
- [53] Neocleous V., Skordis N., Shammam C., Efstathiou E., Mastrogiannopoulos N.P., Phylactou L.A., Identification and characterization of a novel X-linked

- AVPR2 mutation causing partial nephrogenic diabetes insipidus: a case report and review of the literature, *Metabolism.*, 61(7):922-30, **2012**.
- [54] Deen P.M., Verdijk M.A., Knoers N.V., Wieringa B., Monnens L.A., van Os C.H., van Oost B.A., Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine, *Science*, 264(5155):92-5, **1994**.
- [55] Peces R., Mena R., Peces C., Santos-Simarro F., Fernández L., Afonso S., Lapunzina P., Selgas R., Nevado J., Severe congenital nephrogenic diabetes insipidus in a compound heterozygote with a new large deletion of the AQP2 gene, A case report, *Mol Genet Genomic Med.*, 7(4):e00568, **2019**.
- [56] Sasaki S., Fushimi K., Saito H., Saito F., Uchida S., Ishibashi K., Kuwahara M., Ikeuchi T., Inui K., Nakajima K., Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct, *J Clin Invest.*, 93(3): 1250–1256, **1994**.
- [57] Frick A., Eriksson U.K., de Mattia F., Oberg F., Hedfalk K., Neutze R., de Grip W.J., Deen P.M., Törnroth-Horsefield S., X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 111(17):6305-10, **2014**.
- [58] Moeller H.B., Olesen E.T., Fenton R.A., Regulation of the water channel aquaporin-2 by posttranslational modification, *Am J Physiol Renal Physiol.*, 300(5):F1062-73, **2011**.
- [59] Marr N., Bichet D.G., Hoefs S., Savelkoul P.J., Konings I.B., De Mattia F., Graat M.P., Arthus M.F., Lonergan M., Fujiwara T.M., Knoers N.V., Landau D., Balfe W.J., Oksche A., Rosenthal W., Müller D., Van Os C.H., Deen P.M., Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol.*, 13(9):2267-77, **2002**.
- [60] Noda Y., Sasaki S., Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex, *Biochim Biophys Acta.*, 1758(8):1117-25, **2006**.
- [61] Sasaki S., Chiga M., Kikuchi E., Rai T., Uchida S., Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2, *Clin Exp Nephrol.*, 17(3):338-44, **2013**.

- [62] Loonen A.J., Knoers N.V., van Os C.H., Deen P.M., Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus, *Semin Nephrol.*, 28(3):252-65, **2008**.
- [63] Noda Y., Sohara E., Ohta E., Sasaki S., Aquaporins in kidney pathophysiology, *Nat Rev Nephrol.*, 6(3):168-78, **2010**.
- [64] Kuwahara M., Iwai K., Ooeda T., Igarashi T., Ogawa E., Katsushima Y., Shinbo I., Uchida S., Terada Y., Arthus M.F., Lonergan M., Fujiwara T.M., Bichet D.G., Marumo F., Sasaki S., Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus, *Am J Hum Genet.*, 69(4):738-48, **2001**.
- [65] Kamsteeg E.J., Bichet D.G., Konings I.B., Nivet H., Lonergan M., Arthus M.F., van Os C.H., Deen P.M., Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus, *J Cell Biol.*, 163(5):1099-109, **2003**.
- [66] Boone M., Deen P.M., Congenital nephrogenic diabetes insipidus: what can we learn from mouse models?, *Exp Physiol.*, 94(2):186-90, **2009**.
- [67] Kalra S., Zargar A.H., Jain S.M., Sethi B., Chowdhury S., Singh A.K., Thomas N., Unnikrishnan A.G., Thakkar P.B., Malve H., Diabetes insipidus: The other diabetes, *Indian J Endocrinol Metab.*, 20(1):9-21, **2016**.
- [68] Garrahy A., Moran C., Thompson C.J., Diagnosis and management of central diabetes insipidus in adults, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 90(1):23-30, **2019**.
- [69] Ersoy M., Darendeliler F., Baş F., Bundak R., Saka N., Günöz H., Çocukluk Dönemi Santral Diyabetes İnsipidus Vakalarının Etiyolojik Değerlendirmesi, *Çocuk Dergisi* 8(4):217-220, **2008**.
- [70] Hadani M., Findler G., Shaked I., Sahar A., Unusual delayed onset of diabetes insipidus following closed head trauma, Case report. *J Neurosurg.*, 63(3):456-8, **1985**.
- [71] Defoer F., Mahler C., Dua G., Appel B., Posttraumatic diabetes insipidus, *Acta Anaesthesiol Belg.*, 38(4):397-9, **1987**.
- [72] Makaryus A.N., McFarlane S.I., Diabetes insipidus: diagnosis and treatment of a complex disease, *Cleve Clin J Med.*, 73(1):65-71, **2006**.
- [73] Buggy J., Jonhson A.K., Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hypernatremia, *Am J Physiol.*, 233(1):R44-52, **1977**.

- [74] Abu Libdeh A., Levy-Khademi F., Abdulhadi-Atwan M., Bosin E., Korner M., White P.C., Zangen D.H., Autosomal recessive familial neurohypophyseal diabetes insipidus: onset in early infancy, *Eur J Endocrinol.*,162(2):221-6, **2010**.
- [75] Kim M.J., Kim Y.E., Ki C.S., Yoo J.H., Autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus caused by a mutation in the *arginine-vasopressin II* gene in four generations of a Korean family, *Ann Pediatr Endocrinol Metab.*,19(4):220–224, **2014**.
- [76] Christensen J.H., Rittig S., Familial neurohypophyseal diabetes insipidus--an update, *Semin Nephrol.*, 26(3):209-23, **2006**.
- [77] Yang H., Yan K., Wang L., Gong F., Jin Z., Zhu H., Autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus caused by a novel nonsense mutation in *AVP-NP II* gene, *Exp Ther Med.*,18(2):1309-1314, **2019**.
- [78] Weiner A, Vuguin P., Diabetes Insipidus, *Pediatrics in Review*, 41:2, 96-99, **2020**.
- [79] The Human Gene Mutation Database, HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=AVP> (Erişim Tarihi: **19 Ocak 2020**).
- [80] Summar M.L., Philips J.A., Battey J., Castiglione C.M., Kidd K.K., Maness K.J., Weiffenbach B., Gravius T.C., Linkage relationships of human arginine vasopressin-neurophysin-II and oxytocin-neurophysin-I to prodynorphin and other loci on chromosome 20, *Mol Endocrinol.*, 4(6):947-50, **1990**.
- [81] İlhan M., Tiryakioglu N.O., Karaman O., Coskunpinar E., Yildiz R.S., Turgut S., Tiryakioglu D., Toprak H., Tasan E., A novel *AVP* gene mutation in a Turkish family with neurohypophyseal diabetes insipidus, *J Endocrinol Invest.*, 39(3):285-90, **2016**.
- [82] Abbes A.P., Bruggeman B., van den Akker E.L.T., De Groot M.R., Franken A.A.M., Drexhage V.R., Engel H., Identification of two distinct mutations at the same nucleotide position, concomitantly with a novel polymorphism in the *vasopressin-neurophysin II* gene (*AVP-NP II*) in two Dutch families with familial neurohypophyseal diabetes insipidus, *Clin. Chem.*, 46:10, 1699-1702, **2000**.

- [83] Wolf M.T., Dötsch J., Metzler M., Holder M., Repp R., Rascher W., A new missense mutation of the *vasopressin-neurophysin II* gene in a family with neurohypophyseal diabetes insipidus, *Horm Res.*,60(3):143-7, **2003**.
- [84] Deniz F., Acar C., Saglar E., Erdem B., Karaduman T., Yonem A., Cagiltay E., Ay S.A., Mergen H., Identification of a novel deletion in *AVP-NP/II* Gene in a patient with central diabetes insipidus, *Annals of Clinical Laboratory Sciences*, 45:5, 588-592, **2015**.
- [85] Marieb E.N., Hoehn K.N., The endocrine system, in *Human Anatomy & Physiology*, Pearson; 10th edition, **2015**.
- [86] de Bree F.M., Trafficking of the vasopressin and oxytocin prohormone through the regulated secretory pathway, *J Neuroendocrinol.*, 12(6):589-94, **2000**.
- [87] Di Iorgi N., Napoli F., Allegri A.E., Olivieri I., Bertelli E., Gallizia A., Rossi A., Maghnie M., Diabetes insipidus--diagnosis and management, *Horm Res Paediatr.*, 77(2):69-84, **2012**.
- [88] Turkkahraman D., Saglar E., Karaduman T., Mergen H., *AVP-NP/II* gene mutations and clinical characteristics of the patients with autosomal dominant familial central diabetes insipidus, *Pituitary.*, 18(6):898-904, **2015**.
- [89] Baribeau D.A., Anagnostou E., Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits, *Front Neurosci.*, 9: 335, **2015**.
- [90] White B.A., The Hypothalamus and Pituitary Gland, in *Berne & Levy Physiology*, Koeppen B.M., Stanton B.A., Elsevier: 6th edition, 41, 733-752, **2009**.
- [91] Breslow E., Burman S., Molecular, thermodynamic, and biological aspects of recognition and function in neurophysin-hormone systems: a model system for the analysis of protein-peptide interactions, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 63:1-67, **1990**.
- [92] Bourque C.W., Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes, *Prog Brain Res.*,119:59-76, **1998**.
- [93] Gordon A.C., Russell J.A., Should Vasopressin Be Used in Septic Shock?, in *Evidence-Based Practice of Critical Care*, Deutschman C.S., Neligan P.J. (Eds)., 1st edition, Saunders, Elsevier inc, Philadelphia, USA, 212-217, **2010**.

- [94] Sharman A., Low J., Vasopressin and its role in critical care, *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 8:4, 134–137, **2008**.
- [95] Sklar A.H., Schrier R.W., Central nervous system mediators of vasopressin release, *Physiol Rev.*, 63(4):1243-80, **1983**.
- [96] Czaczkes J.W., Kleeman C.R., Koenig M., Physiologic studies of antidiuretic hormone by its direct measurement in human plasma, *J Clin Invest.*, 43:1625-40, **1964**.
- [97] Rutishauser J., Spiess M., Kopp P., Genetic forms of neurohypophyseal diabetes insipidus, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 30(2):249-62, **2016**.
- [98] Tae H.J., Baek K.H., Shim S.M., Yoo S.J., Kang M.I., Cha B.Y., Lee K.W., Son H.Y, Kang S.K., A novel splice site mutation of the *arginine vasopressin-neurophysin II* gene identified in a kindred with autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus, *Mol Genet Metab.*, 86(1-2):307-13, **2005**.
- [99] Ito M., Oiso Y., Murase T., Kondo K., Saito H., Chinzei T., Racchi M., Lively M.O., Possible involvement of inefficient cleavage of preprovasopressin by signal peptidase as a cause for familial central diabetes insipidus, *J Clin Invest.*, 91(6):2565-71, **1993**.
- [100] Repaske D.R., Medlej R., Gültekin E.K., Krishnamani M.R., Halaby G., Findling J.W., Phillips J.A., Heterogeneity in clinical manifestation of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus caused by a mutation encoding Ala-1-->Val in the signal peptide of the arginine vasopressin/neurophysin II/copeptin precursor, *J Clin Endocrinol Metab.*, 82(1):51-6, **1997**.
- [101] Siggaard C., Rittig S., Corydon T.J., Andreasen P.H., Jensen T.G., Andresen B.S., Robertson G.L., Gregersen N., Bolund L., Pedersen E.B., Clinical and molecular evidence of abnormal processing and trafficking of the vasopressin preprohormone in a large kindred with familial neurohypophyseal diabetes insipidus due to a signal peptide mutation, *J Clin Endocrinol Metab.*, 84(8):2933-41, **1999**.
- [102] Willcutts M.D., Felner E., White P.C., Autosomal recessive familial neurohypophyseal diabetes insipidus with continued secretion of mutant weakly active vasopressin, *Hum Mol Genet.*,8(7):1303-7, **1999**.

- [103] Christensen J.H., Siggaard C., Rittig S., Autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus, *APMIS*, 109:92-95, **2003**.
- [104] Christensen J.H., Siggaard C., Corydon T.J., deSanctis L., Kovacs L., Robertson G.L., Gregersen N., Rittig S., Six novel mutations in the *arginine vasopressin* gene in 15 kindreds with autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus give further insight into the pathogenesis, *Eur J Hum Genet.*, 12(1):44-51, **2004**.
- [105] Nagasaki H., Ito M., Yuasa H., Saito H., Fukase M., Hamada K., Ishikawa E., Katakami H., Oiso Y., Two novel mutations in the coding region for neurophysin-II associated with familial central diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 80(4):1352-6, **1995**.
- [106] Ito M., Mori Y., Oiso Y., Saito H., A single base substitution in the coding region for neurophysin II associated with familial central diabetes insipidus, *J Clin Invest.*, 87(2):725-8, **1991**.
- [107] Duzenli D., Saglar E., Deniz F., Azal O., Erdem B., Mergen H., Mutations in the *AVPR2*, *AVP-NPII*, and *AQP2* genes in Turkish patients with diabetes insipidus, *Endocrine.*, 42(3):664-9, **2012**.
- [108] Wahlstrom J.T., Fowler M.J., Nicholson W.E., Kovacs WJ., A novel mutation in the preprovasopressin gene identified in a kindred with autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(4):1963-8, **2004**.
- [109] Bergeron C., Kovacs K., Ezrin C., Mizzen C., Hereditary diabetes insipidus: an immunohistochemical study of the hypothalamus and pituitary gland, *Acta Neuropathol.*, 81(3):345-8, **1991**.
- [110] Hagiwara D., Arima H., Morishita Y., Wenjun L., Azuma Y., Ito Y., Suga H., Goto M., Banno R., Sugimura Y., Shiota A., Asai N., Takahashi M., Oiso Y., Arginine vasopressin neuronal loss results from autophagy-associated cell death in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus, *Cell Death Dis.*, 5:e1148, **2014**.
- [111] Castino R., Davies J., Beaucourt S., Isidoro C., Murphy D., Autophagy is a prosurvival mechanism in cells expressing an autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus mutant vasopressin transgene, *FASEB J.*, (8):1021-3, **2005**.

- [112] Castino R., Isidoro C., Murphy D., Autophagy-dependent cell survival and cell death in an autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus in vitro model, *FASEB J.*,19(8):1024-6, **2005**.
- [113] Ito M., Jameson J.L., Ito M., Molecular basis of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. Cellular toxicity caused by the accumulation of mutant vasopressin precursors within the endoplasmic reticulum, *J Clin Invest.*,99(8):1897-905, **1997**.
- [114] Olias G., Richter D., Schmale H., Heterologous expression of human vasopressin-neurophysin precursors in a pituitary cell line: defective transport of a mutant protein from patients with familial diabetes insipidus, *DNA Cell Biol.*,15(11):929-35, **1996**.
- [115] Robertson G.L., Rittig S., Gu W.X., Pathogenesis and pathophysiology of familial neurohypophyseal diabetes insipidus, Saito T., Kurokawa K., Yoshida S. (Eds), in *Neurohypophysis: Recent Progress of Vasopressin and Oxytocin Research*, Amsterdam, Elsevier Science BV, 593-603, **1995**.
- [116] Ito M., Yu R.N., Jameson J.L., Mutant vasopressin precursors that cause autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus retain dimerization and impair the secretion of wild-type proteins, *J Biol Chem.*, 274(13):9029-37, **1999**.
- [117] Dabrowski E., Kadakia R., Zimmerman D., Diabetes insipidus in infants and children, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 30(2):317-28, **2016**.
- [118] Christensen J.H., Siggaard C., Corydon T.J., Robertson G.L., Gregersen N., Bolund L., Rittig S., Differential cellular handling of defective arginine vasopressin (AVP) prohormones in cells expressing mutations of the *AVP* gene associated with autosomal dominant and recessive familial neurohypophyseal diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(9):4521-31, **2004**.
- [119] Christensen J.H., Kvistgaard H., Knudsen J., Shaikh G., Tolmie J., Cooke S., Pedersen S., Corydon T.J., Gregersen N., Rittig S., A novel deletion partly removing the *AVP* gene causes autosomal recessive inheritance of early-onset neurohypophyseal diabetes insipidus, *Clin Genet.*, 83(1):44-52, **2013**.
- [120] Valtin H., The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls, *Ann N Y Acad Sci.*, 394:1-9, **1982**.

- [121] Schmale H., Richter D., Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats, *Nature.*, 308(5961):705-9, **1984.**
- [122] Kim J.K., Summer S.N., Wood W.M., Brown J.L., Schrier R.W., Arginine vasopressin secretion with mutants of wild-type and Brattleboro rats AVP gene, *J Am Soc Nephrol.*, 8(12):1863-9, **1997.**
- [123] DiGiovanni S.R., Christensen E.I., Knepper M.A., Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19): 8984–8988, **1994.**
- [124] Inoue H., Tanizawa Y., Wasson J., Behn P., Kalidas K., Bernal-Mizrachi E., Mueckler M., Marshall H., Donis-Keller H., Crock P., Rogers D., Mikuni M., Kumashiro H., Higashi K., Sobue G., Oka Y., Permutt M.A., A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome), *Nat Genet.*, 20(2):143-8, **1998.**
- [125] Strom T.M., Hörtnagel K., Hofmann S., Gekeler F., Scharfe C., Rabl W., Gerbitz K.D., Meitinger T., Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein, *Hum Mol Genet.*,7(13):2021-8, **1998.**
- [126] Osman A.A., Saito M., Makepeace C., Permutt M.A., Schlesinger P., Mueckler M., Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium, *J Biol Chem.*, 278(52):52755-62, **2003.**
- [127] Fonseca S.G., Fukuma M., Lipson K.L., Nguyen L.X., Allen J.R., Oka Y., Urano F., WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells, *J Biol Chem.*, 280(47):39609-15, **2005.**
- [128] Barrett T.G., Bunday S.E., Wolfram (DIDMOAD) syndrome, *J Med Genet.*, 34(10):838-41, **1997.**
- [129] Thompson C.J., Charlton J., Walford S., Baird J., Hearnshaw J., McCulloch A., Kelly W., Baylis P.H., Vasopressin secretion in the DIDMOAD (Wolfram) syndrome, *Q J Med.*, 71(264):333-45, **1989.**

- [130] Gabreëls B.A., Swaab D.F., de Kleijn D.P., Dean A., Seidah N.G., Van de Loo J.W., Van de Ven W.J., Martens G.J., Van Leeuwen F.W., The vasopressin precursor is not processed in the hypothalamus of Wolfram syndrome patients with diabetes insipidus: evidence for the involvement of PC2 and 7B2, *J Clin Endocrinol Metab.*, 83(11):4026-33, **1998**.
- [131] Levy M., Prentice M., Wass J., Diabetes insipidus, *BMJ*. 2019, 364:l321, **2019**.
- [132] Zerbe R.L., Robertson G.L., A comparison of plasma vasopressin measurements with a standard indirect test in the differential diagnosis of polyuria, *N Engl J Med.*, 305(26):1539-46, **1981**.
- [133] Szinnai G., Morgenthaler N.G., Berneis K., Struck J., Müller B., Keller U., Christ-Crain M., Changes in plasma copeptin, the c-terminal portion of arginine vasopressin during water deprivation and excess in healthy subjects, *J Clin Endocrinol Metab.*, 92(10):3973-8, **2007**.
- [134] Morgenthaler N.G., Struck J., Jochberger S., Dünser M.W., Copeptin: clinical use of a new biomarker, *Trends Endocrinol Metab.*, 19(2):43-9, **2008**.
- [135] Balanescu S., Kopp P., Gaskill M.B., Morgenthaler N.G., Schindler C., Rutishauser J., Correlation of plasma copeptin and vasopressin concentrations in hypo-, iso-, and hyperosmolar states, *J Clin Endocrinol Metab.*, 96(4):1046-52, **2011**.
- [136] Christ-Crain M., Diabetes insipidus: New concepts for diagnosis, *Neuroendocrinology.*, [Epub ahead of print], 1-9, **2020**.
- [137] Kanno K., Sasaki S., Hirata Y., Ishikawa S., Fushimi K., Nakanishi S., Bichet D.G., Marumo F., Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus, *N Engl J Med.*, 332(23):1540-5, **1995**.
- [138] Kurokawa H., Fujisawa I., Nakano Y., Kimura H., Akagi K., Ikeda K., Uokawa K., Tanaka Y., Posterior lobe of the pituitary gland: correlation between signal intensity on T1-weighted MR images and vasopressin concentration, *Radiology.*, 207(1):79-83, **1998**.
- [139] Lee M.H., Choi H.Y., Sung Y.A., Lee J.K. High signal intensity of the posterior pituitary gland on T1-weighted MR images. Correlation with plasma vasopressin concentration to water deprivation, *Acta Radiol.*, 42(2):129-34, **2001**.

- [140] Bonneville J.F., The pituitary stalk, in *Computed tomography of the pituitary gland*, Bonneville J.F., Cattin F., Dietemann J.L. (Eds), Springer-Verlag, New York, 106–114, **1986**.
- [141] Maghnie M., Villa A., Arico M., Larizza D., Pezzotta S., Beluffi G., Genovese E., Severi F., Correlation between magnetic resonance imaging of posterior pituitary and neurohypophyseal function in children with diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 74(4):795-800, **1992**.
- [142] El-Hennawy A.S., Bassi T., Koradia N., Bocirnea A., Transient gestational diabetes insipidus: report of two cases and review of pathophysiology and treatment, *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 14(5):349-52, **2003**.
- [143] Hanson R.S., Powrie R.O., Larson L., Diabetes insipidus in pregnancy: a treatable cause of oligohydramnios, *Obstet Gynecol.*, 89(5 Pt 2):816-7, **1997**.
- [144] Sainz Bueno J.A., Villarejo Ortíz P., Hidalgo Amat J., Caballero Fernández V., Caballero Manzano M., Garrido Teruel R., Transient diabetes insipidus during pregnancy: a clinical case and a review of the syndrome, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 118(2):251-4, **2005**.
- [145] Canuso C.M., Goldman M.B., Clozapine restores water balance in schizophrenic patients with polydipsia-hyponatremia syndrome, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 11(1):86-90, **1999**.
- [146] Loffing J., Paradoxical antidiuretic effect of thiazides in diabetes insipidus: another piece in the puzzle, *J Am Soc Nephrol.*, 15(11):2948-50, **2004**.
- [147] Kim G.H., Lee J.W., Oh Y.K., Chang H.R., Joo K.W., Na K.Y., Earm J.H., Knepper M.A., Han J.S., Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl co-transporter, and epithelial sodium channel, *J Am Soc Nephrol.*, 15(11):2836-43, **2004**.
- [148] Karet F.E., Disorders of water and acid-base homeostasis, *Nephron Physiol.*, 118(1):p28-34, **2011**.
- [149] Oliveira J.L., Silva Júnior G.B., Abreu K.L., Rocha Nde A., Franco L.F., Araújo S.M., Daher Ede F., Lithium nephrotoxicity, *Rev Assoc Med Bras*, 56(5):600-6, **2010**.

- [150] Zaki M., Schöneberg T., Al Ajrawi T., Al Said A.N., Sangkuhl K., Römpler H., Nephrogenic diabetes insipidus, thiazide treatment and renal cell carcinoma, *Nephrol Dial Transplant.*, 21(4):1082-6, **2006**.
- [151] Delaney V., Pertuz D.Y., Nixon D., Bourke E., Indomethacin in streptozocin-induced nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Kidney Dis*, 9:7983, **1987**.
- [152] Kim G.H., Choi N.W., Jung J.Y., Song J.H., Lee C.H., Kang C.M., Knepper M.A., Treating lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus with a COX-2 inhibitor improves polyuria via upregulation of AQP2 and NKCC2, *Am J Physiol Renal Physiol.*, 294(4):F702-9, **2008**.
- [153] Huerta C., Castellsague J., Varas-Lorenzo C., García Rodríguez L.A., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population, *Am J Kidney Dis.*, 45(3):531-9, **2005**.
- [154] Weitzman R.E., Kleeman C.R., The clinical physiology of water metabolism. Part II: Renal mechanisms for urinary concentration; diabetes insipidus, *West J Med.*, 131(6):486-515, **1979**.
- [155] Sasaki S., Nephrogenic diabetes insipidus: update of genetic and clinical aspects, *Nephrol Dial Transplant.*, 19(6):1351-3, **2004**.
- [156] Mouillac B., Mendre C., Pharmacological Chaperones as Potential Therapeutic Strategies for Misfolded Mutant Vasopressin Receptors, *Handb Exp Pharmacol.*, 245:63-83, **2018**.
- [157] Bernier V., Morello J.P., Zarruk A., Debrand N., Salahpour A., Lonergan M., Arthus M.F., Laperrière A., Brouard R., Bouvier M., Bichet D.G., Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol.*, 17(1):232-43, **2006**.
- [158] Cheong H.I., Cho H.Y., Park H.W., Ha I.S., Choi Y., Molecular genetic study of congenital nephrogenic diabetes insipidus and rescue of mutant vasopressin V2 receptor by chemical chaperones, *Nephrology*, 12:2, 113-117, **2007**.
- [159] Jean-Alphonse F., Perkowska S., Frantz M.C., Durroux T., Méjean C., Morin D., Loison S., Bonnet D., Hibert M., Mouillac B., Mendre C., Biased agonist pharmacochaperones of the AVP V2 receptor may treat congenital nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol.*, 20(10):2190-203, **2009**.

- [160] Los E.L., Deen P.M., Robben J.H. Potential of nonpeptide (ant)agonists to rescue vasopressin V2 receptor mutants for the treatment of X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Neuroendocrinol.*, 22(5):393-9, **2010**.
- [161] Robben J.H., Kortenoeven M.L., Sze M., Yae C., Milligan G., Oorschot V.M., Klumperman J., Knoers N.V., Deen P.M., Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(29):12195-200, **2009**.
- [162] Li J.H., Chou C.L., Li B., Gavrilova O., Eisner C., Schnermann J., Anderson S.A., Deng C.X., Knepper M.A., Wess J., A selective EP4 PGE2 receptor agonist alleviates disease in a new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Clin Invest.*, 119(10):3115-26, **2009**.
- [163] Procino G., Milano S., Carosino M., Gerbino A., Bonfrate L., Portincasa P., Svelto M., Hereditary Nephrogenic Diabetes Insipidus: Molecular Basis of the Defect and Potential Novel Strategies for Treatment, *J Genet Syndr Gene Ther*, 5:3, **2014**.
- [164] Liguori L., Monticelli M., Allocca M., Hay Mele B., Lukas J., Cubellis M.V., Andreotti G., Pharmacological Chaperones: A Therapeutic Approach for Diseases Caused by Destabilizing Missense Mutations, *Int J Mol Sci.*, 21(2), **2020**.
- [165] Arakawa T., Ejima D., Kita Y., Tsumoto K., Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs, *Biochim Biophys Acta.*, 1764(11):1677-87, **2006**.
- [166] Loo T.W., Clarke D.M., Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents, *Expert Rev Mol Med.*, 9(16):1-18, **2007**.
- [167] Montgomery-Rice V., Terranova P., Diabetes Insipidus, *xPharm: The comprehensive pharmacology reference* 1-3, **2007**.
- [168] Canelo C.K., Lisser H., A Case of Diabetes Insipidus: Controlled with Powdered Pituitary Posterior Lobe Extract Applied Intranasally, as Snuff. *Cal West Med.*, 42(3):178-80, **1935**.
- [169] Thorn G.W., Stein K., Pitressin tannate therapy in diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol.*,1(8):680–687, **1941**.
- [170] Blotner H., Pitressin tannate in oil in the treatment of diabetes insipidus, *JAMA*, 119 (13):995-997, **1942**.

- [171] Huguenin R.L., Stürmer E., Boissonnas R.A., Berde B., Desamino-arginine-vasopressin, an analogue of arginine vasopressin with high antidiuretic activity, *Experientia* 21:68-69, **1965**.
- [172] Vávra I., Machová A., Holecek V., Cort J.H., Zaoral M., Sorm F., Effect of a synthetic analogue of vasopressin in animals and in patients with diabetes insipidus, *Lancet.*, 1(7549):948-52, **1968**.
- [173] Aronson A.S., Andersson K.E., Bergstrand C.G., Mulder J.L., Treatment of diabetes insipidus in children with DDAVP, a synthetic analogue of vasopressin, *Acta Paediatr Scand.*, 62(2):133-40, **1973**.
- [174] Kauli R., Laron Z., A vasopressin analogue in treatment of diabetes insipidus, *Arch Dis Child.*, 49(6):482-5, **1974**.
- [175] Robinson A.G., DDAVP in the treatment of central diabetes insipidus, *N Engl J Med.*, 294(10):507-11, **1976**.
- [176] Ziai F., Walter R., Rosenthal I.M., Treatment of central diabetes insipidus in adults and children with desmopressin, *Arch Intern Med.*, 138(9):1382-5, **1978**.
- [177] Arima H., Azuma Y., Morishita Y., Hagiwara D., Central diabetes insipidus, *Nagoya J Med Sci.*, 78(4): 349-358, **2016**.
- [178] Kataoka Y., Nishida S., Hirakawa A., Oiso Y., Arima H., Comparison of incidence of hyponatremia between intranasal and oral desmopressin in patients with central diabetes insipidus, *Endocr J.*, 62(2):195-200, **2015**.
- [179] Behan L.A., Sherlock M., Moyles P., Renshaw O., Thompson C.J., Orr C., Holte K., Salehmohamed M.R., Glynn N., Tormey W., Thompson C.J., Abnormal plasma sodium concentrations in patients treated with desmopressin for cranial diabetes insipidus: results of a long-term retrospective study, *Eur J Endocrinol.*, 172(3):243-50, **2015**.
- [180] Verbalis J.G., Goldsmith S.R., Greenberg A., Korzelius C., Schrier R.W., Sterns R.H., Thompson C.J., Diagnosis, evaluation, and treatment of hyponatremia: expert panel recommendations, *Am J Med.*, 126:S1-42, **2013**.
- [181] Garrahy A., Thompson C.J., Management of central diabetes insipidus, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2020**.
- [182] Schreckinger M., Szerlip N., Mittal S., Diabetes insipidus following resection of pituitary tumors, *Clin Neurol Neurosurg.*, 115(2):121-6, **2013**.

- [183] Ansar M., Garg A., Schwalje A.T., Owen S.R., Correia M.L.G., Transient central diabetes insipidus during prolonged sinus surgery: case report and literature review, *Otolaryngology Case Reports* 14, **2020**.
- [184] Yu C.H., Cho J.H., Jung H.Y., Lim J.H., Jin M.K., Kwon O., Hong K.D., Choi J.Y., Yoon S.H., Kim C.D., Kim Y.L., Kim G.J., Park S.H., A case of transient central diabetes insipidus after aorto-coronary bypass operation, *J Korean Med Sci.*, 27(9):1109-13, **2012**.
- [185] Ekim M., Ekim H., Yilmaz Y.K., Bolat A., Transient Diabetes Insipidus Following Cardiopulmonary Bypass., *J Coll Physicians Surg Pak.*, 25:S10-1, **2015**.
- [186] Jang K.M., Sohn Y.S., Hwang Y.J, Choi B.S, Cho M.H., Deficiency of antidiuretic hormone: a rare cause of massive polyuria after kidney transplantation, *Korean J Pediatr.*, 59(4):202-4, **2016**.
- [187] Fyrmpas G., Constantinidis J, Foroglou N., Selviaridis P., Pituitary apoplexy following endoscopic sinus surgery, *J Laryngol Otol.*, 124(6):677-9, **2010**.
- [188] Youssef A., Ahmed S., Ibrahim A.A., Daniel M., Abdelfattah H.M., Morsi H., Traumatic cerebrospinal fluid leakage following septorhinoplasty, *Arch Plast Surg.*, 45(4):379-383, **2018**.
- [189] Robinson A.G., Verbalis J.G., Diabetes insipidus, *Curr Ther Endocrinol Metab.*, 6:1-7, **1997**.
- [190] Henry D.A., Lawson D.H., Reavey P., Renfrew S., Hyponatraemia during carbamazepine treatment, *Br Med J.*, 1(6053):83-4, **1977**.
- [191] Van Amelsvoort T., Bakshi R., Devaux C.B., Schwabe S., Hyponatremia associated with carbamazepine and oxcarbazepine therapy: a review, *Epilepsia.*, 35(1):181-8, **1994**.
- [192] Cushard W.G. Jr, Beauchamp C.J., Martin N.D., Oral therapy of diabetes insipidus with chlorpropamide, *Calif Med.*, 115(2):1-5, **1971**.
- [193] Wales J.K., Mode of action of chlorpropamide in the treatment of diabetes insipidus, *Proc R Soc Med.*, 64(10):1070-1, **1971**.
- [194] Moses A.M., Howanitz J., van Gemert M., Miller M., Clofibrate-induced antidiuresis, *J Clin Invest.*, 52(3):535-42, **1973**.
- [195] Melo M.E., Marui S., Brito V.N, Mancini M.C., Mendonca B.B., Knoepfelmacher M., Autosomal dominant familial neurohypophyseal

- diabetes insipidus caused by a novel mutation in *arginine-vasopressin* gene in a Brazilian family, *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, 52(8):1272-6, **2008**.
- [196] Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R., Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene*, 77, 51-59, **1989**.
- [197] Ensembl, https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000101200;r=20:3082556-3084724;t=ENST00000380293 (Erişim Tarihi: **6 Nisan 2020**).
- [198] Son K.K., Patel D.H., Tkach D., Park A., Cationic liposome and plasma DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged, *Biochimica et Biophysica Acta* 1466;11-15, **2000**.
- [199] Salvati A., Ciani L., Ristori S., Martini G., Masi A., Arcangeli A., Physico-chemical characterization and transfection efficacy of cationic liposomes containing the pEGFP plasmid, *Biophys Chem.*, 121(1):21-9, **2006**.
- [200] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem.*, 150(1):76-85, **1985**.
- [201] Walker J.M., The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation, in the Protein Protocols Handbook, Walker J.M. (eds)., Springer Protocols Handbooks, Humana Press, Totowa, NJ, 11-15, **2009**.
- [202] Bland J.M., Altman D.G., Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet.*, 1(8476):307-10, **1986**.
- [203] Genç Y., Sertkaya D., Demirtaş S., Klinik araştırmalarda iki ölçüm tekniğinin uyumunu incelemede kullanılan istatistiksel yöntemler, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 56:1,1-6, **2003**.
- [204] Saraçlı S., Çelik H.E., Metot karşılaştırma çalışmalarında Bland-Altman ve Tip II regresyon analizinin karşılaştırılması, *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1): 11-14, **2012**.
- [205] Giavarina D., Understanding Bland Altman analysis, *Biochimica Medica* 25(2):141-51, **2015**.

- [206] Kalra A., Decoding the Bland Altman plot: basic review, *J Pract Cardiovasc Sci*, 3:36-8, **2017**.
- [207] Kaur P., Stoltzfus J.C., Bland-Altman plot: A brief overview, *Biostatistics* 3:1, 110-111, **2017**.
- [208] van Stralen K.J., Jager K.J., Zoccali C., Dekker F.W., Agreement between methods, *Kidney Int.*, 74(9):1116-20, **2008**.
- [209] Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M, Three-dimensional structure of proteins, in *Lehninger principles of biochemistry*, Worth Publishers, New York, **2000**.
- [210] Nijenhuis M., Zalm R., Burbach J.P., Mutations in the vasopressin prohormone involved in diabetes insipidus impair endoplasmic reticulum export but not sorting, *J Biol Chem.*, 274(30):21200-8, **1999**.
- [211] Eubanks S., Nguyen T.L., Deeb R., Villafania A., Alfadhli A., Breslow E., Effects of diabetes insipidus mutations on neurophysin folding and function, *J Biol Chem.*, 276(32):29671-80, **2001**.
- [212] Bahnsen U., Oosting P., Swaab D.F., Nahke P., Richter D., Schmale H. A., missense mutation in the vasopressin-neurophysin precursor gene cosegregates with human autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *EMBO J.*, 11(1):19-23, **1992**.
- [213] Rittig S., Robertson G.L., Siggaard C., Kovács L., Gregersen N., Nyborg J., Pedersen E.B., Identification of 13 new mutations in the *vasopressin-neurophysin II* gene in 17 kindreds with familial autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *Am J Hum Genet.*, 58(1):107-17, **1996**.
- [214] Rutishauser J., Kopp P., Gaskill M.B., Kotlar T.J., Robertson G.L., A novel mutation (R97C) in the neurophysin moiety of prepro-vasopressin-neurophysin II associated with autosomal-dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *Mol Genet Metab.*, 67(1):89-92, **1999**.
- [215] Mundschenk J., Rittig S., Siggaard C., Hensen J., Lehnert H., A new mutation of the arginine vasopressin-neurophysin II gene in a family with autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*, 109(8):406-9, **2001**.
- [216] Russell T.A., Ito M., Ito M., Yu R.N., Martinson F.A., Weiss J., Jameson J.L., A murine model of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes

- insipidus reveals progressive loss of vasopressin-producing neurons, *J Clin Invest.*, 112(11):1697-706, **2003**.
- [217] Olias G., Richter D., Schmale H., Heterologous expression of human vasopressin-neurophysin precursors in a pituitary cell line: defective transport of a mutant protein from patients with familial diabetes insipidus, *DNA and Cell Biology*, 15:11, 929-935, **2009**.
- [218] Rose J.P., Wu C.K., Hsiao C.D., Breslow E., Wang B.C., Crystal structure of the neurophysin-oxytocin complex, *Nat Struct Biol.*, 3(2):163-9, **1996**.
- [219] Blumenstein M., Hruby V.J., Interactions of oxytocin with bovine neurophysins I and II. Use of ¹³C nuclear magnetic resonance and hormones specifically enriched with ¹³C in the glycinamide-9 and half-cystine-1 positions, *Biochemistry.*, 16(24):5169-77, **1977**.
- [220] Hedrich C.M., Zachurzok-Buczynska A., Gawlik A., Russ S., Hahn G., Koehler K., Malecka-Tendera E., Huebner A., Autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus in two families. Molecular analysis of the *vasopressin-neurophysin II* gene and functional studies of three missense mutations, *Horm Res.*, 71(2):111-9, **2009**.
- [221] Flück C.E., Deladoëy J., Nayak S., Zeller O., Kopp P., Mullis P.E., Autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus in a Swiss family, caused by a novel mutation (C59Delta/A60W) in the neurophysin moiety of prepro-vasopressin-neurophysin II (AVP-NP II), *Eur J Endocrinol.*, 145(4):439-44, **2001**.
- [222] Yuasa H., Ito M., Nagasaki H., Oiso Y., Miyamoto S., Sasaki N., Saito H., Glu-47, which forms a salt bridge between neurophysin-II and arginine vasopressin, is deleted in patients with familial central diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 77(3):600-4, **1993**.
- [223] Alcocer L., Boxer M., Connell J.M., Ahmed S.F., Autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus associated with a glutamine47 deletion, *Endocrine Abstracts* 5, 86, **2003**.
- [224] Rutishauser J., Böni-Schnetzler M., Böni J., Wichmann W., Huisman T., Vallotton M.B., Froesch E.R., A novel point mutation in the translation initiation codon of the *pre-pro-vasopressin-neurophysin II* gene: cosegregation with morphological abnormalities and clinical symptoms in

autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus, *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism*, 81(1), 192-198, **1996**.

EKLER

EK 1 - Proje bilgileri

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Destek miktarı: 9.998,00 TL'dir.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK SBAG 115S499 numaralı ve 240.000,00 TL bütçeli proje tarafından desteklenmiştir.