

**DIABETES İNSİPIDUS'LU HASTALARIN AQP2 GENİNDE  
TANIMLANAN MUTASYONLARIN FONKSİYONEL  
ANALİZLERİ**

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF MUTATIONS FOUND IN  
AQP2 GENE OF PATIENTS WITH DIABETES INSIPIDUS**

**TUĞÇE KARADUMAN**

**PROF. DR. HATİCE MERGEN**

**Tez Danışmanı**

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

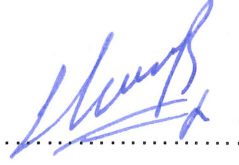
2018

TUĞÇE KARADUMAN'ın hazırladığı "Diabetes İnsipidus'lu Hastaların AQP2 Geninde Tanımlanan Mutasyonların Fonksiyonel Analizleri" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nuhan PURALI  
Başkan



Prof. Dr. Hatice MERGEN  
Danışman



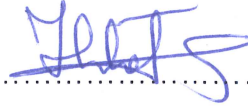
Prof. Dr. Sibel SÜMER  
Üye



Prof. Dr. Leyla AÇIK  
Üye



Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 14 Haziran 2018 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

27. / 06. / 2018

(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Tuğrul Koraduman

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/06/2018



TUĞÇE KARADUMAN

## ÖZET

# DİABETES İNSİPIDUS'LU HASTALARIN AQP2 GENİNDE TANIMLANAN MUTASYONLARIN FONKSİYONEL ANALİZLERİ

**Tuğçe KARADUMAN**

**Doktora, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN**

**Haziran 2018, 111 sayfa**

Vücutta su homeostazı, su alımı ve kaybının dengede olması ile sağlanır. Diabetes insipidus (DI) hastalarında yapımı ve etkisi azalmış olan arjinin vazopressin, (AVP, ADH, antidiüretik hormon) beynin hipotalamus bölgesinde sentezlenen ve hipofiz bezinin arka bölümünde depolanarak uyarılma durumunda salgılanan bir hormondur. Bu hormon, böbrek toplama kanalındaki suyun geri emilimini artırarak, hayati fonksiyona sahip olan bir düzenleme gerçekleştirmektedir. AVP hormonu salgılandıktan sonra, böbrek nefronlarının polarize epitel hücrelerinin bazolateral membranında lokalize bir transmembran protein olan arjinin vazopressin reseptör 2'ye (AVPR2) bağlanır. AVPR2, bir G protein bağlı reseptördür (GPCR). Bu şekilde G proteini aktive olur ve adenilat siklazı aktive eder. Sonuçta, oluşan cAMP, protein kinaz A'yı stimüle eder. Protein kinaz A, hücre içerisinde bulunan aquaporin su kanalı (AQP2) proteinlerini fosforilleyerek onların tetramerler halinde apikal membrana yerleşimlerini sağlar. Bu kanallar vasıtasıyla suyun idrardan böbrek hücrelerine geçişi sağlanır. Su geri emilimi uyarısı sona erdiğinde, AQP2 endositoz ile membrandan uzaklaştırılır. Bu kontrol sistemi içerisinde oluşabilecek herhangi bir patoloji vücudun su homeostazının bozulmasına ve DI gelişimine neden olur.

AQP2, böbrek ana toplayıcı kanal hücrelerinde, suyun geri emiliminden sorumlu olan homotetramerik bir su kanalıdır. *AQP2* genindeki mutasyonlar, fazla hacimde idrar üretilmesine neden olarak, vücut su homeostazının sağlanma sürecinde patojenik bir durum olan nefrojenik DI'yi (NDI) indüklemektedir. Bu mutasyonların NDI patogeneziindeki rolü için literatürde yer alan klinik ve deneysel gözlemlerle kanıtlanmış çeşitli hipotezler vardır. *AQP2* gen mutasyonlarının genelde mutant proteinin yanlış katlanmasına ya da bu proteinin yanlış hedeflenmesine yol açtığı tespit edilmiş olmakla birlikte; işlevsel olmayan su kanallarının, doğru membran hedeflemesi gösterdiği de bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, NDI tanısı konmuş hastaların *AQP2* geninde grubumuz tarafından tanımlanmış olan A45T, R85X ve A147T mutasyonlarının fonksiyon analizlerini gerçekleştirmektir.

Bu amaç kapsamında yapılan deneysel çalışmalarda; yabancı tip kodlayıcı *AQP2* dizisi taşıyan ifade vektörü temin edilmiş, site-directed mutagenез yöntemi kullanılarak mutant *AQP2* gen dizilerini içeren uygun ifade vektörleri hazırlanmıştır. Bu süreci takiben, yabancı tip ve mutant vektörlerin MDCK hücrelerine stabil transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Vektörlerin MDCK hücrelerinde ifadesi sağlanarak, mutant proteinlerin hücre içi olgunlaşma sürecinin karakterizasyonun araştırılması için deglikozilasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca proteinlerin yarı-ömürlerinin belirlenmesi amacıyla, sikloheksimid analizi yapılmış ve hem deglikozilasyon deneyleri hem de sikloheksimid deneylerine ait sonuçlar immünblot analizi ile değerlendirilmiştir. Mutant *AQP2* proteinlerinin hücre içi trafiğinin belirlenmesi için immünsitokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

*AQP2* gen mutasyonlarının *Xenopus laevis* oosit ifade sisteminde gerçekleştirilecek fonksiyon analiz çalışmaları kapsamında ise, yabancı tip ve mutasyonu bulunduran oosit ifade vektörlerinden elde edilen cRNA'ların oosit hücrelerine injeksiyonu gerçekleştirilerek, *AQP2* proteininin oositlerde ifade düzeylerini tespit edebilmek için total membran ve plazma membranları izole edilmiş, yabancı tip protein ile mutant proteinlerin membranlardaki oranları immünblot analizi ile karşılaştırılmıştır. Mutant *AQP2* proteinlerinin su alım mekanizması üzerine etkilerinin belirlenmesi için oosit hücrelerine su geçirgenliği testi uygulanmıştır.

Sonuç olarak tez kapsamında, çalışılan tüm mutant proteinlerin MDCK hücreleri ve *Xenopus laevis* oosit ifade sisteminde yabancı tipe göre farklı oranlarda fonksiyon değişikliği gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Diabetes insipidus, *AQP2*, Fonksiyonel analiz

## **ABSTRACT**

# **FUNCTIONAL ANALYSIS OF MUTATIONS FOUND IN AQP2 GENE OF PATIENTS WITH DIABETES INSIPIDUS**

**TUĞÇE KARADUMAN**

**Master of Philosophy, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN**

**June 2018, 111 pages**

The water homeostasis in the body is provided by balancing water loss and intake. Arginine vasopressin (AVP, ADH, antidiuretic hormone) is a hormone synthesized in the hypothalamus region of the brain and stored in the posterior part of the pituitary gland to be secreted when stimulated. In Diabetes Insipidus (DI) patients, production and activity of this hormone is reduced. This hormone regulates a vital function by increasing the reabsorption of water in the kidney collecting channel. Once the AVP hormone is secreted, AVP binds to the arginine vasopressin receptor 2 (AVPR2) which is a transmembrane protein localized on the basolateral membrane of polarized epithelial cells of kidney nephron. AVPR2 is a G protein bound receptor (GPCR). Thus, G protein becomes active and activates adenylate cyclase. As a result, produced cAMP stimulates protein kinase A. Protein kinase A phosphorylates the aquaporin (AQP2) proteins which are present in the cell to enable localization of these proteins in apical membrane in tetramers. Absorption of water from the urine to the kidney cells is ensured through these channels. When the water reabsorption stimulus is over, AQP2 is removed from the membrane by endocytosis. Any pathology that may occur within this control system causes impairment of water homeostasis of the body and generation of DI.



AQP2 is a homotetrameric water channel responsible for the reabsorption of water in the kidney's main collecting duct cells. Mutations in *AQP2* gene induce nephrogenic DI (NDI), a pathogenic condition in maintaining body water homeostasis, causing excess volume of urine to be produced. There are several hypotheses that have been proven by clinical and experimental observations in the literature regarding the role of these mutations in the pathogenesis of NDI. It has been proven that *AQP2* gene mutations generally lead to misfolding of mutant protein or misleading of this protein; It has also been reported that nonfunctional water channels indicate correct membrane targeting.

The purpose of this study is to perform functional analysis of A45T, R85X and A147T mutations identified in the *AQP2* gene in NDI patients. It is aimed to contribute to the treatment approaches for the development of pharmacological agents which can be more effective in the treatment of the disease through the evaluation of the results obtained from the experimental studies in correlation with the clinical information of the patients.

For the purposes of this study; expression vector carrying the wild-type coding *AQP2* sequence was provided and appropriate expression vectors containing mutant *AQP2* gene sequences were prepared using the site-directed mutagenesis method. Following this process, stable transfection of wild-type and mutant vectors into MDCK cells was performed. Deglycosylation experiments were conducted to investigate the intracellular maturation process of mutant proteins by expression of the vectors in MDCK cells. Cycloheximide analysis was also performed to determine the half-lives of the proteins and the results of both the deglycosylation experiments and the cyclohexamide experiments were evaluated by immunoblot analysis. Immunocytochemical analyses were performed to determine the intracellular traffic of mutant AQP2 proteins.

Within the framework of functional analysis studies performed on the *Xenopus laevis* oocyte expression system of *AQP2* gene mutations, oocyte expression vectors containing wild type and mutation were injected into oocyte cells and total membrane and plasma membranes were isolated in order to determine the expression levels of AQP2 protein in oocytes; wild type protein and mutant proteins membrane ratios were compared through immunoblot analysis. To determine the effects of mutant AQP2 proteins on water uptake mechanism, oocyte cells were tested for water permeability.

As a result, within the framework of this thesis, all mutant AQP2 proteins showed alteration of function compared to the wild type AQP2.

**Keywords:** Diabetes insipidus, AQP2, functional analysis

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarımın her aşamasında, akademik bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, destekleyen, öğrencisi olmuş olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli danışmanım Sn. Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Tez çalışmam için gerekli klinik desteği sağlayan Doç. Dr. Ferhat DENİZ'e,

Çalışmalarım kapsamında gerçekleştirdiğim analizler için bana laboratuvarını açan, ufkumun genişlemesine yardımcı olan Prof. Dr. Nuhan PURALI ve çok değerli asistanları Araş. Gör. Bora ERGİN ve Araş. Gör. Berk SAĞLAM'a,

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN'a,

Laboratuar çalışmalarım ve tez yazım aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr. Beril ERDEM, Dr. Emel SAĞLAR ve Dr. Sibel KÜÇÜKYILDIRIM'a,

Birlikte bütün mümkünlerin kıyısında olduğumuzu hissettiğim, sevgili tostum, Ankara kabuğum Arş. Gör. Merve ÖZCAN TÜRKMEN'e,

Varlıkları ile her anımı güzelleştiren, diğer Ankara kabuklarım Dilara ŞAHİN ve Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e,

Desteklerini onlar uzaktayken de yanımda hissettiğim, İstanbul kabuklarım, Dr. S. Elvan ÖZTÜRK ve İmren EDİZER DOĞAN'a,

Çalışmalarıma maddi destek sağlayan TÜBİTAK-BİDEB (2211-E) ve Hacettepe Üniversitesi ÖYP birimine,

Hoşgörü ve desteklerini daima yanı başımda hissettiğim, ilk kabuğum, sevgili aileme, bana sabrı, şükrü ve sükutu öğreten, attığım her adımın mimarı, canım babaanneme minnettarım.

Tuğçe KARADUMAN

Ankara, 2018

**BU TEZ ÇALIŞMASI, TÜBİTAK SBAG 115S499 VE HACETTEPE  
ÜNİVERSİTESİ BAP KOORDİNASYON BİRİMİ TARAFINDAN FHD-  
2018-16485 NUMARALI PROJELER KAPSAMINDA  
DESTEKLENMİŞTİR.**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ .....	3
2.1. Vücut Su Dengesi ve Böbrek Su Kanalları .....	3
2.1.1. Böbrek Su Kanalları.....	3
2.1.2. Vücuttaki Su Dengesinin Vazopressin ile Regülasyonu .....	6
2.1.3. Renal AQP2'nin Vazopressin ile Regülasyonu .....	6
2.1.4. AQP2 Regülasyonunun Hücresel ve Moleküler Mekanizması.....	8
2.2. Diabetes İnsipidus .....	11
2.2.1. Nefrojenik Diabetes İnsipidus .....	13
2.2.2. Konjenital NDI .....	14
2.2.2.1. X-Bağlantılı NDI ve AVPR2 mutasyonları.....	16
2.2.2.2. AQP2 Mutasyonları .....	18
2.2.2.3. Otozomal Çekinik NDI .....	20
2.2.2.4. Otozomal Baskın NDI.....	23
2.3. Nefrojenik Diabetes İnsipidus'da Genetik Test Değerlendirmesi .....	25
2.4. Nefrojenik Diabetes İnsipidus'da AQP2-Temelli Terapötik Yaklaşımlar .....	25
2.4.1. Fosfodiesteraz İnhibitörleri .....	25
2.4.1.1. Siklik GMP (cGMP) Yolak Aktivasyonu .....	25
2.4.1.2. Siklik AMP (cAMP) Yolak Aktivasyonu .....	26
2.4.2. Statinler .....	26
2.4.3. Prostaglandinler .....	27
2.4.4. Isı şoku proteini (Hsp90).....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	28
3.1. Fonksiyon Analizi Gerçekleştirilecek Olan Mutasyonların Belirlenmesi.....	29

3.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Mutant <i>AQP2</i> Genini İçeren İfade Vektörlerinin Site-Directed Mutagenез Yöntemi ile Hazırlanması .....	31
3.2.1. <i>AQP2</i> Geni Taşıyan İfade Vektörünün Temin Edilmesi .....	31
3.2.2. Yabancı <i>AQP2</i> cDNA Dizisinde Site-Directed Mutagenез Yöntemi ile Çalışılacak Olan Mutasyonların Oluşturulması, Oluşturulan Dizilerin İfade Vektörlerine Aktarılması ve DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Doğrulanması.....	33
3.3. MDCK Hücre Hattı ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları.....	43
3.3.1. MDCK Hücrelerinin Üretilmesi.....	44
3.3.2. Dondurulmuş Hücrelerin Açılması .....	44
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	45
3.3.4. Hücrelerin Dondurulması.....	45
3.3.5. Yabancı Tip ve Mutant <i>AQP2</i> Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin MDCK Hücrelerine Stabil Transfeksiyon Protokolü.....	46
3.4. Forskolin Uygulaması .....	49
3.5. Deglikozilasyon Deneyleri .....	50
3.6. Sikloheksimid Analizi .....	52
3.7. İmmünblot Analizi .....	53
3.8. Yabancı ve Mutant Tip Hücrelerde İmmünsitokimyasal Analiz .....	54
3.9. <i>Xenopus laevis</i> Oosit İfade Sistemi Çalışmaları .....	56
3.9.1. <i>Xenopus laevis</i> Oosit İfade Sistemi Çalışmalarında Kullanılacak Olan Yabancı Tip ve Mutant pT7TS-AQP2 Vektörlerinin Hazırlanması .....	59
3.9.2. <i>Xenopus laevis</i> Oositlerine Enjeksiyonu Gerçekleştirilecek Yabancı Tip ve Mutant cRNA'ların <i>in vitro</i> Eldesi için Yapılan Çalışmalar .....	60
3.9.2.1. Yabancı ve Mutant Tip Oosit İfade Vektörlerinin Doğrusal Hale Getirilmesi (Linearizasyonu).....	60
3.9.2.2. Yabancı ve Mutant Tip Lineer Oosit İfade Vektörlerinin Pürifikasyonu .....	61
3.9.2.3. Yabancı ve Mutant Tip cRNA'ların Eldesi/Ekstraksiyonu.....	62
3.9.3. <i>Xenopus laevis</i> Oositlerinin ve İlgili Besiyerlerinin Temini .....	64
3.9.4. <i>Xenopus laevis</i> Oositlerine Yabancı Tip ve Mutant pT7TS-AQP2 Vektörlerinden <i>in vitro</i> Olarak Elde Edilen cRNA'ların Enjeksiyonun Yapılması ...	64
3.9.5. İmmünblot Analizleri/ <i>Xenopus laevis</i> Oositlerinden Total ve Plazma Membranlarının İzole Edilerek, Yabancı ve Mutant Protein Miktarlarının Karşılaştırılması.....	66
3.9.6. Su Geçirgenlik Testinin Uygulanması.....	70
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	72
4.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılacak Mutant <i>AQP2</i> İçeren İfade Vektörlerinin Site-Directed Mutagenез Yöntemi ile Hazırlanması .....	72
4.1.1. <i>AQP2</i> Geni Taşıyan İfade Vektörü İzolasyonu .....	72

4.1.2. Yabancı AQP2 cDNA Dizisinde Site-Directed Mutagenesis ile Çalışılacak Olan Mutasyonların Oluşturulması, Oluşturulan Dizilerin İfade Vektörlerine Aktarılması ve Doğrulanması .....	73
4.2. MDCK Hücre Hattı ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar .....	76
4.2.1. Stabil Transfeksiyon Protokolü Uygulanarak Elde Edilen Hücre Hatlarına İlişkin Görüntüler .....	76
4.2.2. Yabancı ve mutant AQP2 protein ifadelerinin, stabil MDCK hücre hattı ve <i>Xenopus laevis</i> ifade sisteminde immüno-blot analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde ön bilgi .....	78
4.2.3. Forskolin Uygulaması Sonuçları .....	78
4.2.3.1. Forskolin Uygulama Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	79
4.2.4. Deglikozilasyon Deney Sonuçları .....	80
4.2.4.1. Deglikozilasyon Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	80
4.2.5. Sikloheksimid Analizi Sonuçları .....	81
4.2.5.1. Sikloheksimid Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	83
4.2.6. Yabancı ve Mutant Tip Hücrelerde İmmüno-sitokimyasal Analiz Sonuçları ....	83
4.2.6.1. Yabancı ve Mutant Tip Hücrelerde İmmüno-sitokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	84
4.3. <i>Xenopus laevis</i> Oosit İfade Sistemi Çalışmalarında Kullanılacak Olan Yabancı Tip ve Mutant pT7TS-AQP2 Vektörlerinin Hazırlanmasına İlişkin Sonuçlar .....	85
4.4. <i>Xenopus laevis</i> Oositlerine İnjesiyonu Gerçekleştirilecek Yabancı Tip ve Mutant cRNA'ların <i>in vitro</i> Eldesi için Yapılan Çalışma Sonuçları .....	88
4.4.1. Yabancı ve Mutant Tip Oosit İfade Vektörlerinin Linearizasyon Sonuçları ..	88
4.4.2. Yabancı ve Mutant Tip cRNA'ların Eldesi/Ekstraksiyonu .....	88
4.4.3. İmmüno-blot Analiz Sonuçları/ <i>Xenopus laevis</i> Oositlerinden Total ve Plazma Membranlarının İzole Edilerek, Yabancı ve Mutant Protein Miktarlarının Karşılaştırılmasına İlişkin Veriler .....	89
4.4.3.1. <i>Xenopus laevis</i> Oosit İfade Sistemi İmmüno-blot Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	91
4.4.4. Su Geçirgenlik Testine İlişkin Sonuçlar .....	91
4.4.4.1. Su Geçirgenlik Testine İlişkin Sonuçların Değerlendirilmesi.....	94
KAYNAKLAR.....	100
ÖZGEÇMİŞ .....	112

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1.	İnsan renal AQP proteinlerinin yerleşimi ve su akışındaki rolü.....	4
Çizelge 2.2.	AQP2 trafiği ya da endositoz sürecinde yer alan hücre içi sinyal yolları .....	10
Çizelge 2.3.	<i>AVPR2</i> ve <i>AQP2</i> genlerinde tanımlanan NDI ilişkili mutasyonlar.....	14
Çizelge 2.4.	AQP2-temelli NDI fenotipi gösteren fare modelleri.....	22
Çizelge 2.5.	Baskın NDI'ye neden olan mutasyonlar .....	24
Çizelge 3.1.	Fonksiyon analizi gerçekleştirilecek olan mutasyonlar .....	31
Çizelge 3.2.	Mutant AQP2 dizilerinin oluşturulması sırasında kullanılan primer dizileri.....	34
Çizelge 3.3.	<i>AQP2</i> geni için site-directed mutagenesis işlemleri sonucunda elde edilen bant büyüklükleri .....	36
Çizelge 3.4.	<i>AQP2</i> geninde site-directed mutagenesis işlemleri için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşen miktarları .....	37
Çizelge 3.5.	<i>AQP2</i> geninde site-directed mutagenesis işlemleri için gerçekleştirilen fusion polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşen miktarları .....	38
Çizelge 3.6.	PZR ürününün temizlenme basamağını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları .....	41
Çizelge 3.7.	Temizlenmiş PZR ürünlerinin işaretleme reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere kullanılan reaksiyon bileşen miktarları .....	42
Çizelge 3.8.	Transfeksiyonda kullanılacak plazmid DNA'larının hazırlanma protokolü .....	47
Çizelge 3.9.	Lipofektamin-Besiyeri karışımının hazırlanma protokolü.....	48
Çizelge 3.10.	Vektör linearizasyonu için kullanılan bileşen miktarları .....	61
Çizelge 3.11.	Linearizasyon sonrası pürifikasyon işlemi için kullanılan bileşenler.....	61
Çizelge 3.12.	cRNA eldesi için kullanılan reaksiyon bileşen miktarları .....	63
Çizelge 4.1.	Yabanıl ve mutant tip vektörlerin linearizasyon pürifikasyonuna ait sonuçlar.....	88
Çizelge 4.2.	Yabanıl ve mutant tip cRNA örneklerine ait sonuçlar .....	89



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1.	Renal AQP proteinlerinin yerleşiminin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2.	Böbrek toplama kanalı hücrelerinde AQP2 regülasyonu ile ilgili hücre içi moleküler mekanizmaların özeti .....	7
Şekil 2.3.	Arjinin vazopressin reseptörünün şematik gösterimi ve hastalığa neden olan <i>AVPR2</i> mutasyonlarının tanımlanması.. .....	17
Şekil 2.4.	AQP2 proteininin şematik gösterimi ve hastalığa neden olan <i>AQP2</i> mutasyonlarının tanımlanması. ....	19
Şekil 3.1.	Hücre kültüründe gerçekleştirilecek çalışmaların şematik gösterimi .....	29
Şekil 3.2.	A45T mutasyonu gösterimi için normal birey (a) ve hasta bireyin (b) DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü .....	30
Şekil 3.3.	R85X mutasyonu gösterimi için için normal birey (a) ve hasta bireyin (b) DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü.....	30
Şekil 3.4.	A147T mutasyonu gösterimi için normal birey (a) ve hasta bireyin (b) DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü .....	31
Şekil 3.5.	Tasarlanan site-directed mutagenез primerlerinin <i>AQP2</i> açık okuma çerçevesi üzerinde gösterimi.....	35
Şekil 3.6.	pcDNA5/FRT_AQP2 haritası ve tasarlanan primerlerin harita üzerinde gösterimi .....	36
Şekil 3.7.	Stabil transfeksiyon protokolü .....	46
Şekil 3.8.	a. <i>Xenopus</i> oositlerinde ekzojen proteinlerin ifadesinin şematik gösterimi. b. Bir yumurtalık lobunda bulunan evre V veya VI oositinin kollajenaz muamelesinin ardından görüntüsü.....	59
Şekil 3.9.	a. <i>Xenopus laevis</i> oositleri, b. Standart Barth's çözeltisi .....	64
Şekil 3.10.	cRNA injeksiyon basamağına ait görüntüler .....	65
Şekil 3.11.	a. Total membran izolasyonu uygulamaları için çalışma alanı, b. Yolk proteinlerini içeren debris, c. Total membran fraksiyonunu içeren lizat.....	67
Şekil 3.12.	Plazma membran izolasyonu uygulama basamakları.....	69
Şekil 3.13.	Su geçirgenliği test sisteminin bileşenleri .....	71
Şekil 4.1.	pcDNA5/FRT_AQP2 plazmidinin retransformasyon sonrası plak görüntüsü .....	72
Şekil 4.2.	pcDNA5/FRT_AQP2 plazmidinin %1'lik agaroz jel görüntüsü .....	72
Şekil 4.3.	<i>AQP2</i> geni A45T, R85X ve A147T mutasyonlarına ilişkin kısa PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde gösterimi.....	73

Şekil 4.4.	AQP2 geni A45T, R85X ve A147T mutantlarına ilişkin fusion PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde gösterimi.....	74
Şekil 4.5.	pcDNA5/FRT_AQP2 vektörü ve A45T, R85X ve A147T fusion PZR'larının <i>XhoI</i> ve <i>HindIII</i> ile kesimleri sonucu agaroz jel görüntüsü.....	74
Şekil 4.6.	A45T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	75
Şekil 4.7.	R85X mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	75
Şekil 4.8.	A147T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	76
Şekil 4.9.	pcDNA5/FRT_AQP2-WT plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü.....	76
Şekil 4.10.	pcDNA5/FRT_AQP2-A45T plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü.....	77
Şekil 4.11.	pcDNA5/FRT_AQP2-R85X plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü.....	77
Şekil 4.12.	pcDNA5/FRT_AQP2-A147T plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü.....	77
Şekil 4.13.	Forskolin uygulaması immünblot analiz sonuçları.....	79
Şekil 4.14.	a. Endo H deneyi immünblot analiz sonuçları b. PNGase F deneyi immünblot analiz sonuçları.....	80
Şekil 4.15.	a. Yabancıl tip (wt)-hücrelerde sikloheksimid uygulamasına bağlı AQP2 proteini ifadesindeki değişim b. Aktin ifade kontrol jeli.....	81
Şekil 4.16.	a. Mutant A45T-hücrelerinde sikloheksimid uygulamasına bağlı AQP2 proteini ifadesindeki değişim b. Aktin ifade kontrol jeli.....	82
Şekil 4.17.	a. Mutant A147T-hücrelerinde sikloheksimid uygulamasına bağlı AQP2 proteini ifadesindeki değişim b. Aktin ifade kontrol jeli.....	82
Şekil 4.18.	Stabil tranfekte MDCK hücrelerine sikloheksimid uygulaması sonrası wt-AQP2 ve A45T-AQP2, A147T-AQP2 mutant protein yarı ömürlerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi.....	82
Şekil 4.19.	Yabancıl ve mutant tip AQP2 ekspresyonu gösteren stabil MDCK hücre hatlarının AQP2 işaretli konfokal mikroskop görüntüleri a. Yabancıl tip, b. A45T, c. R85X, d. A147T.....	84
Şekil 4.20.	pT7TS plazmidinin retransformasyon plak görüntüsü.....	85
Şekil 4.21.	pT7TS plazmidinin %1'lik agaroz jelde gösterimi.....	85
Şekil 4.22.	<i>BglIII</i> ve <i>SpeI</i> ile çoğaltılan amplifikasyon görüntüleri.....	86
Şekil 4.23.	A45T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	86
Şekil 4.24.	R85X mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	87
Şekil 4.25.	A147T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü.....	87
Şekil 4.26.	Yabancıl ve mutant tip vektörlerin linearizasyon sonuçları.....	88

Şekil 4.27. Yabani ve mutant tip cRNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntüsü.....	89
Şekil 4.28. Total membran izolasyonu immüblot analiz sonuçları .....	90
Şekil 4.29. Plazma membran izolasyonu immüblot analiz sonuçları. ....	90
Şekil 4.30. Proteaz uygulama öncesi ve sonrası oosit fotoğrafları .....	92
Şekil 4.31. Su geçirgenlik testi uygulanan oositin 1 dakika içerisinde çekilmiş fotoğrafları.....	92
Şekil 4.32. Su geçirgenlik testi uygulanan iki oositin 0. ve 60.sn'deki fotoğrafları.....	93
Şekil 4.33. 4.31'de yer alan görüntülerin karşılaştırılmış hali.....	93
Şekil 4.34. Fotoğrafların Image J programı ile analizine ilişkin ara yüz .....	93
Şekil 4.35. <i>Xenopus</i> oositlerinde yabani ve mutant AQP2 proteinlerinin göreceli su geçirgenliği .....	94

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

°C	Celcius
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Å	Angstrom
ADH	Antidiüretik hormon
ADI	Adipsik diabetes insipidus
AQP2	Aquaporin 2
AVP	Arjinin vazopressin
AVPR2	Arjinin vazopressin reseptör 2
bç	Baz çifti
BSA	Bovin serum albumin
Ca	Kalsiyum
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CHIP28	Channel Forming Integral Protein
CREB	Siklik AMP yanıt elementi bağlanma proteini
cRNA	Capped RNA
DBS	Dovin bovine serum
DDAVP	Desmopressin
ddH <sub>2</sub> O	Double distile su
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfat
Del	Delesyon
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DI	Diabetes insipidus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit

## Kısaltmalar

EP	E-prostanoid reseptör
ER	Endoplazmik retikulum
F	İleri primer (forward primer)
FRT	Flp-Rekombinase Target
G	Gram
g/cm <sup>3</sup>	Gram/santimetreküp
GPCR	G-protein kenetli (coupled) reseptör
GTP	Guanozin trifosfat
HEPES	4-(2-hidroksiethyl)-1-piperazin etan sülfonik asit
HGMD	Human Genome Mutation Database
Hsp90	Isı şoku proteini
Kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton
LB	Luria bertani
M	Molar
M <sub>a</sub>	Moleküler ağırlık
MDCK	Madin-Darby canine kidney hücresi
mEq	Miliekivalent
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
ml/kg	Mililitre/kilogram
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmolar
mOsm/kg	Miliosmolar/kilogram
mpkCCD	Fare klonal CCD ana hücre hattı
MR	Manyetik rezonans
mRNA	Messenger RNA (Elçi RNA)
mut	Mutant
mut-AQP2	Mutant AQP2
NaCl	Sodyum klorür

## Kısaltmalar

NDI	Nefrojenik diabetes insipidus
nl	Nanolitre
nm	Nanometre
NPA motifi	Asn-Pro-Ala motifi
NTP	Nükleozid trifosfat
ORF	Açık okunma çerçevesi
p38-MAP kinaz	p38-Mitojen aktive protein kinaz
P <sub>a</sub>	Fosforilasyon siti
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBST	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi, Tween 20'li
PDE	Fosfodiesteraz
PKA	Protein kinaz A
pmol	Pikomol
PTM	Postranslasyonel modifikasyon
PVDF	Polyviniliden difluorid
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Geri primer (revers primer)
RISC	RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakika başına devir sayısı (round per minute)
sdH <sub>2</sub> O	Steril distile H <sub>2</sub> O
TM	Transmembran domeyn
U	Ünite
UT-B	Üre-transporter B
V	Volt
wt	yabanıl tip
wt-AQP2	yabanıl tip AQP2
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

# 1. GİRİŞ

Aquaporin-2 (AQP2), böbrek toplama kanalının ana hücrelerinde spesifik olarak ifade edilen bir su kanal proteindir. Bilinen tüm aquaporinlerde olduğu gibi, AQP2 de dört özdeş altbirimden oluşur ve her biri kendi işlevsel geçiş kanallarını taşır. Su kanallarının vücut su homeostazının düzenlenmesinde merkezi olan etkinliği, kanalın apikal ifadesini düzenleyen antidiüretik hormon vazopressinin (ADH, AVP) sıkı kontrolü altındadır [1-4]. *AQP2*'deki doğal mutasyonlar nefrojenik Diabetes insipidus'dan (NDI) sorumludur. Bu tip DI'de etkilenen bireyler idrarı konsantre etmede yetersizdir ve bu bireylerde fazla idrar üretimi ile birlikte polidipsi, dehidrasyon gibi genel sağlık sorunlarına ve muhtemelen ölüme rastlanır [5, 6].

*Xenopus laevis* (*X. laevis*) oositleri ve hücre hatları gibi çoğunlukla heterolog ifade sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, NDI'ya neden olan *AQP2* mutasyonlarının (mut-AQP2) protein sentezinin etkili şekilde indirgenmesine [7] [8], non-fonksiyonel senteze (kalite kontrolü/olgunlaşma) ve hatalı yönlendirmeye [7, 9, 10] neden olduğu bulunmuştur. Literatürde yer alan çoğu mut-AQP2 formunun çekinik olduğu bulunmuştur. Bu tip patogenezi sadece mut/mut homozigotlarında gözlenirken bir yabancı tip alel (wt-AQP2) taşıyan wt/mut heterozigotlar ise asemptomatiktir.

Genel olarak, mutasyona uğramış proteinin yanlış katlandığı, çoğunlukla hücre içinde endoplazmik retikulumda (ER) tutuklandığı ve erken degradasyona uğradığı düşünülmektedir (sınıf II mutasyonlar) [11]. Bu mutasyonların, proteinin kanal bölgesini oluşturan kısımda yaygın oldukları bulunmuştur. Şimdiye kadar tanımlanan az sayıdaki baskın (dominant) mutasyonun, proteinin hücre içi karboksil ucunda (C-ucu) yerleşim gösterdiği ve kanalın yapısına katılmayan bir bölgede yer aldığı kanıtlanmıştır [12]. Sonuç olarak, çekinik formların tersine baskın mutasyonlar, wt/mut heteromerik komplekslerin ER'de tutulması yoluyla (baskın negatif etki) heterozigot durumda NDI fenotipine neden olsalar da, mutant protein yabancı tiple etkileşim yeteneğini koruyarak, heterotetramerler oluşturmaktadır [13]. Aynı zamanda, bazı *AQP2* mutasyonlarının fonksiyonel olmayan su kanalları oluşumuna neden olmasına rağmen, bu proteinlerin plazma membranına yeterince ulaşabildiği gösterilmiştir [14]. Bu temel özellikler, kanalın homotetramerik yapısı

içindeki altbirim etkileşimlerinin kanal fonksiyonunda merkezi etkiye sahip olduğunu göstermiş, AQP2'ye bağımlı NDI için genel bir model oluşturmuştur [15, 16].

Mutant su kanallarının hücre içi fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar, hastalık fenotipine yol açan mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve bu patolojik mekanizmalara ilişkin farmakolojik stratejilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, grubumuz tarafından Diabetes İnsipidus'a neden olan moleküler patolojilerin tespit edilmesi amacıyla 2010 yılında başlatılan ve halen sürmekte olan çalışmalarda nefrojenik veya santral Diabetes insipidus tanılı hastalarda *AVPR2*, *AQP2* ve *AVP* genlerinin DNA dizi analizi yöntemiyle taranması sonucunda, *AQP2* geninde tespit edilen A45T, R85X ve A147T mutasyonlarının, ilgili proteinin MDCK hücreleri ve *X. laevis* oositlerindeki miktarı, yerleşimi ve fonksiyonunda meydana getirdiği değişikliklerin yabancı tip protein fonksiyonu ile karşılaştırılarak belirlenmesidir.

Bu amaç doğrultusunda stabil MDCK hücre hatları kullanılarak, yabancı tip ve mutant proteinlerin,

- Hücre içi olgunlaşma sürecinin karakterizasyonu için deglikozilasyon deneyleri,
- Yarı ömürlerinin belirlenmesi amacıyla sikloheksimid analizi,
- Hücre içi trafiğinin belirlenmesi için immünsitokimyasal analizler yapılarak test edilmiştir.

*X. laevis* oosit ifade sisteminde ise yabancı tip ve mutant proteinlerin,

- Oositlerde ifade düzeylerini tespit edebilmek için total membran ve plazma membranları izole edilmiş, membranlardaki oranları immünblot analizi ile karşılaştırılarak plazma membranına ulaşma kapasiteleri değerlendirilmiştir.
- Su alım kapasitelerindeki farklılıkların belirlenmesi için oosit hücrelerine su geçirgenliği testi uygulanmıştır.

Sonuç olarak, analizleri gerçekleştirilen tüm mutant proteinlerin yabancı tipe göre farklı derecelerde fonksiyon farklılaşması gösterdiği bulunmuştur.



## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Vücut Su Dengesi ve Böbrek Su Kanalları

Böbrekler, vücuttaki su ve sodyum dengesini düzenler [17, 18]. Böbrek tübülündeki suyun emilmesi, suyun geri emilimi için oluşan itici güce ve suyun tübüler epitelyumdan geçişini sağlayacak olan ozmotik dengeye bağlıdır. Glomerüler filtratın çoğunluğu, temel olarak proksimal tübüller ve Henle kulpunun inen ince kolları tarafından geri emilir. Yukarı çıkan ince kollar, kalın kollar ve distal kıvrık borular nispeten su geçirmezdir ve tübüller sıvıyı bağlantı tüplerine ve toplama kanallarına gönderirler. Toplama kanalları, vücut su dengesinin düzenlenmesinde önemlidir, zira AVP tarafından düzenlenen su geri emilimi bu tübüller segmentte meydana gelir [17, 19, 20].

Vücuttaki su dengesi, su kanalları (AQP'ler) ve sodyum taşıyıcıları aracılığıyla su ve sodyumun böbrekteki geri emilimi/sekresyonunu kapsayan bir dizi hücresel ve moleküler süreç sayesinde başarıyla düzenlenir [17-22]. Su, lipit çift tabakaları boyunca yavaşça difüze olabileceğinden, tüm biyolojik zarlar bir miktar su geçirgenliği sergiler [17, 23]. Bununla birlikte, renal tübüller epitel hücreleri, su transportu ve idrar konsantrasyonu için belirgin olarak yüksek su geçirgenliği olan plazma zarlarına sahip olmak zorundadırlar. Buna uygun olarak, aquaporin membran su kanalının tanımlanması, su dengesinin fizyolojisine ve su denge bozukluklarının patofizyolojisine yeni bir bakış açısı sağlamıştır [17, 24, 25].

#### 2.1.1. Böbrek Su Kanalları

Su kanalları, ilk olarak Agre ve arkadaşlarının Rh faktörü üzerine yaptığı çalışmalar sırasında tanımlanmıştır. Keşfedilen protein 28 kilodalton (kDA) ağırlığındadır ve kanal oluşturan integral protein (**CH**annel-forming **I**ntegral **P**rotein, CHIP28) olarak isimlendirilmiştir. *X. leavis* oositleri üzerinde yapılan çalışmalar her bir kanalın çok yüksek su geçirgenliğine sahip olduğunu göstermiştir. İnsan Genom Organizasyonu 1997'de ilgili kanallara aquaporin adını vermiştir [26].

Keşiften bu yana on üç memeli aquaporini tanımlanmıştır. Aquaporinlerin üç ana alt tipi bilinmektedir.

- Su moleküllerini taşıyan, su seçici kanallar olan klasik su aquaporinleri (AQP1, -2, -4 ve -5)
- Suyu ek olarak yüksüz küçük moleküllere geçirgen olan akuagliseroporinler (AQP3, -7, -9 ve -10);
- Şu anda işlevleri üzerinde çalışılmakta olan, unortodox aquaporinler (AQP6, -8, -11 ve -12).

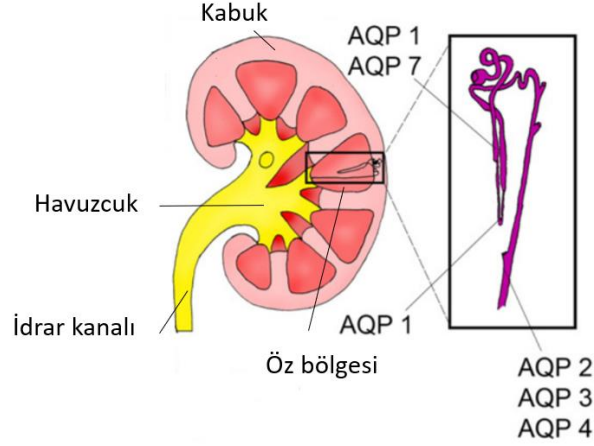
Bilinen aquaporinlerden sekizi (AQP1, -2, -3, -4, -6, -7, -8 ve -11) memeli böbreklerinde ifade edilir [18-20,22]. Bu renal aquaporinler, proksimal tübülde, inen kolda, vasa recta'da ve toplama kanallarında tespit edilmiştir [17].

İnsanlarda su transportunda görev yapan beş tip renal aquaporin tanımlanmıştır. Bu aquaporinlerin yerleşimi ve görevleri Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1'de belirtilmiştir [27].

Çizelge 2.1. İnsan renal AQP proteinlerinin yerleşimi ve su akışındaki rolü [27]

Sistem	AQP protein yerleşimi	Hücreler arası su akışında aquaporinlerin rolü
Renal	Proksimal tübül – • AQP1 (apikal ve bazolateral) • AQP7 (düz ve kıvrımlı apikalde yerleşim)	AQP1 suyun geri emiliminde rol oynar, AQP7'nin rolü bilinmiyor.
	Böbrek toplama kanalı hücreleri- • AQP2 (apikal ve subapikal veziküllerde) • AQP3 ve AQP4 (bazolateral)	AQP2, AVP aracılı su emilimi ile idrarı konsantre eder. AQP3 ve AQP4 kana çıkış yollarıdır.
	Henle kulpunun inen ince kolu- • AQP1	Su geri emilimi
	İnen vasa recta- • AQP1	Su geri emilimi
	Bağlantı tübülü- • AQP3	Su dengesi

AQP1, olağanüstü yüksek su geçirgenliği olan proksimal tübülde apikal ve bazolateral plazma membranlarında bol miktarda ifade edilir. Böbrekte yer alan membran proteinlerinin %3'ünü oluşturmakta, proksimal ve henle kulpunun inen ince kıvrımındaki tübül epitel hücrelerinden su geri emilimini sağlamaktadır [17].



Şekil 2.1. Renal AQP proteinlerinin yerleşiminin şematik gösterimi [27]

Toplama kanalı hücrelerinde, vazopressin ile düzenlenen su kanalı AQP2, apikal plazma zarında ve subapikal vesiküllerde oldukça bol miktarda bulunur [28, 29]. Toplama kanalındaki suyun geri emilimi hem kısa vadeli düzenleme hem de uzun vadeli adaptasyon mekanizmaları tarafından düzenlenir ve her ikisi de esasen AQP2 ifadesine bağlıdır. Toplama kanalı, böbrek su atılımının düzenlendiği son yer olması bakımından hem AQP2 trafiği hem de protein miktarındaki değişimler, toplama kanalının su geçirgenliğini etkiler. Bu durum da idrarın konsantre edilme kapasitesinde farklılaşmaya neden olduğu için çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynayabilir [18-20, 22].

AQP2 üzerinden apikal membranda gerçekleşen su transportunun tersine, toplama kanalı ana hücrelerinin bazolateral plazma zarındaki su transportuna AQP3 ve AQP4 [30, 31] aracılık eder. Lityum kaynaklı NDI'lı sıçanların poliüri ve üriner yoğunlaşma defekti semptomları ile birlikte, indirgenmiş apikal AQP2 ve bazolateral AQP3 ifade düzeylerine sahip olduğu bildirilmiştir [32, 33]. Dahası, AQP3'ten yoksun transgenik fareler şiddetli poliüriktirler [34] ve AQP4-kusurlu farelerdeki iç medüller toplama kanalları, vazopressin ile uyarılan su geçirgenliğinde önemli bir düşüşe sahiptir. Bu nedenle, bazolateral membranda gerçekleşen su transportunun suyun

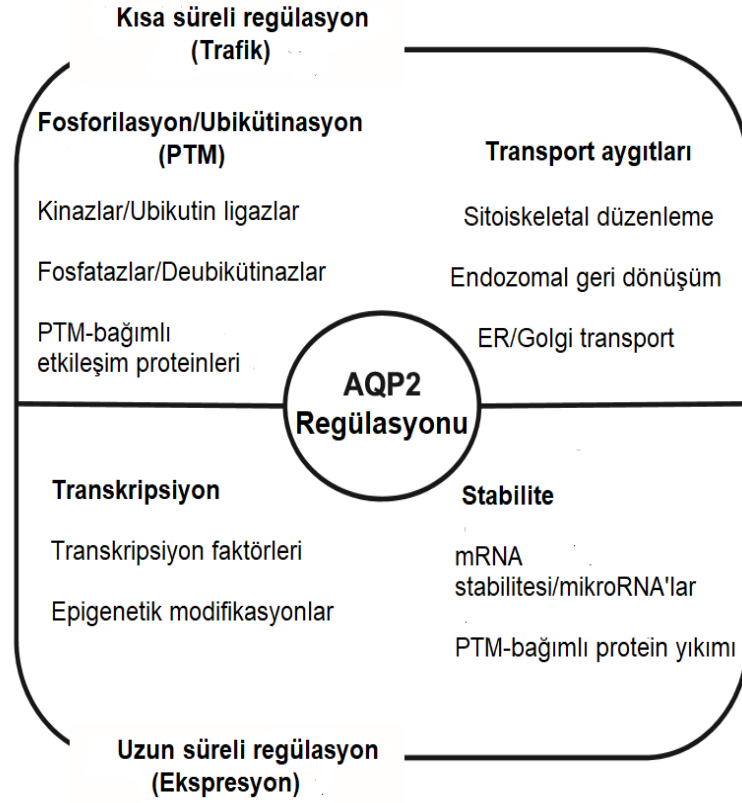
geri emiliminde kritik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir [35]. Akuagliseroprin sınıfından olan AQP7, proksimal tübülde tespit edilmiştir; fakat bu bölgedeki işlevi net olarak bilinmemektedir [27].

### **2.1.2. Vücuttaki Su Dengesinin Vazopressin ile Regülasyonu**

AVP, böbrekteki su atılımının/geri emiliminin düzenlenmesi yoluyla plazma ozmolalitesini kontrol eden bir peptit hormondur [36]. Hipotalamus, posterior hipofiz bezi ve böbrekleri içeren geri bildirim mekanizması tüm vücudun ozmotik regülasyonunda kilit rol oynamaktadır [18]. Hipotalamustaki Verney reseptörü, plazma ozmolalitesinin değişimini algılar ve plazma ozmolalitesi fizyolojik bir eşğin üstüne (çoğu birey için 290-295 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) yükseldiğinde peptit hormonu AVP salınır. AVP'nin etkili olduğu temel yer, suyu, üreyi ve sodyum transportunu düzenleyen böbrek toplama kanalıdır [18-20, 22, 36]. AVP, böbrek toplama kanalı ana hücrelerinin bazolateral bölgesinde yer alan G proteinle ilişkili arjinin vazopressin reseptör 2'ye (AVPR2) bağlanır. Karmaşık bir düzenleyici mekanizma sayesinde toplama kanalının epitelinde değişen ozmotik denge, su transportu ile sonuçlanır ve filtre edilen su tekrar kana döner. AVP'nin su atılımını azaltma kabiliyeti büyük ölçüde iki moleküler su kanalı olan, AQP2 ve AQP3'ün düzenlenmesi ile böbrek toplama kanalı hücrelerinde meydana getirdikleri değişiklikler yoluyla oluşur [17].

### **2.1.3. Renal AQP2'nin Vazopressin ile Regülasyonu**

AQP2'nin apikal trafiğinde ve endositozunda yer alan sinyal iletim yolları ve AQP2 protein miktarındaki değişiklikler yaygın olarak çalışılmıştır (Çizelge 2.2). AQP2, böbrek toplama kanalı su geçirgenliğine ilişkin süreçlerin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır [18-20, 22, 36] (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Böbrek toplama kanalı hücrelerinde AQP2 regülasyonu ile ilgili hücre içi moleküler mekanizmaların özeti [37]. Toplama kanallarında su geçirgenliği, AQP2 aracılığıyla, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında iki mekanizma ile düzenlenir. Kısa süreli düzenleme; hücre içi veziküller ile plazma membranı arasındaki trafik akışı, AQP2'nin posttranslasyonel modifikasyonu ve hücre sinyalizasyonuna bağlı vezikül transport sistemleri ile ilişkilidir. Uzun süreli düzenleme; protein miktarının değişimi, transkripsiyon ve mRNA/protein kararlılığı ile sağlanır. PTM: posttranslasyonel modifikasyon [37].

Toplama kanallarında su geçirgenliği, AQP2 aracılığıyla çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında 1) kısa vadeli düzenleme 2) uzun vadeli düzenleme olarak adlandırılan iki mekanizma ile düzenlenir.

Kısa vadeli düzenleme, vazopressinin bazolateral plazma membranındaki AVPR2'yi ve AQP2'nin hücre içi veziküllerden apikal plazma membranına yer değiştirmesini uyararak, toplama kanalı ana hücrelerinde su geçirgenliğini hızla arttırdığı süreçtir. Bu yanıt, tübül çevresi vazopressinin konsantrasyonu arttıktan sonra 5 ila 30 dakika içinde görülür ve bu süreç çok sayıda basamağı içermektedir. Mekanizma şu şekilde gerçekleşmektedir; AVP, toplayıcı tübül ana hücresinin bazolateral membranında yerleşim gösteren AVPR2'ye bağlanır. Guanozin trifosfat (GTP) ilişkili proteinin aktivasyonu ile adenilat siklaz uyarılır. Aktive edilen adenilat siklaz ise cAMP sentezini indükler. cAMP, protein kinaz A (PKA)'nın düzenleyici alt birimine bağlanır ve katalitik birimini aktif hale getirir. Bu mekanizma hücre içi veziküllerinde bulunan

AQP2'nin fosforilasyonunu tetikler. Bu aşamadan sonra AQP2'ler hücre iskeletinde yer alan mikrotübül motor proteinleri (dynein/dyneectin) ile ilişki kurarak apikal membrana doğru yönelirler. Apikal membrana ulaşan AQP2, VAMP2, syntaxin-4, NSF gibi vezikül ile ilişkili membran proteinleri olan çeşitli reseptörler ile apikal membrana tutunur ve ekzositoz meydana gelir. Bu mekanizma ile ozmotik suyun tübül lümeninden hücreye geçişi sağlanmaktadır. Uyarının ortadan kalkması halinde endositoz ile AQP2 apikal membrandan hücre içine döner ve inaktif duruma geçer. AQP2 apikal membrandan lümene de dökülebilir. Bu şekilde AQP2 proteini idrarla elde edilebilir bir biyolojik belirteç olmaktadır. AQP2'nin bu aktivitesi AVP'nin kısa süreli etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Bu süreçteki diğer hipotez, AQP2 genindeki cAMP sorumlu elemanı bağlayan proteinin (CREB-P) promotor (AP) bölgelerinin aktivasyonunun PKA ile sağlanmasıdır ve bu şekilde de AQP2 sentezi artırılmaktadır. Ancak bu "geç etki" şeklinde ortaya çıkmaktadır [38-40].

Toplama kanalı su geçirgenliğinin uzun vadeli düzenlenmesi, dolaşımdaki vazopressin seviyeleri birkaç saat içinden günlere doğru yükseldiğinde görülür ve bu da toplama kanallarındaki hücre başına AQP2 miktarının artmasına neden olur. Bu işlem idrarın konsantrasyonuna izin verir ve su dengesi için gereklidir [17].

#### **2.1.4. AQP2 Regülasyonunun Hücresel ve Moleküler Mekanizması**

AVPR2, sadece böbreğin toplama kanalının ana hücrelerinde değil aynı zamanda kalın çıkan kanal hücrelerinde ve distal tübül hücrelerinde de ifade edilmektedir [41]. Kalın yükselen kanalda, AVP, sodyum klorürün geri emilimini aktif olarak düzenler. Dolayısıyla hem karşı akım hızının çoğaltılmasında hem de lüminal seyreltmede rol oynar. AVP ayrıca, tiazid diüretiklerinin etki alanı olan distal tübülde aktif sodyum klorür geri emilimini hızlandırır. Sodyum klorür transportuna ilişkin bu durumlara rağmen, vücut su dengesi açısından en önemli işlem, iki su kanalı olan AQP2 ve AQP3 yoluyla toplama kanalında gerçekleşen düzenlenmedir [17].

AQP2'nin kısa vadeli düzenlenmesi, membran trafiği sonucunda ortaya çıkmaktadır [29, 42].

Vazopressin ile uyarılmama halinde AQP2 su kanalları ağırlıklı olarak geri dönüşüm endozomlarında bulunmuştur [19, 29]. Bu durum, apikal geri dönüşüm endozomlarının bir göstergesi olan Rab11 proteininin AQP2 kolokalizasyonu bulguları ile gösterilmiştir [43]. Bunun aksine, izole edilen toplama kanallarına AVP eklendiğinde, AQP2 su kanalları ağırlıklı olarak apikal plazma zarında görülmüştür. AVP'nin bu etkisi, AQP2 proteininin C-ucu yakınındaki dört serin kalıntısının (S256, S261, S264 ve S269) fosforilasyonundaki değişikliklerle ilişkilidir [44-46].

AQP2'nin ekzositozu, S256'deki fosforilasyon ile ilişkilidir [47]. AVP ayrıca S269'da fosforilasyonu belirgin bir şekilde artırır [45]. AVP ile artırılan bu fosforilasyon olayı, AQP2 endositozunu inhibe eder [48, 49]. AVP, bir veya daha fazla MAP kinaz aktivitesini azaltarak S261'in fosforilasyonunu azaltır [50, 51]. Bu bölgedeki fosforilasyonun, AQP2 proteininin azalmış stabilitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [50]. Dahası, AQP2'nin fosforilasyonu, AQP2 içeren veziküller aracılığıyla gerçekleşen bir mekanizma ile, hücre iskeletine, mikrotübüllere veya aksesuar çapraz bağlayıcı proteinler arasındaki etkileşime etki edebilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, AQP2 fosforilasyonunun hücre dışı pH değişiklikleri tarafından etkilenebileceği gösterilmiştir [52].

AQP2'nin uzun süreli düzenlemesi, toplayıcı kanal hücrelerinde vazopressinin neden olduğu, AQP2 proteininin miktarındaki artış olarak ortaya çıkar. Bu uzun vadeli durumun, transkripsiyonel veya transkripsiyon sonrası düzenleyici süreçlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. AQP2 proteininin yarı ömrü AVP ile artırılabilir. Kültür şartlarındaki mpkCCD hücrelerinde yarılanma ömrü 9'dan 14 saate çıkmıştır [53]. AVP, bir PKA ve p38-MAP kinaz bağımlı yol ile proteinin protezomal degradasyonunu değiştirerek AQP2 protein miktarını artırır [50]. AQP2, proteazom ve lizozomda degrade edilir [54, 55].

Çizelge 2.2. AQP2 trafiği ya da endositoz sürecinde yer alan hücre içi sinyal yolları [37]

Yolaklar	AQP2 Protein Modifikasyonu
<b>Trafik</b>	
cAMP/PKA	Fosforilasyon (S256)
Hücre içi kalsiyum (Ca <sup>2+</sup> ) hareketi (kalsiyum-kalmodulin aracılı miyozin aktivasyonu)	Fosforilasyon (S256)
PI3K-bağımlı AKT aktivasyonu	Fosforilasyon (S256)
AS160 fosforilasyonu	Rab-GTP ilişkili
Rho bağımlı sitoiskeletal dinamikler	Fosforilasyon (S256)
<b>Endositoz</b>	
Klatrin-aracılı endositoz	
AQP2 übikütinasyonu	Übikütinasyon (K270)
PGE2	Fosforilasyon (S256) Fosforilasyon (S264) Fosforilasyon (S269)
Dopamin	Übikütinasyon (K270) Fosforilasyon (S261)

Endositoz ve ardından proteazomal/lizozomal hedeflenme sürecinin regüle edildiği ya da AQP2 proteininin C-ucu kuyruğunun lizin 270 [54]'te übikütinasyona uğratıldığı düşünülmektedir. AQP2 bozunmasına spesifik E3 übikitin-protein ligazlarının belirlenmesi çalışmaları halen devam etmektedir [55]. AVP tarafından uyarılan S269 fosforilasyonu ile lizin 270'deki übikütinasyon arasındaki ilişki güncel bir araştırma konusudur. Bununla birlikte, AQP2 geninin transkripsiyonu, vazopressin ile belirgin şekilde artar. Bu da hücrel mRNA düzeyi ve AQP2 translasyonunun artışı ile sonuçlanır [56]. AQP2'nin transkripsiyonel düzenlenmesinin, vazopressin kaynaklı hücre içi cAMP düzeylerindeki artışın bir sonucu olarak PKA aktivasyonundaki eş zamanlı artışlara bağlı olarak gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Çizelge 2.2) [56].



AQP2'nin transkripsiyonel düzenlenmesine ek olarak mikro RNA (miRNA), transkripsiyon sonrası regülasyonda hedef mRNA'nın translasyonunun RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksi (RISC) [57] yoluyla baskılanmasını sağlamaktadır. Yakın tarihli bir çalışmada, AQP2 ifadesini hedeflediği tahmin edilen miRNA'ların *in silico* analizi gerçekleştirilmiş ve iki aday AQP2-hedefleyen miRNA (miR-32 ve miR-137) ve AQP2 protein regülasyonunun yeni bir moleküler mekanizmasının keşfi için araştırılmaya devam edilmektedir. Bu çalışma, AQP2 protein ifadesinin, en azından kısmen, RNA girişimi yoluyla (AQP2-hedefleyici miRNA'lar ile) regülasyonu üzerine yeni bir fikir vermektedir [58].

Prostaglandinler, anjiyotensin II, aldosteron, PI3K/Akt yolları, hücre iskeleti, hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu ve vezikül hedefleme reseptörlerini kapsayan diğer sinyal iletim yollarının da AQP2'nin moleküler ve hücre düzeyinde regülasyonunda rol oynadığı diğer çalışmalarda tanımlanmıştır [19, 20, 22, 42, 52, 59-62].

Vücuttaki su dengesinin kontrolü, moleküler ve hücre düzeyinde çok sayıda bileşenin yer aldığı oldukça karmaşık bir mekanizma ile kontrol edilmektedir. Bu süreçte vücudun su ihtiyacının sensörü olan hormonu (AVP), bu hormonun bağlanacağı reseptörü (AVPR2) ya da hücre içinde etkileyeceği fonksiyonel su kanalını kodlayan gende (AQP2) gerçekleşen herhangi bir mutasyon poliüri, hipozmolar üre ve hipernatremi ile karakterize edilen ve nadir bir hastalık olan DI'ya neden olabilmektedir.

## 2.2. Diabetes İnsipidus

Diabetes insipidus (DI) çok karmaşık ve nadir bir hastalıktır. "Diabetes insipidus" ifadesi iki kelimenin "Diabet" ve "insipidus" kombinasyonudur. Diabet, Yunancadan köken alan "sifon" anlamına gelen bir kelime ve insipidus ise, "tatsız" anlamına gelen Latince kökenli bir kelimedir. DI aslında AVP üretiminin patofizyolojisine ve etkisine bağlı olarak gelişen vücuttaki suyun korunmasındaki yetersizliktir. AVP, hipotalamusta bulunan supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerin nöronları tarafından üretilir [63]. Üretimden sonra AVP, hipotalmo-hipofizeal yol boyunca hareket eder ve posteriyor hipofizde depolanır ve daha sonra, ozmoreseptörlerden uygun uyarı aldığında depo edildiği yerden salınır [64]. Polidipsi, poliüri,

hipernatremi, dehidratasyon ve şiddetli susuzluk DI'nın en yaygın belirtileridir. [65-68]. DI'nın genel popülasyondaki insidansı yaklaşık 3:100.000 'dir [69].

Diabetes insipidus aşağıdaki alt tiplere sahiptir [70].

1. Nörohipofizeal (Santral) Diabetes insipidus
2. Nefrojenik Diabetes insipidus
3. Gestasyonel Diabetes insipidus
4. Adipsik Diabetes insipidus
5. Primer polidipsi
  - a. Dipsogenik Diabetes insipidus
  - b. Fizyojenik Diabetes insipidus

DI, poliüri ve hipotonik idrar ile tanımlanır. Poliürinin onaylanması için, idrar çıkışı 40 ml/kg/24 saatten fazla olmalıdır. DI onayı için idrar ozmolalitesi <300 mOsm/kg olmalıdır. Poliüri, hasta geçmişi ile doğrulanabilir. Çeşitli DI varyantlarının ayırıcı tanısı için su kısıtlaması testi uygulanır. Bu testi kişiye uygularken AVP üretimini uyarmak amacıyla etkili şekilde dehidratasyon gereklidir ve ağırlıktan %3 kayıp olana dek ya da plazma sodyum düzeyi 145 mmol/L'ye ulaşana dek her boşaltımda hacim ve ozmolalite ölçümü yapılmalıdır. Ardından kişiye desmopressin (DDAVP) uygulanır. İdrar konsantrasyonu %50 veya daha fazla artarsa kişi santral DI'dan muzdariptir, konsantrasyondaki artış %10'dan az bir oranda ise teşhis nefrojenik DI olarak konulmaktadır. Eğer idrar ozmolalitesi 750 mOsm'dan fazla artış gösterirse santral DI ya da primer polidipsi düşünülür. Primer polidipsi, santral DI'dan dehidratasyona yanıt olarak idrarı konsantre etme yeteneği ile ayırt edilir ve santral DI hastalarında ise bu yetenek yoktur. Santral DI, sella turcica'da manyetik rezonans görüntüleme ile belirlenebilen parlak noktaların tespiti ile teşhis edilir. Manyetik rezonans (MR) görüntüleme ve diğer radyolojik teknikler adipsik Diabetes

insipidus'un (ADI) tanımlanmasına yardımcıdır. ADI'nın konformasyonunda MR ve diğer radyolojik teknikler yardımcı olur.

DI'nin uygun tedavisi, su kaybının yerine konulmasını ve hipernatremi gibi bulguların düzeltilmesini içerir. Susama mekanizması DI kontrolünde önemli rol oynar; çünkü susamaya bağlı olarak sıvı alımı, sıvı kaybını hemen yerine koyar. Fakat susama mekanizması bilinci yerinde olmayan hastalarda ve bebeklerde çok fazla etkili değildir. Hipernatremik değerler çok hızlı düzeltilmemelidir; çünkü serebral ödem, nöbet ve ölüme neden olabilir. Hipernatreminin düzeltildiği oran 0.5 mEq'dan büyük olmamalıdır. Psikojenik ve dipsojenik DI için en iyi yönetim sıvı alımının kısıtlanmasıdır; ancak yeterli sıvı alımı, ADI için en uygun yöntemdir [70].

Bu semptomatik tedavilerin dışında nefrojenik Diabetes insipidus ve nörohipofizeal (santral) Diabetes insipidus kalıtsal formlara sahiptir ve bu grup için genetik danışmanlık önerilmektedir [71].

### **2.2.1. Nefrojenik Diabetes İnsipidus**

Nefrojenik Diabetes insipidus (NDI), böbreklerde AVP yanıtına duyarsızlık nedeniyle ortaya çıkmaktadır [69]. Yetişkinlerin çoğu kazanılmış NDI formuna sahiptir; fakat NDI konjenital nedenlerle de ortaya çıkabilmektedir [70]. Human Genome Mutation Database'de (HGMD) yer alan NDI'ye yol açan mutasyonlar Çizelge 2.3'te verilmiştir [72].

Çizelge 2.3. *AVPR2* ve *AQP2* genlerinde tanımlanan NDI ilişkili mutasyonlar [72]

Mutasyon Tipi	Kromozomal lokasyon	Toplam mutasyon sayısı
<b><i>AVPR2</i></b>	Xq28	
Yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar		155
Kırılma mutasyonları		3
Küçük delesyonlar		49
Küçük insersiyonlar		15
Küçük indeller		5
Geniş delesyonlar		22
Geniş insersiyonlar/duplikasyonlar		1
Kompleks yeniden düzenlemeler		4
Toplam		254
<b><i>AQP2</i></b>	12q12-q13	
Yanlış anlamlı/anlamsız mutasyonlar		44
Kırılma mutasyonları		4
Küçük delesyonlar		9
Küçük insersiyonlar		1
Toplam		58

Kazanılmış NDI formları çoğunlukla bipolar hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan lityumdan kaynaklanır. NDI'ye neden olan diğer ilaçlar Amfoterisin B, Kolşisin, Gentamisin, Metoksifluran ve Democlocycline'dir. Aynı zamanda kazanım nedenleri arasında kronik böbrek yetmezliği, pyelonefrit, polikistik böbrek hastalığı, renal transplantasyon, obstrüktif üropati, kronik renal medullar hastalık, kronik hipokalemi ve kronik hiperkalemi yer almaktadır. Düşük protein diyeti de *AQP2* proteininin ifade düzeyinde azalmaya neden olur [70].

### 2.2.2. Konjenital NDI

NDI'nin konjenital nedenleri arasında *AVPR2*, *AQP2* ve üre transporter-B (UT-B) genlerinde yer alan mutasyonlar bulunmaktadır. X-bağlantılı kalıtım sıklıkla

erkeklerde görülebilen özelliklere sahiptir ve bu hastalarda DDAVP'ye yanıt gözlenmez [70].

*AVPR2* ve *AQP2* genlerindeki fonksiyon kayıpları konjenital NDI'den sorumludur. 1992'de arjinin vazopressin reseptörünü kodlayan *AVPR2* geni klonlanmış ve X-bağılantılı NDI'li hastalarda mutasyonlar tanımlanmıştır [73-76]. Kısa süre sonra *AQP2* geni klonlanmış [77, 78] ve 1994 yılında *AQP2* geninde tanımlanan mutasyonların otozomal resesif DI ile ilişkili olduğu bulunmuştur [79]. Bu gen üzerine yapılan çalışmalar otozomal dominant *AQP2* mutasyonlarının da bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu iki anahtar genin (*AVPR2* ve *AQP2*) keşfedilmesi, etkilenen hastaların genetik testlerinin yapılmasını sağlamıştır ve bu sayede konjenital NDI fenotipi gösteren hastalarda mutasyonlar tespit edilmiştir [69, 80-82].

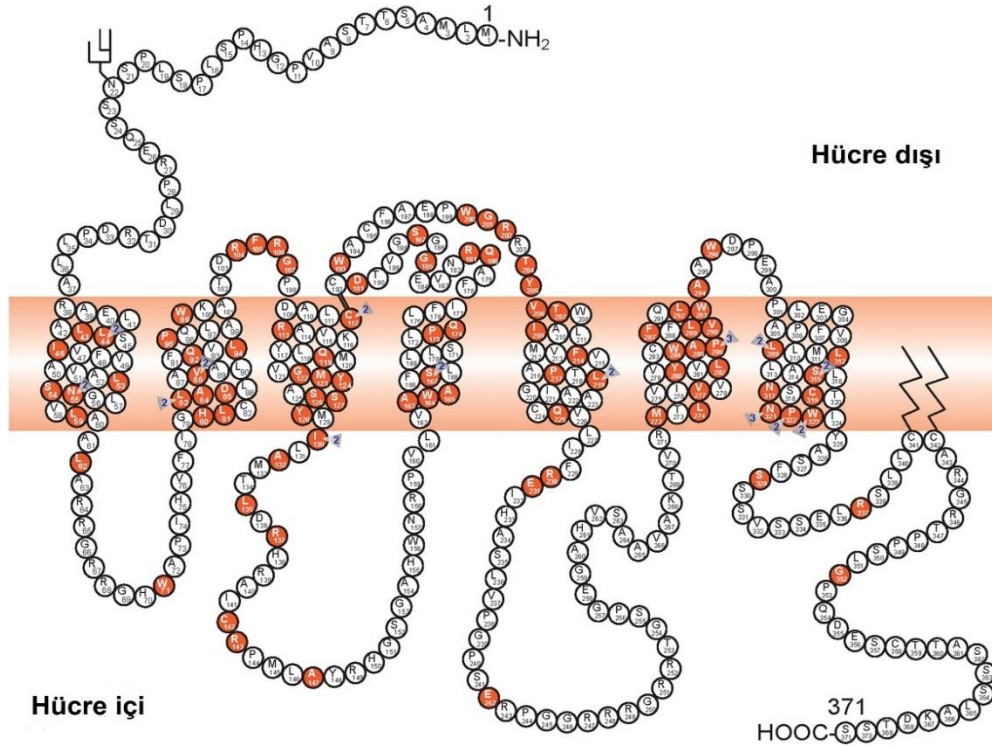
Nefrondaki distal tübül, bu vakalarda AVP'ye karşı duyarsızdır ve toplama kanallarında kısıtlı su emilimine neden olur. İdrarı konsantre etmede meydana gelen bozukluk doğumdan itibaren ortaya çıkar ve belirtiler yaşamın ilk haftalarında belirgindir. Bebekler genellikle hipernatremik dehidrasyondan muzdarip olmakta, irritabilite, beslenme yetersizliği ve kilo kaybı gibi belirtiler göstermektedirler. Klinik olarak, dehidrasyon bulguları cildin kuruluğu, normal deri turgorunun kaybı, gömülü göz çukurları, artmış periorbital katlanma ve baskılanmış anterior fontaneldir. Dehidrasyon ve kabızlık nedeniyle aralıklarla yüksek ateş görülür. Buna ek olarak nöbetler görülebilir [83].

Kısmi NDI formlarında, hastalar idrarı konsantre etme kabiliyetlerini korurlar ve ciddi dehidratasyon geliştirme risklerini azaltırlar. Hasta tedavi edilmezse, çoğu hasta normal şekilde gelişim gösteremez; ancak tedavinin başlamasıyla çoğu, başlangıç kilo kaybını yeniden kazanabilir [83, 84]. Beyin dehidrasyonu ve beyin ödeminin tekrarlayan periyotlarla gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülen zihinsel gerilik, NDI'nın ciddi bir komplikasyonu olabilir [85, 86]. Bu tür komplikasyonlar çoğunlukla, gecikmiş klinik teşhislere neden olabilecek *de novo* mutasyonlardan kaynaklanır. Buna karşılık, hastalık genini aktarma riski aile içerisinde tespit edilmişse, bu hastalığa yakalanma riski taşıyan çocuklar, çoğu zaman erken teşhis edilir ve tedavi altına alınır [86].

Bu hastaların fizyolojik gelişimi aşırı susama ve sık idrara çıkma ihtiyacı nedeniyle olumsuz etkilenmektedir. Sürekli poliüri; megakist, trabeküle mesane, hidroüreter ve hidronefroz gelişimine neden olabilir [83].

### **2.2.2.1. X-Bağlantılı NDI ve *AVPR2* mutasyonları**

X-bağlantılı NDI, genellikle erkek hastaların etkilendiği ve hastaların AVP uygulamasından sonra dahi idrarı konsantre etme yeteneği olmaması ile karakterize edilen nadir bir hastalıktır [87]. Bu form nadir, resesif bir X-bağlantılı hastalık olduğundan dişilerin etkilenmesi pek olası değildir; ancak heterozigot dişiler, farklı X kromozomu inaktivasyonu nedeniyle değişen derecelerde poliüri ve polidipsi gösterebilir. Quebec'te, erkekler açısından tarama yapıldığında bu hastalığın görülme sıklığının, 1.000.000 canlı erkek doğumda yaklaşık 8.8 olduğu tahmin edilmektedir [88]. Biri Ulster Scot göçmenlerinde tanımlanan ('Hopewell' mutasyonu, W71X) ve diğeri de büyük Utah soyundan gelen ('Cannon' pedigrisinde yer alan L312X mutasyonu) iki özel *AVPR2* mutasyonunun kurucu etkisi, Nova Scotia, Kanada, Utah ve ABD'deki bazı topluluklarda X-bağlantılı NDI'nın yüksek prevalansını ortaya koyar [89]. Bu kurucu mutasyonlar günümüzde tüm Kuzey Amerika kıtasına yayılmıştır. 'Hopewell' soyundan gelerek yaşayan 98 ve 'Cannon' soyundan gelerek yaşayan 20 erkeğin var olduğu bilinmektedir. Bugüne kadar, 300'ün üzerinde NDI ailesinde 250'nin üzerinde hastalığa neden olduğu tahmin edilen *AVPR2* mutasyonu yayınlanmıştır [Şekil 2.3] [90] [82, 91].



Şekil 2.3. Arjinin vazopressin reseptörünün şematik gösterimi ve hastalığa neden olan *AVPR2* mutasyonlarının tanımlanması. Amino asitler, bir harfli amino asit kodu olarak gösterilmiştir. Kırmızı daire sembolleri, yanlış anlamlı veya anlamsız mutasyonların buldukları kodonları belirtmektedir. Sayılar, aynı kodondaki birden fazla mutasyonu belirtir. Şekilde başka mutasyon tipleri belirtilmemiştir [82].

Reseptörde yer alan mutasyonların yaklaşık yarısı, yanlış anlamlı (missense) mutasyondur. Nükleotit delesyonları ya da insersiyonları nedeniyle oluşan çerçeve kayması mutasyonları (%25), anlamsız mutasyonlar (%10), büyük delesyonlar (%10), çerçevede değişime neden olmayan delesyon ya da insersiyonlar (%4), kırılma bölgesi mutasyonları ve bir kompleks mutasyon, mutasyonların kalan kısmını oluşturur. Mutasyonlar, reseptör proteininin her bölgesinde belirlenmiştir; ancak nükleotid yerleşimi açısından bakıldığında, transmembran alanlarda, hücre dışı veya hücre içi alanlarla karşılaştırıldığında yaklaşık iki kat fazla mutasyon meydana geldiği bildirilmiştir. Birtakım özel mutasyonlar, tekrarlayan mutasyonlar ve bunlara neden olan mutagenезin mekanizmaları çalışılmıştır [69, 81, 82].

D85N, V88M, R113W, Y128S, R137H, S167L, R181C, R202C, A294P ve S315R, mutasyon tekrarları birbiri ile akrabalık ilişkisi olmayan 35 ailede bulunmuştur. Aynı mutasyonun farklı haplotiplerde görülmesi tekrarlamamanın kanıtı olarak düşünülmüştür. Buna ek olarak, en sık görülen mutasyonlar (D85N, V88M, R113W,

R137H, S167L, R181C ve R202C), mutasyonel potansiyeli sıcak noktalarda “C/T veya G/A değişimi” şeklinde CpG dinökleotidlerinde meydana gelir [82].

*AVPR2* mutasyonları beş sınıfa ayrılır; sınıf I mutasyonları, uygun olmayan şekilde işlenmiş/kararsız mRNA oluşumuna, çerçeve kaymalarına ya da anlamsız mutasyonlar sonucunda eksik ya da hasarlı reseptör oluşumuna yol açar [11]. Sınıf II mutasyonlar (en yaygın mutasyon türü), reseptörün yanlış katlanmasına ve ER'de tutulmasına neden olur. Sınıf III mutasyonlarda, *AVPR2* yanlış katlanır; fakat plazma zarına ulaşır ve AVP ile etkileşime girmesine rağmen G proteinleriyle tam olarak etkileşime girmez ve bozulmuş cAMP üretimi meydana gelir. Sınıf IV mutasyonlar da hatalı katlanma ile sonuçlanır. Bu durumda, *AVPR2* plazma zarına ulaşabilmesine rağmen, AVP ile düzgün şekilde etkileşime girmez. Sınıf V mutasyonlarını taşıyan reseptörlerin ise yanlış hücrenel bölgelere hedeflendiği bilinmektedir [71].

#### **2.2.2.2. AQP2 Mutasyonları**

İnsanlarda, *AQP2* geni, kromozom 12q13 üzerinde bulunur ve 271 amino asit içeren bir proteini kodlar [78].

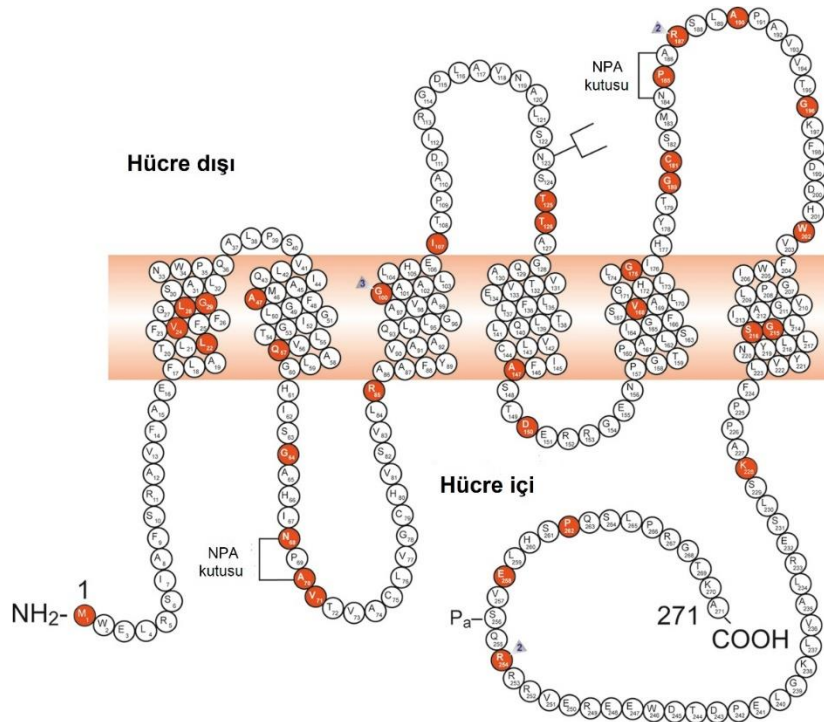
Normalde *AQP2*, plazma membranında kararlı bir tetramer oluşturan dört özdeş protein alt biriminden oluşur. Her monomer sitoplazmada COOH ucu bulunan altı transmembran kapsayan bölgeden oluşur. Diğer aquaporinlerin çoğunda olduğu gibi *AQP2*, membrana yerleşen, örtüşen ve su geçişini sağlayan kanalları meydana getiren gözeneklerin olduğu düşünölen [19, 92] iki oldukça korunmuş NPA motifini (Asn-Pro-Ala motifi) içerir. *AQP2* proteininin yapısı 4.9-Å çözünörlükte açıklığa kavuşturulmuştur; ancak hücre içi alanların yapısı eksiktir [12]. *AQP2*'nin trafiği, translasyon sonrası değişiklikler yoluyla *AQP2*'nin karmaşık işlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli hücrenel işlemlerle düzenlenir [93].

*AQP2*'nin NDI patolojisindeki keşfi bir dizi süreç sonunda gerçekleşmiştir. Bir vazopressin V2 sentetik analogu olan, DDAVP'nin farmakolojik intravenöz dozlarının denenmesini takiben plazma cAMP düzeylerinin ölçömleri ve DDAVP infüzyon çalışmaları temelinde X-bağlantılı NDI'nın bir pre-cAMP defekti olduğu



önerilmiştir. X-bağlantılı NDI'li erkek hastalarda DDAVP'nin farmakolojik infüzyonundan sonra pıhtılaşma faktörü salımını veya plazma cAMP seviyesi uyarılamamış ve bu nedenle bu hastalarda hem renal hem de ekstrarenal vazopressin V2 reseptörlerinin fonksiyon kaybına uğradığı düşünülmüştür. DDAVP infüzyon çalışmaları ve hem erkek hem de kadın bireylerde şiddetli poliürik özelliklere sahip aileleri kullanarak yapılan çalışmalarda, post-reseptör (post-cAMP) defekti ile birlikte X-bağlantılı olmayan bir NDI formu önerilmiştir [82].

Tipik NDI belirtileriyle doğumdan kısa süre sonra başvuran fakat DDAVP'ye normal düzeyde koagülasyon gösteren normal fibrinolitik ve vazodilatör yanıt veren hastanın *AQP2* geninde, iki yanlış anlamlı mutasyonu (R187C ve S217P) içeren compound heterozigot mutasyon tanımlanmıştır [79]. *Xenopus* oositlerinde bu iki mutasyonun her birinin ifadesi, işlevsiz su kanallarını ortaya çıkarmıştır. Günümüze değin 59 NDI ailesinde, *AQP2* geninde hastalığa neden olan 51'den fazla mutasyon saptanmıştır [Şekil 2.4] [82].



Şekil 2.4. AQP2 proteininin şematik gösterimi ve hastalığa neden olan *AQP2* mutasyonlarının tanımlanması. Bir monomer altı transmembran heliksten oluşur. Hücre dışı, transmembran ve sitoplazmik alanlar Deen ve ark. 1994'e göre tanımlanmıştır [29]. Kırmızı daire sembolleri mutasyonların yerlerini gösterir; M1I; L22V; V24A; L28P; G29S; A47V; Q57P; G64R; N68S; A70D; V71M; R85X; G100X; G100V; G100R; I107D; 369delC; T125M; T126M; A147T; D150E; V168M; G175R;

G180S; C181W; P185A; R187C; R187H; A190T; G196D; W202C; G215C; S216P; S216F; K228E; R254Q; R254L; E258K; ve P262L. GenBank erişim numaraları AQP2, ekzon 1 için AF147092 ve ekzon 2-4 için AF147093'tür. NPA kutusu ve C-ucu içindeki fosforilasyon bölgeleri (P<sub>a</sub>) şekilde gösterilmiştir [82].

Bu mutasyonlar, iki farklı moleküler çıktı ile sonuçlanır. Birincisi, AQP2'deki bir mutasyon, bir hedeflenme sinyalini etkileyebilir ve fonksiyonel AQP2'nin membrana yönlendirilmesini önleyebilir. İkincisi, mutasyon, AQP2'nin gözenek oluşturma yapısında bir kusura neden olarak işlevsiz bir su kanalı oluşturabilir [71].

NDI ile sonuçlanan AQP2 mutasyonlarının birçoğu [11] çeşitli model sistemlerde incelenmiştir. Memeli hücre hatları üzerinde yapılan araştırmalar, mutant AQP2 proteini trafiği ve hedeflenmesi hakkında bilgi verirken, *Xenopus laevis* oosit sisteminde AQP2 ifadesi, işlev hakkında yani mutasyonların membran boyunca AQP2 aracılı su akışını değiştirme yeteneği hakkında bilgi sağlamıştır [71].

Baskın AQP2 mutasyonu taşıyan hastalar, compound heterozigot ya da homozigot çekinik mutasyon taşıyan hastalara göre daha az şiddetli fenotipe sahiptir. AQP2 E258K baskın mutasyonunu taşıyan hasta ve kızının DDAVP'yi takiben idrar ozmolalitesi 350 mOsm/kg H<sub>2</sub>O'ya yükselmiştir [94]. Ayrıca, Robertson ve Kopp [95] tarafından fenotipi ayrıntılı olarak tanımlanan hasta, hafif derecede hipertonic bir dehidrasyon sırasında idrar ozmolalitesini 220 mOsm/kg H<sub>2</sub>O'ya, DDAVP'den sonra 258 mOsm/kg H<sub>2</sub>O'ya, hidroklorotiazid ve indometasinden sonra 305 mOsm/kg H<sub>2</sub>O'ya arttırmıştır. Bu hastanın R254Q mutasyonu için heterozigot olduğu ve bunun muhtemelen S256 fosforilasyon bölgesine etki ettiği tespit edilmiştir [16].

Mutant AQP2 (del 763-772) knock-in farelerinde Sohara ve ark. [96] dehidrasyon sonrasında idrar ozmolalitesinde hafif bir artış olduğu belirlenmiş; ancak bir fosfodiesteraz-4 inhibitörü olan Rolipram'ın uygulanmasından sonra belirgin bir artış gösterdiği görülmüştür [82].

### **2.2.2.3. Otozomal Çekinik NDI**

Otozomal NDI'da, olguların %90'ından fazlası çekinik bir özellik taşır. Hastalar AQP2'deki mutasyonlar için homozigot veya compound heterozigottur. Mutasyonların ağırlıklı olarak AQP2'nin kanal oluşturma bölgesi yani çekirdek

bölgesinde (transmembran bölge ve bağlantı ilmekleri) bulunduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonlar, AQP2'nin yanlış katlanmasına, ER'de tutuklanmasına ve proteinin hızlı degradasyonuna neden olmaktadır. Otozomal çekinik geçişli NDI, genellikle doğumda ortaya çıkmakta ve erkek ile dişileri eşit derecede etkilemektedir. NDI'nın çeşitli AQP2 knock-out/knock-in fare modelleri, su dengesinin korunmasında AQP2'nin kritik rolünü ortaya koymuştur [97] [98]. Birkaç genin delesyonu veya mutasyonunun, idrarı konsantre edememe gibi sorunlara ve böbreklerin AVP'ye yanıtında ciddi kusurlara neden olabileceği ve "NDI'ya benzer bir fenotip" oluşturabileceği de belirtilmiştir [34, 91, 99].

Otozomal çekinik geçişli NDI için çeşitli modeller (Çizelge 2.4) [100-102] oluşturulmuştur. Bunların tamamının farelerin poliüriye duyarlı olmaları nedeniyle zayıf canlılık gösterdiği ileri sürülmüştür. *AQP2*'nin tamamen knock-out edildiği farenin doğumdan sonra hayatta kalamadığı [97] ve bir insan NDI'sını taklit ederek farelerde oluşturulan T126M mutasyonunun 6 günlük süreçte farenin erken ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [100].

Çizelge 2.4. AQP2-temelli NDI fenotipi gösteren fare modelleri [71]

	<b>Genetik özellik</b>	<b>Canlılık</b>	<b>Referans</b>
<b>AQP2</b>			
<b>Yapılan genetik değişiklikler</b>			
AQP2 knock-in (T126M)	Otozomal çekinik	Postnatal ölüm (6 güne kadar)	Yang ve ark.[100]
İndüklenebilir AQP2 knock-in	Otozomal çekinik	Canlı (yetişkinliğe kadar)	Yang ve ark.[98]
AQP2 knock-in (763-772 del)	Otozomal çekinik	Canlı (yetişkinliğe kadar)	Sohara ve ark.[96]
AQP2 total knock-out	Otozomal baskın	Postnatal ölüm (5-12 güne kadar)	Rojek ve ark.[97]
Toplama kanal-seçimli AQP2 koşullu-knock-out	Otozomal çekinik	Canlı (yetişkinliğe kadar)	Rojek ve ark.[82]
COOH-ucu kuyruk hasarı	Otozomal çekinik	Canlı (yetişkinliğe kadar)	Shi ve ark.[103]
<b>Spontan mutasyonlar</b>			
AQP2-F204V	Otozomal çekinik	Canlı (yetişkinliğe kadar)	Lloyd ve ark.[102]
AQP2-S256L	Otozomal çekinik	%90 postnatal ölüm (2-4 hafta)	Mc Dill ve ark.[104]

AQP2'nin toplayıcı kanal seçici knock-out fareleri canlıdır; ancak ciddi bir idrarı konsantre edememe kusuruna sahiptirler [97].

Bu bulgular, toplama kanalının idrarı konsantre etmek için gerekli olduğunu; ancak muhtemelen bağlantı tüpünde AQP2 vasıtasıyla bazı desteklemelerin meydana geldiğini göstermektedir. Son zamanlarda, uyarılabilir bir NDI fare modeli geliştirilmiş ve bu model erişkin farelerde NDI için potansiyel terapötik bileşikleri tanımlama amacıyla kullanılmıştır [101]. Ayrıca, çekinik NDI ile sonuçlanan F240V mutasyonu taşıyan bir fare modeli, AQP2'nin kusurlu hedeflemesinin bazı NDI formlarının temelini oluşturduğu hipotezini desteklemektedir [102].

Hayvan modelleri, NDI'nin moleküler temelini incelemek ve potansiyel terapötik stratejileri araştırmak için ideal bir araç olmasına rağmen çok sayıda farklı mutasyon, diğer sistemlerin kullanılmasını gerektirmiştir. Çeşitli AQP2 gen mutasyonları, oositlerde AQP2 proteininin ER'de tutuklanmasına neden olmasına rağmen [7, 9, 10, 14, 79, 105, 106], belirli AQP2 mutantlarının oosit ifade sisteminde aşırı ifadesinin sağlanması bu mutantların su kanalları olarak işlev görme yeteneğinin araştırılmasına izin verir [7, 105-107].

#### **2.2.2.4. Otozomal Baskın NDI**

Otozomal NDI vakalarının %10'u baskın kalıtım göstermektedir. Bu vakalarda üriner konsantrasyon kusurunun, AQP2'nin karboksil ucundaki mutasyonlara bağlı olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.5).

Bu mutasyonlar, proteinin su geçirgenlik özelliğini etkilememekle birlikte, karboksil ucu kanalın hücre içinde doğru yönlendirilmesi için gereklidir. Bu NDI sınıfında, AQP2 monomerlerinin (membrandaki fonksiyonel birim) heterotetramerleri yabancı tip ve mutasyona uğramış form arasında oluşur ve AQP2'nin yanlış yönlendirilmesine [108], golgi aygıtında tutuklanmasına veya AQP2'nin geç endozomlara, lizozomlara veya bazolateral plazma membranına hedeflenmesine neden olur [109]. Dolayısıyla, mutasyonlar baskın bir negatif mekanizma içinde hareket ederler ve yabancı tip AQP2'nin apikal plazma membranına ulaşmasını önlerler. Bu mutasyonlar "baskın" olarak sınıflandırılmasına rağmen durum genellikle kısmi olup en azından bazılarının işlevsel homotetramerler oluşturduğu ve apikal plazma zarına ulaştığı düşünülmektedir [94, 110-112]. Bu vakalarda, sıvı

kısıtlaması veya desmopressin ile tedavi genellikle idrar ozmolalitesini artırır ve sadece bazı vakalarda AVP'ye direnç şiddetlidir [113].

Otozomal baskın NDI'de AQP2'nin yanlış hedeflenmesinin altında yatan neden, proteinin karboksil ucundaki birçok potansiyel sinyal ve düzenleyici bölgeyi işaret eder. AQP2-R254L mutasyonunda, AVP kaynaklı S256 fosforilasyonu için "korunmuş" bölgesinin kaybedilmesi, apikal plazma membranına taşınmada kusura neden olur [110, 111]. Aksine E258K mutasyonunun, AQP2'deki S256 fosforilasyon bölgesine benzer şekilde yakın olsa da, mutasyonun fosforilasyona müdahale etmesinden ziyade karboksil ucunda bir RRRxxxKL motifiyle etkileşime girmesi nedeniyle NDI'ya yol açtığı düşünülmektedir [114]. Bir başka mutasyon olan AQP2-insA, karboksil ucunda çerçeve kayması mutasyonuna neden olup hücrelerde AQP2'nin bazolateral hedeflenmesi ile sonuçlanır [108]. İnsandaki duruma benzer şekilde AQP2 763-772 delesyonu ile birlikte otozomal baskın NDI'yu taklit eden bir fare modeli, heterozigot farelerde üriner konsantrasyon yeteneğini bozmuştur. Bununla beraber fareler idrar ozmolalitesini artırarak sıvı yoksunluğuna tepki göstermiştir [96]. Ayrıca bu model, bazolateral AQP2 hedeflenmesi ile otozomal baskın NDI'nın nedeni olarak yanlış hedeflenme teorisini doğrulamıştır.

Çizelge 2.5. Baskın NDI'ye neden olan mutasyonlar [71]

Baskın NDI'ye neden olan mutasyonlar	Mutasyon Tipi	Moleküler Teşhis	Referans
E258K	Değişim	Golgi aygıtında tutuklanma görülür. Oositlerde AQP2-S256 fosforilasyonunu etkilemez.	Mulders ve ark.[94]
721delG	Çerçeve kayması-uzamış protein	Oositlerde kusurlu protein trafiği	Kuhawara ve ark.[112]
763-772del	Çerçeve kayması-uzamış protein	Oositlerde kusurlu protein trafiği	Kuhawara ve ark. [112]
812-818del	Çerçeve kayması-uzamış protein	Oositlerde kusurlu protein trafiği	Kuhawara ve ark.[112]
R254L	Değişim	Oositlerde ve MDCK hücrelerinde kusurlu protein trafiği, hasarlı AQP2-S256 fosforilasyonu	De Mattia ve ark.[110]
R254Q	Değişim	Oositlerde ve MDCK hücrelerinde kusurlu protein	Savelkoul ve ark.[111]

		trafiği, hasarlı AQP2-S256 fosforilasyonu	
AQP2-insA (frameshift c779-780insA)	Çerçeve kayması	Polarize böbrek hücrelerinde basolateral membrana yanlış hedeflenme	Kamsteeg ve ark.[108]
727deltaG	Çerçeve kayması-uzamış protein	Oositlerde, böbrek hücreleri endozom/lizozomlarında kusurlu protein trafiği	Marr ve ark.[7]

### 2.3. Nefrojenik Diabetes İnsipidus'da Genetik Test Değerlendirmesi

DI için yapılan genetik test değerlendirilmesi başlangıç tanısını doğrulamak için oldukça yararlıdır ve aile öyküsü olan tüm hastalarda uygulanması tavsiye edilir.

NDI belirtileri gösteren yenidoğan ya da bebeklerde özellikle *AVPR2* ya da *AQP2* geni kaynaklı mutasyonlardan şüphe edilmelidir. *de novo AVPR2* ve *AQP2* mutasyonları sıklıkla uzun süren dehidrasyon nedeniyle ciddi bir serebral hasar riski olan gecikmiş tanı ile sonuçlanır ve bu gibi durumlarda genetik karakterizasyon işlemi sonraki gebeliklerde erken (hatta doğum öncesi) yapılmalı ve bunun yanı sıra diğer aile üyelerine genetik danışmanlık verilmelidir [71].

### 2.4. Nefrojenik Diabetes İnsipidus'da AQP2-Temelli Terapötik Yaklaşımlar

Araştırmalar, fosfodiesteraz inhibitörlerinin farklı mekanizmalarla ilgili patolojilerin tedavisinde kullanılma potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Son çalışmalar gen terapinin NDI'nin tedavi edilmesinde daha iyi bir seçenek olduğunu göstermektedir; ancak bu konu oldukça spekülattir [70].

#### 2.4.1. Fosfodiesteraz İnhibitörleri

##### 2.4.1.1. Siklik GMP (cGMP) Yolak Aktivasyonu

Hücre içi cGMP seviyeleri, sodyum nitroprusid (yıkımı ile nitrik oksit oluşur), L-arginin ve atriyal natriüretik peptit ile artırılabilir. Bütün bu maddeler apikal membrandaki AQP2 miktarını artırabilir özelliktedir [115-117]. Seçici cGMP, PDE (PDE5) inhibitörü sildenafil sitrat (*Viagra*), cGMP'nin yıkımını engeller. Bu durumun da AQP2'nin artmış membran ifadesiyle sonuçlandığı *in vitro* ve *in vivo* [118] olarak belirlenmiştir. Son zamanlarda sildenafil sitratın, lityum kaynaklı NDI'lı sıçanlarda

poliüriyi azalttığı gösterilmiştir [119]. Bununla birlikte, sildenafil sitrat kullanılarak klinik araştırmaları yapılmış az sayıdaki NDI hastasında (D.Bichet, Université de Montréal, Montreal, Kanada) idrar hacminde herhangi bir azalma veya idrar osmolalitesinde herhangi bir artış gözlenmemiştir [71].

#### **2.4.1.2. Siklik AMP (cAMP) Yolak Aktivasyonu**

Bir PDE4 inhibitörü olan Rolipram'ın, otozomal baskın NDI'nın fare modelinde idrar ozmolalitesini arttırdığı bulunmuştur. Aksine, PDE3 ve PDE5 inhibitörlerinin değerlere önemli bir etkisi olmamıştır [96].

Rolipram muhtemelen cAMP düzeyini artırır. Bu süreç de artmış AQP2 fosforilasyonu ve translokasyonu ile sonuçlanır. PDE'ler doğal olarak, hemen hemen tüm hücre tiplerinde bol miktarda bulunduğundan NDI'nın tedavisinde PDE inhibitörlerinin kullanım potansiyelinin açıklığa kavuşturulması gerekir. Bu nedenle sürecin idrar çıkışı üzerindeki uzun vadeli etkileri, PDE inhibisyonunun diğer hücre tiplerine etkileri ve sürekli tedavinin potansiyel yan etkilerini belirleme çalışmaları yapılmalıdır. Alternatif bir strateji ise insanlarda başta tiroid parafoliküler hücreleri tarafından üretilen, 32 amino asitlik doğrusal bir polipeptit hormonu olan kalsitoninin kullanılmasıdır. Kalsitonin, G<sub>s</sub> ile birleşmiş ve hücre içi cAMP düzeylerini artırabilen yedi transmembran alıcı reseptörü vasıtasıyla etkilemektedir. Kalsitoninin, AQP2 membran birikimini *in vitro* ve *in vivo* olarak cAMP aracılı bir mekanizma ile indüklediği gösterilmiştir [120, 121].

#### **2.4.2. Statinler**

NDI tedavisinde, hiperkolesteroleminin tedavisinde kullanılan çeşitli statinler önerilmiştir. Statinler, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA redüktaz aktivitesini inhibe ederek kolesterol biyosentezinde düşüşe neden olur. Simvastatin'e akut maruziyetin, kültür hücrelerinde ve Brattleboro sıçanlarının böbrek kesitlerinde apikal membrandaki AQP2'yi artırabildiği görülmüştür [122]. Diğer bazı hücre sistemlerinde hem fluvastatin hem de lovastatinin, AQP2'nin apikal plazma membranındaki ifadesini indükleyebildiği gösterilmiştir [123]. Farelerde fluvastatin, AVP'den bağımsız bir şekilde böbrekte AQP2 ifadesini ve suyun yeniden emilimini



artırabilir [123]. Bu etkileşimlerin arkasındaki moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Ancak, bu düzenlenmenin AQP2'nin trafiğe katılması veya hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynayan Rho ailesinden proteinlerin prenilasyonundaki değişiklikler gibi [115, 123] çeşitli dolaylı etkilere bağlı olduğu düşünölmüştür. Statinlerin AQP2'ye özgü olup olmadığı veya diğer tüm membran kanalları/taşıyıcıların sınıflarının statin tedavisinden etkilenip etkilenmediği çözümlenmelidir [71].

#### **2.4.3. Prostaglandinler**

E-prostanoid spesifik reseptör agonistlerinin PGE2 için kullanımının, diürez ve AQP2 internalizasyonunu azalttığına yönelik kanıtlar mevcuttur [124] [125]. EP2'ye (butaprost) ve EP4'e (CAY10580) özgü diğer agonistlerin, MDCK hücrelerinde AQP2 trafiğini arttırdığı gösterilmiştir [125]; ancak etki mekanizmaları muhtemelen farklıdır, çünkü yalnızca EP2 stimölasyonu artmış cAMP miktarı ile sonuçlanmıştır [125].

#### **2.4.4. Isı şoku proteini (Hsp90)**

Hsp90'ın diğer fonksiyonlarının yanı sıra, ER'de kalan stoplazmik proteinlerin düzgün biçimde katlanmasına yardımcı olan bir "moleküler şaperon" olduğu düşünölmektedir [126]. Bir Hsp90 inhibitörünün (17-allilamino-17-demetoksigeldanamisin), mutant AQP2-T126M'nin ER'de tutulduğu otozomal çekinik NDI fare modelinde NDI'yı kısmen düzelttiği gösterilmiştir. Bununla birlikte bu etkinin altında yatan kesin moleküler temel araştırılmalıdır [101].

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

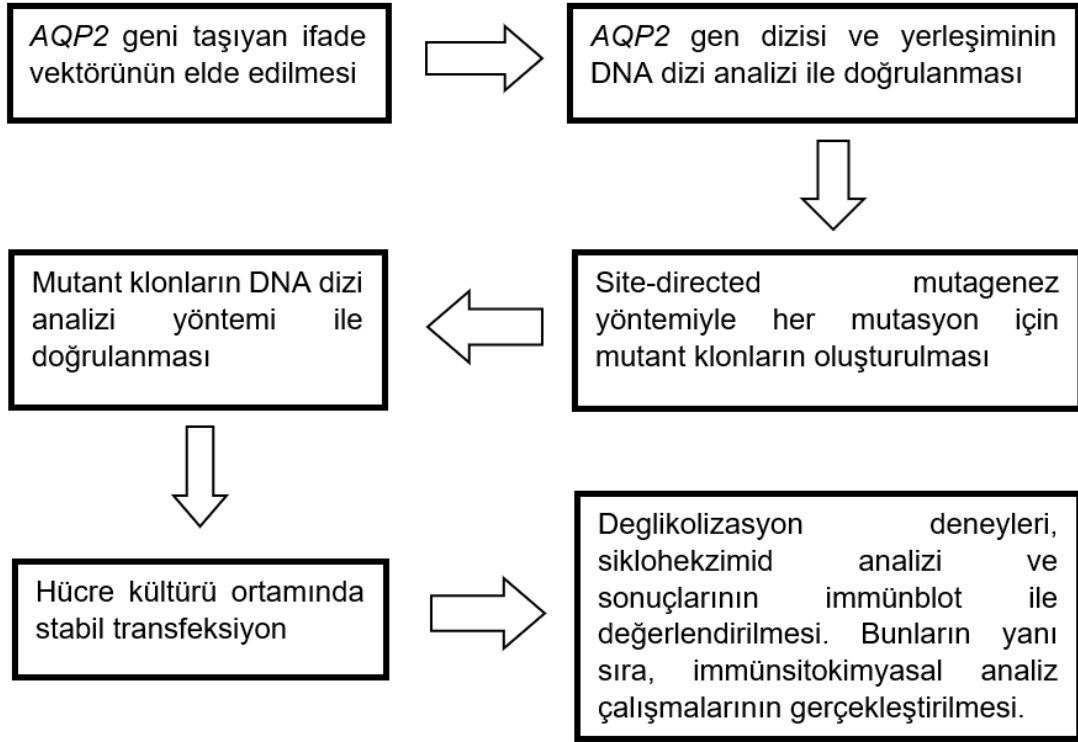
**Tez çalışmasının amacı**, Diabetes insipidus hastalığının gelişimi ile ilişkilendirilmiş genlerden biri olan, *AQP2* geninde yer alan A45T [yayınlanmamış veri], R85X ve A147T [127] mutasyonlarının ilgili proteinin fonksiyonlarını ne şekilde etkilediğinin ve hastalığın seyrinde nasıl bir etki yarattığının belirlenmesidir. Bu amaca yönelik çalışmalar iki tip ifade sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunlar;

- 1) Madin-Darby canine kidney (MDCK)-FRT-TR6-cl2 hücreleri
- 2) *Xenopus laevis* oositleridir.

Bu amaç ile uyumlu olarak yapılacak hücre kültürü düzeyindeki çalışmalar için yabancı tip *AQP2* geni taşıyan ifade vektörü temin edilmiş, site-directed mutagenesis yöntemi kullanılarak mutant *AQP2* gen dizilerini içeren uygun ifade vektörleri hazırlanmıştır. Bu süreci takiben, yabancı tip ve mutant vektörlerin MDCK hücrelerine stabil transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. MDCK-FRT-TR6-cl2 hücreleri stabil transfeksiyonun gerçekleştirilmesi için gerekli homolog rekombinasyon sitini içermektedir. Bu mekanizma ile vektörlerin MDCK hücrelerinde ifadesi sağlanarak, mutant proteinlerin;

- Hücre içi olgunlaşma sürecinin karakterizasyonu için deglikozilasyon deneyleri,
- Yarı ömürlerinin belirlenmesi amacıyla sikloheksimid analizi yapılmış ve sonuçlar immüno-blot analizi ile değerlendirilmiştir.
- Hücre içi trafiğinin belirlenmesi için immüno-sitokimyasal analizler uygulanmıştır.

Bu amaç ile uyumlu olarak yapılan çalışmalar Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Hücre kültüründe gerçekleştirilecek çalışmaların şematik gösterimi

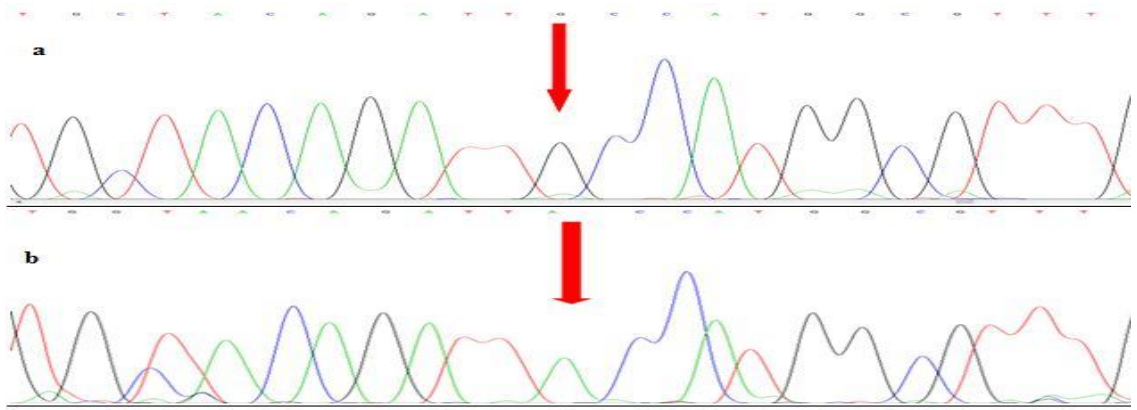
*AQP2* genine ait mutasyonların *X. laevis* oosit ifade sisteminde gerçekleştirilecek olan fonksiyon analiz çalışmaları kapsamında, yabancı tip ve mutasyonları içeren vektörlerden elde edilen cRNA'ların oosit hücrelerine enjeksiyonu gerçekleştirilerek, *AQP2* proteininin oositlerde ifade düzeylerini tespit edebilmek için total membran ve plazma membranları izole edilmiş, yabancı tip protein ile mutant proteinlerin membranlardaki oranları immünblot analizi ile karşılaştırılmıştır. Mutant *AQP2* proteinlerinin, su alımı üzerine etkilerinin belirlenmesi için oosit hücrelerine su geçirgenliği testi uygulanmıştır.

### 3.1. Fonksiyon Analizi Gerçekleştirilecek Olan Mutasyonların Belirlenmesi

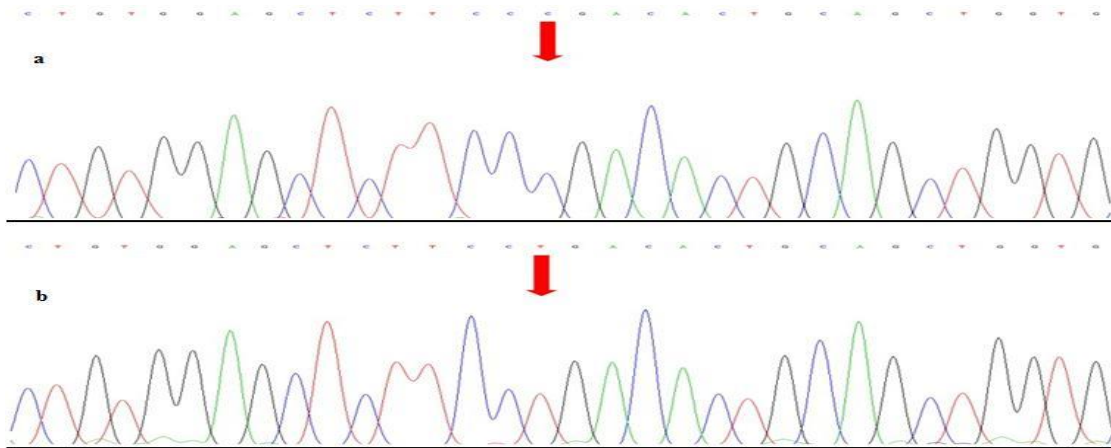
Grubumuz tarafından Diabetes İnsipidus'a neden olan moleküler patolojilerin tespit edilmesi amacıyla 2010 yılında başlatılan ve halen sürmekte olan çalışmalarda nefrojenik veya santral Diabetes insipidus tanılı 84 hastanın *AVPR2*, *AQP2* ve *AVP* genleri DNA dizi analizi yöntemiyle taranmıştır. Bu çalışmalarda, sık idrara çıkma, çok su içme gibi yakınmalara sahip, nefrojenik Diabetes insipidus tanılı bireylerin *AQP2* geninde A45T, R85X, L137P ve A147T mutasyonları tanımlanmıştır. Bu

mutasyonlardan *AQP2* geninde bulunan ve daha önce literatürde yer almayan A45T ve L137P mutasyonlarının fonksiyon analizleri TÜBİTAK SBAG 115S499 numaralı araştırma projesi ile desteklenen doktora tezi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

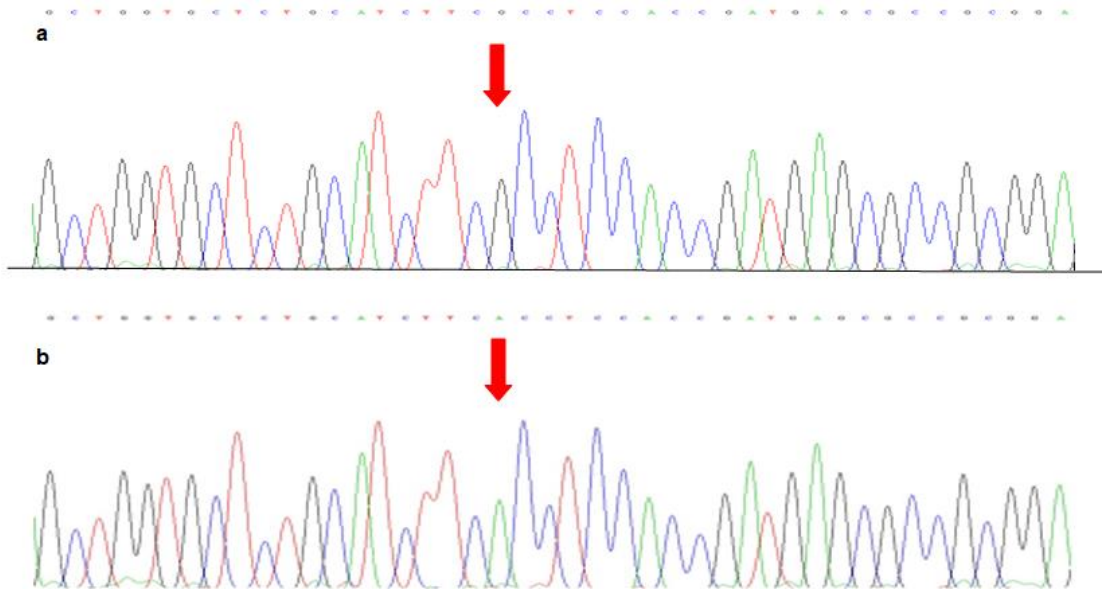
Tez çalışması kapsamında fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenen mutasyonlara ait özellikler ise Çizelge 3.1'deki gibidir. DNA dizileme çalışmalarından elde edilen kromatogram görüntüleri Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4'teki gibidir.



Şekil 3.2. A45T mutasyonu gösterimi için normal birey (a) ve hasta bireyin (b) DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü (GCC-ACC)



Şekil 3.3. R85X mutasyonu gösterimi için için normal birey (a) ve hasta bireyin (b) DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü (CGA-TGA)



Şekil 3.4. A147T mutasyonu gösterimi için normal birey (a) ve hasta bireyin (b) DNA dizisine ait kromatogram görüntüsü (GCC-ACC).

Çizelge 3.1. Fonksiyon analizi gerçekleştirilecek olan mutasyonlar

Hastalar	Tanı	Gen	Ekzon	İsim	Mutasyon	Kodon Numarası	Aminoasit Değişimi
1.	Nefrojenik	<i>AQP2</i>	1	A45T	GCC→ACC	45. Kodon	Ala→Thr (homozigot)
2.	Nefrojenik	<i>AQP2</i>	1	R85X	CGA→TGA	85. Kodon	Arg→Term (homozigot)
3.	Nefrojenik	<i>AQP2</i>	2	A147T	GCC→ACC	147. Kodon	Ala→Thr (homozigot)

### 3.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Mutant *AQP2* Genini İçeren İfade Vektörlerinin Site-Directed Mutagenesis Yöntemi ile Hazırlanması

#### 3.2.1. *AQP2* Geni Taşıyan İfade Vektörünün Temin Edilmesi

Yabancı tip *AQP2* proteininin ORF'lerini taşıyan pcDNA5/FRT vektörü, Aarhus Üniversitesi, Biyotıp Bölümü araştırmacısı Hanne B. Moeller'den alınmıştır. Yabancı tip *AQP2* dizileri ilgili vektörlerdeki yerleşiminin doğruluğunun belirlenmesi için, ilgili plazmid *E.coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiş ve sonrasında bakteriler ampisilinli LB agar plaklarına ekilmiştir. pcDNA5/FRT\_ *AQP2* vektöründe seçici olarak ampisiline direnç geni bulunmaktadır, bu nedenle LB agar plaklarına 75 mg/ml konsantrasyonda ampisilin eklenmiştir.

Transformasyon için aşağıda belirtilen yöntem izlenmiştir;

1. Transforme edilmek istenen plazmid DNA'sından 1 µl (1 µg/µl) alınıp 100 µl kompetan hücreye eklenir ve iyice pipetlenir.
2. 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılır.
3. 42°C'de 45 saniye inkübe edilir.
4. Örnek tekrar buz üzerine alınarak 1-2 dakika inkübe edilir.
5. Örneğin tamamı 250 µl SOC medium içine eklenir ve 1 saat boyunca 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilir.
6. İnkübasyon sonrası ampisilinli LB agar plağına ekim yapılır ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılır.

Bunu izleyen süreçte ampisilinli LB agar plağında üreyen bakterilerden tek bir koloni alınarak 2 ml'lik ampisilinli LB broth besiyerinde gece boyu inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kullanılarak plazmid DNA'sı izolasyonu yapılmıştır. İzlenen kit protokolü aşağıdaki gibidir.

1. 1-10 ml'lik gecelik bakteri kültürü 5 dakika boyunca yüksek hızda santrifüj edilerek çöktürülür.
2. Besiyeri uzaklaştırılır ve bakteri peleti 250 µl Hücre Resüspanسیون çözeltisi ile resüspanse edilir.
3. 250 µl Hücre Lizis çözeltisi eklenir ve tüpler 4 kez alt üst edilerek karıştırılır.
4. 10 µl Alkalin Proteaz çözeltisi eklenir ve tüpler 4 kez alt üst edilerek karıştırılır. 5 dakika oda ısısında inkübe edilir.
5. 350 µl Nötralizasyon çözeltisi eklenir ve tüpler 4 kez alt üst edilerek karıştırılır.
6. Oda ısısında 10 dakika boyunca en yüksek hızda (13.000 rpm) santrifüj edilir.

7. Spin kolonları toplama tüplerine yerleştirilir.
8. Santrifüj sonrası elde edilen saydam lizat (süpernatant) spin kolonlara aktarılır.
9. Oda ısısında ve en yüksek hızda 1 dakika boyunca santrifüj edilir ve altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılır.
10. 750 µl Yıkama çözeltisi (etanol eklenmiş) eklenir. 1 dakika boyunca en yüksek hızda santrifüj edilir ve altta kalan kısım uzaklaştırılır.
11. 10. basamak 250 µl Yıkama çözeltisi kullanılarak tekrar edilir.
12. 1 dakika boyunca oda ısısında en yüksek hızda santrifüj edilir ve etanolün iyice uzaklaşması sağlanır.
13. Spin kolonları 1.5 ml'lik steril tüplere aktarılır.
14. 50 µl Nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O spin kolonun tam üzerine konulur ve 1 dakika boyunca oda ısısında en yüksek hızda santrifüj edilir.
15. Kolon çıkartılır ve elde edilen DNA -20°C'de saklanır.

İzole edilen plazmid DNA'sı agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Daha sonra elde edilen plazmid DNA'ları içerisinde bulunan yabancı tip *AQP2* gen dizimleri Sanger ve Next generation (hizmet alımı) DNA dizileme yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır.

### **3.2.2. Yabancı *AQP2* cDNA Dizisinde Site-Directed Mutagenesis Yöntemi ile Çalışılacak Olan Mutasyonların Oluşturulması, Oluşturulan Dizilerin İfade Vektörlerine Aktarılması ve DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Doğrulanması**

Site-directed mutagenesis yöntemi, mutasyona özgü mismatch primerler kullanılarak istenen mutasyonun ortaya çıkarıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli bir

yöntemdir. Bu amaçla mutasyonun yer aldığı bölgeyi içine alacak şekilde, mutant nükleotidi içeren ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.

AQP2 geninde site-directed mutagenез yöntemi ile oluşturulacak olan A45T, R85X ve A147T mutasyonları için tasarlanan primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir ve dizi üzerindeki yerleşimleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Tasarlanan tüm primerlerin ilgili vektör üzerindeki yerleşimleri ise Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Mutant AQP2 dizilerinin oluşturulması sırasında kullanılan primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi
pcDNA5/FRT_AQP2_dış Forward	5'-AAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGG-3'
pcDNA5/FRT_AQP2_dış Reverse	5'-GACTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGC-3'
A45T F GCC→ACC	5'-GTGCTACAGATTaCCATGGCGTTTGG-3'
A45T R GCC→ACC	5'-CCAAACGCCATGGtAATCTGTAGCAC-3'
R85X F CGA→TGA	5'-TCTCCGTTCTctGAGCCGCCTTCTACG-3'
R85X R CGA→TGA	5'-CGTAGAAGGCGGCTCaGAGAACGGAGA-3'
A147T F GCC→ACC	5'-CTCTGCATCTTtCaCCTCCACCGATG-3'
A147T R GCC→ACC	5'-CATCGGTGGAGGtGAAGATGCAGAG-3'



**AQP2 EKZON 1 430 bç**

agggtgataggcctgtgggtgggctgggatggggcatggggcagaggccgcatggagg  
agaagaggtattggcctcaacgactccacctccccgccacgtgccagatccgggatgga  
aggacctataaatgccacaaccagcctccccagaggccttgagaaagagagcगतatag  
AGTGCGAGAGCGAGTGCCCGGAGCATCCTGGCCCTGAGACAGCTGGGCCAGCCCCGAGG  
GCTCTGCAGC**ATGTGGGAGCTCCGCTCCATAGCCTTCTCCAGGGCTGTGTTTCGCAGAGTT**  
**CCTGGCCACACTCCTCTTCGTCTTCTTTGGCCTCGGCTCTGCCCTCAACTGGCCACAGGC**  
**CCTGCCCTCTGTGCTACAGATTGCCATGGCGTTTGGCTTGGGTATTGGCACCTGGTACA**  
**GGCTCTGGGCCACATAAGCGGGGCCACATCAACCCTGCCGTGACTGTGGCCTGCCTGGT**  
**GGGCTGCCACGTCTCCGTTCTCCGAGCCGCTTCTACGTGGCTGCCAGCTGTGGGGG**  
**TGTGGCCGGAGCCGCTCTGCTCCATGAGATCACGCCAGCAGACATCCGCGGGGACCTGGC**  
**TGTCAATGCT**

gtgagtagccacaactttgccatccacaaggggcaggtcctggggaatcccttgtaaagg  
atgagatgggagggatgggctctgggtgatgtaggagagagatggagacagaggcagag  
agagaggctggagccaggaacacagccaccataggagggtcaggatgaaaggagcaatga

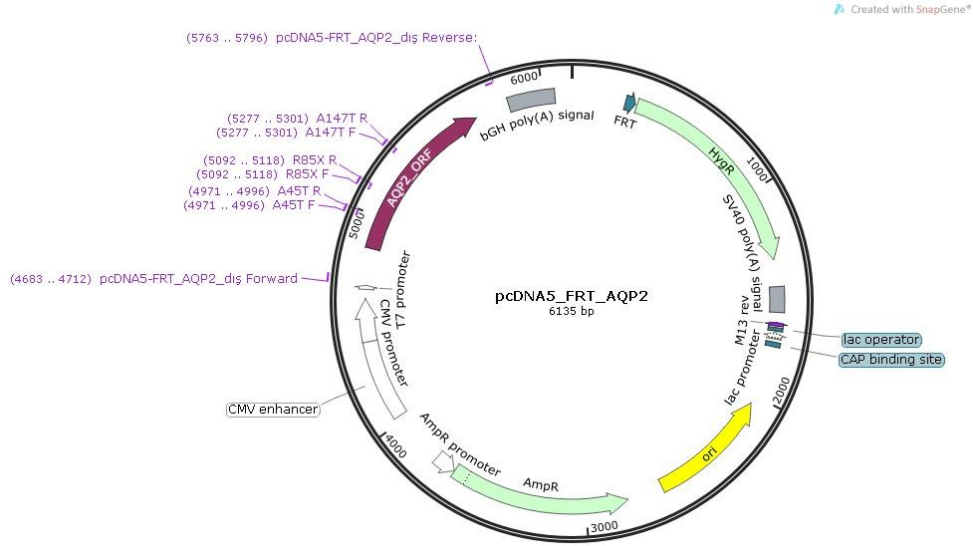
**AQP2 EKZON 2 165 bç**

tttgggccagggcccaggaagaagggatcagtcggtgcagctaaggcgtctggcaagccc  
agggtttccggctcccagcccagaggccccctgggtgctcgactgcaggtggacaggaag  
atggagccagagaggaaagtgggctcagtggtccccctaccgcctcttctctgtccccag  
**CTCAGCAACAGCACGACGGCTGGCCAGGCGGTGACTGTGGAGCTCTTCCCTGACACTGCAG**  
**CTGGTGCTCTGCATCTTCGCCACCAGATGAGCGCCGCGGAGAGAAACCCGGGCACCCCT**  
**GCTCTCTCCATAGGCTTCTCTGTGGCCCTGGGCCACCTCCTTGGG**

gtaggtcatggccatgggttcagcctccctggaggaacagacacacagaccactccaga  
gacagacacagagaccccaagagggacacatacacagaactctcaagaggaacagacacc  
ccagaggtttgactcctagataccccagagggacagatatcactccagcccctctgtaaa

\*Bölgeler sırasıyla A45T (GCC→ACC), R85X (CGA→TGA) ve A147T (GCC→ACC) mutasyonlarını  
işaret etmektedir.

Şekil 3.5. Tasarlanan site-directed mutagenез primerlerinin AQP2 açık okuma çerçevesi üzerinde gösterimi\*



Şekil 3.6. pcDNA5/FRT\_AQP2 haritası ve tasarlanan primerlerin harita üzerinde gösterimi

Mutant bir *AQP2* gen bölgesi elde etmek için *AQP2* geni ORF'sinin 5' ucunda yer alan ileri primer (pcDNA5/FRT\_AQP2\_dış Forward) ile ilgili mutasyonu içine alan geri primer reaksiyona alınmıştır. Aynı şekilde, ilgili mutasyonu içine alan ileri primer ile *AQP2* geninin 3' ucunda yer alan geri primer ile de (pcDNA5/FRT\_AQP2\_dış Reverse) ayrı bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Böylece, mutasyonun olduğu noktayı içeren 5' bölge ve 3' bölge ayrı ayrı elde edilmiştir.

Bölge için gerçekleştirilen site-directed mutagenesis işlemleri sonucunda elde edilecek bant büyüklüklerine ilişkin bilgi Çizelge 3.3'te ve kullanılan reaksiyon bileşenlerine ilişkin bilgi Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *AQP2* geni için site-directed mutagenesis işlemleri sonucunda elde edilen bant büyüklükleri

	A45T F	A45T R	R85X F	R85X R	A147T F	A147T R
pcDNA5/FRT_AQP2_dış Forward	-	314 bp	-	436 bp	-	619 bp
pcDNA5/FRT_AQP2_dış Reverse	826 bp	-	705 bp	-	520 bp	-

Çizelge 3.4. *AQP2* geninde site-directed mutagenез işlemleri için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşen miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Kalıp DNA (yabanıl tip <i>AQP2</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 µmol/µl)	1.0 µl
İlgili mutasyonun reverse primeri, ilgili mutasyonun forward primeri (10 µmol/µl)	1.0 µl
DMSO (%100)	5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	33.5 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>50 µl</b>

PZR aşağıda belirtilen koşullarda yapılmıştır.

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

PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra ilgili gende oluşturulan mutant bölgeyi içeren 5' ve 3' fragmentleri jelden "Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" ile saflaştırılmıştır. Birleştirme reaksiyonunda kullanılacak olan PZR ürünü 1 ve PZR ürünü 2 (kısa PZR ürünleri) elde edilmiştir.

Daha sonra, mutant nükleotidi içeren *AQP2* gen bölgesinin tamamını oluşturmak için, her iki PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak, *AQP2* geni ORF'sinin 5' ucunda yer alan ileri primer ve genin 3' ucunda yer alan geri primer ile reaksiyona alınmıştır. Reaksiyon bileşenlerine ilişkin bilgi Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. *AQP2* geninde site-directed mutagenез işlemleri için gerçekleştirilen fusyon polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>
2X Fusion master mix	25 µl
İlgili genin vektörü üzerinde belirlenen dış forward primer (10 µmol/µl)	1.0 µl
İlgili genin vektörü üzerinde belirlenen dış reverse primer (10 µmol/µl)	1.0 µl
DMSO (%100)	1.5 µl
PZR ürünü 1	2 µl
PZR ürünü 2	2 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	17.5 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>50 µl</b>

PZR aşağıda belirtilen koşullarda yapılmıştır.

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

PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra oluşturulan mutant diziyi içeren *AQP2* ürünleri jelden "Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" isimli kit ile saflaştırılmıştır. Kitin protokolü aşağıdaki gibidir.

1. İstenilen ürünü içeren bant bölgesi agaroz jelden kesilerek ayrılır ve 1.5 ml'lik tüplere konulur.
2. Her 10 mg jel parçasına 10 µl Membran Bağlama çözeltisi eklenir ve 50-60°C'de jel tamamen eriyene kadar vortekslenerek inkübe edilir.

3. SV Minikolonlar toplama tüplerine yerleştirilir.
4. Erimiş olan jel kolona aktarılır ve 1 dakika oda ısısında inkübe edilir.
5. 13.000 rpm'de 1.5 dakika boyunca santrifüj edilir ve altta kalan kısım uzaklaştırılır.
6. Kolon üzerine 700 µl Membran Yıkama çözeltisi (etanol eklenmiş) eklenir. 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir. Altta kalan kısım uzaklaştırılır.
7. 6. basamak 500 µl Membran Yıkama çözeltisi ile tekrar edilir. 13.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir.
8. Altta kalan kısım atılır ve tüpler bir kez daha 1 dakika boyunca yüksek hızda santrifüj edilir.
9. Minikolonlar dikkatli bir şekilde 1.5 ml'lik tüplere aktarılır ve kolon üzerine 50 µl nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O konulur. 1 dakika oda ısısında inkübe edilir ve 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilir.
10. Minikolon çıkarılır ve DNA -20°C'de saklanır.

Elde edilen mutant *AQP2* dizileri pcDNA5/FRT\_ *AQP2* vektör içerisine *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak aktarılmış ve bakteri hücrelerine transforme edilmiştir. Hazırlanan reaksiyonlar aşağıda verilmiştir.

#### **pcDNA5/FRT AQP2 Vektör Kesimi Reaksiyonu (50 µl)**

43 µl vektör

5 µl Cut smart tampon (NEB®)

1 µl *XhoI* (NEB®)

1 µl *HindIII* (NEB®)

### **Mutant PZR Ürünlerinin Kesim Reaksiyonu (50 µl)**

7 µl vektör

5 µl Cut smart tampon (NEB®)

1 µl *XhoI* (NEB®)

1 µl *HindIII* (NEB®)

1 µl Fast AP (Thermo Fisher Scientific®)

35 µl dH<sub>2</sub>O

### **T4 DNA Ligaz ile Birleştirme Reaksiyonu**

16 µl insert (Kesilmiş mutant PZR ürünü)

1 µl vektör (pcDNA5/FRT\_AQP2 vektör kesim ürünü)

2 µl ligaz buffer (Thermo Fisher Scientific®)

1 µl T4 DNA ligaz (5 U/µl) (Thermo Fisher Scientific®)

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 *AQP2* dizisi içeren pcDNA5/FRT vektörünü taşıyıp taşımadıklarını anlamak için koloni PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA kalıbı olarak 2 µl bakteri kültürü alınmış, bakterilerdeki vektörün *AQP2* 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 *AQP2* dizisi yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jelde kontrol edildikten sonra PZR pürifikasyonu, sekans reaksiyonu, sekans reaksiyonu sonrası pürifikasyon ve DNA dizileme cihazına yükleme aşamaları aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

PZR ürünün temizlenmesi için Çizelge 3.6'da verilen protokol kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.6. PZR ürününün temizlenme basamağını gerçekleştirmek üzere belirlenen reaksiyon bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>
PZR ürünü	4 µl
Ekzonükleaz I USB® (10 U/µl)	0.4 µl
Shrimp Alkalen Fosfataz USB® (2 U/µl)	0.4 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>4.8 µl</b>

Tüp içerikleri belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra PZR aletinde aşağıdaki program 1 döngü uygulanmıştır. Örnekler işlemin ardından -20°C'de saklanmıştır.

37°C 20 dakika

80°C 20 dakika

95°C 2 dakika

Sekans reaksiyonu için ABI PRISM Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılmıştır. Dizi analizi reaksiyon bileşenleri ve koşulları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Temizlenmiş PZR ürünlerinin işaretleme reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere kullanılan reaksiyon bileşen miktarları

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	
PZR ürünü (Temizlenmiş)	1.5 µl
Big Dye reaksiyon karışımı	0.6 µl
Primer (10 µmol/µl)	0.5 µl
Reaksiyon tamponu	0.95 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	6.45 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µl</b>

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

96°C 10 saniye

50°C 5 saniye

60°C 4 dakika

Döngüler tamamlandıktan sonra reaksiyondan arta kalan malzemeler, aşağıda belirtilen prosedür takip edilerek sekans sonrası pürifikasyon 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 santrifüje edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.
6. Pelet 20 µl deiyonize formamid ilavesi ile çözülmüş ve vortekslenmiştir.
7. Örnekler spin edilerek ABI 310 sekans tüplerine aktarılmıştır.
8. Örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiş, 3-4 dakika -20°C'de bekletilmiştir.
9. Hazırlanan örnekler kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

### **3.3. MDCK Hücre Hattı ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları**

Flp-In™ sistemi ile oluşturulmuş MDCK hücre hattı (MDCK-FRT-TR6-cl2) (P/10) Aarhus Üniversitesi, Biyotıp Bölümü araştırmacısı Hanne B. Moeller'den temin edilmiştir.

Flp-In™ sistemi, çalışılacak genin memeli hücrelerine belirli bir genomik lokasyonda entegrasyonunu ve ifadesini sağlar. Sistem, bir Flp Rekombinasyon Hedefi (FRT) alanının, tercih edilen memeli hücre hattının genomuna yerleştirilmesini hedefler. Çalışılacak geni içeren bir ekspresyon vektörü kullanılarak FRT bölgesinde Flp rekombinaz aracılı DNA rekombinasyonu yoluyla genoma hedefleme ve giriş sağlanır [128].

Flp-In™ sisteminin ana bileşenleri şunlardır:

- Entegre bir FRT sitesi içeren bir konak hücre hattının üretimi için bir Flp-In™ hedef site vektörü, pFRT/lacZeo.
- Flp rekombinaz aracılı entegrasyon ve insan sitomegalovirüsünün (CMV) promotörünün kontrolü altında çalışılan geni eksprese eden stabil bir hücre hattının seçimi için hygromisin direnç genine bağlı bir FRT bölgesini içeren bir ifade plazmid.

- İnsan CMV promotörünün kontrolü altında Flp rekombinazının ifadesi için bir Flp rekombinaz ekspresyon plazmidi, pOG44.

pOG44 ile Flp-In™ konakçı hücre hattınıza birlikte transfekte edildiğinde, kloramfenikol asetil transferaz (CAT) genini içeren bir kontrol ifadesi plazmidi, CAT genini eksprese eder.

Flp-In™ sisteminin kullanımı ile stabil hücre hatlarının oluşturulması birtakım avantajlar sağlar.

- Entegre bir FRT bölgesi içeren Flp-In™ konak hücre hattı oluşturulduktan sonra, çalışılan geni/genleri eksprese eden sonraki Flp-In™ hücre hattı jenerasyonu hızlı ve verimlidir.
- Flp-In™ sistemi, izogenik kararlı hücre hatlarının oluşturulmasına izin verir.
- Flp-In™ sistemi, stabil ekspresyon hücre hatlarının poliklonal seçimine izin verir [128].

### **3.3.1. MDCK Hücrelerinin Üretilmesi**

Hücreler, 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında; %10 donör bovine serum, 2,5 µg/ml blastisidin ile desteklenmiş Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) besiyerinde üretilmiştir.

### **3.3.2. Dondurulmuş Hücrelerin Açılması**

- - 80°C'den alınan hücreler, 37°C'de sıcak su banyosunda çözülmüştür.
- Tüp içerisindeki hücreler 15 ml'lik falkon tüpe alınır. Bu aşamada nazik olmak ve hızlı davranmak önemlidir.
- 800 rpm'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir.
- Besiyeri dikkatli şekilde uzaklaştırılmıştır.

- Falkon tüpün dibine hafifçe vurulmuştur. Böylece hücreler homojenize olarak birbirinden ayrılmıştır.
- Hücrelerin zerine 2 ml besiyeri eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılmıştır.
- 1'er ml hücre süspansiyonu iki adet 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kaplarına ekilmiştir. (Kültür kapları içerisine 5 ml besiyeri konularak hazırlanmıştır).

### **3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması**

- 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kaplarında bulunan konfluent hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- 2,5 ml tripsin ile hızlıca yıkama gerçekleştirilmiştir.
- Tripsin uzaklaştırılmıştır.
- 2 ml tripsin eklenir ve hücrelere kalkana dek etüvde bekletilmiştir.
- Hücreler homojenize edilerek toplanmıştır.
- 20 µl hücre, hazırlanan flaska ekilir.

### **3.3.4. Hücrelerin Dondurulması**

- Hücreler tripsinize edilerek (genel prosedür ile) 15 ml falkon tüpüne toplanmıştır.
- Tripsinizasyonun etkisi, eş miktarda besiyeri ile durdurulmuştur.
- 1000 rpm'de 5 dakika gerçekleştirilen santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası besiyeri ve tripsin uzaklaştırılmıştır.
- Hücre peleti dondurma besiyerinde süspanse edilip 3 ml'lik kriyotüplere 1 ml olarak paylaştırılmıştır.
- Dondurma besiyeri içeriği aşağıdaki gibidir.

- 5 ml DMSO
- 35 ml DMEM
- 10 ml DBS karıştırılarak hazırlanmış ve filtrasyon ile steril edilmiştir.

### 3.3.5. Yabancı Tip ve Mutant AQP2 Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin MDCK Hücrelerine Stabil Transfeksiyon Protokolü

Transfeksiyonun gerçekleştirilmesinde kullanılacak bileşenlerin miktarlarına ilişkin bilgiler Şekil 3.7’de verilmiştir.

Kuyu	Pog44 (ng)	FRT vektör (ng)	DNA (µg)	pOG44 (µl)	FRT vektör (µl)	Besiyeri (µl)	Lipofectamin (µl)	Besiyeri (µl)	Total (µl)	Kullanılan FRT vektör tipi (0.1 µg/µl)
1	1000	3000	4	10,0	30,00	10,0	4	46	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
2	2000	2000	4	20,0	20,00	10,0	4	46	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
3	3000	1000	4	30,0	10,00	10,0	4	46	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
4	0	0	0	0,0	0,00	50,0	4	46	100	negatif kontrol
5	1000	3000	4	10,0	30,00	10,0	8	42	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
6	2000	2000	4	20,0	20,00	10,0	8	42	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
7	3000	1000	4	30,0	10,00	10,0	8	42	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
8	0	0	0	0,0	0,00	50,0	8	42	100	negatif kontrol
9	1000	3000	4	10,0	30,00	10,0	12	38	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
10	2000	2000	4	20,0	20,00	10,0	12	38	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
11	3000	1000	4	30,0	10,00	10,0	12	38	100	AQP2-WT, A45T, R85X, A147T vektörleri
12	0	0	0	0,0	0,00	50,0	12	38	100	negatif kontrol

Şekil 3.7. Stabil transfeksiyon protokolü

### Transfeksiyon Koşullarının Oluşturulması

#### A. Hücrelerin ekimi

Hücreler 24-well platalere 90.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir.

#### B. Kullanılacak Plazmid DNA’ların Hazırlanması

Transfeksiyonda kullanılacak olan plazmid DNA’lar için konsantrasyon 0.1 µg/µl olarak belirlenmiş ve tüm DNA’lar kullanılacak hacimlerde bu konsantrasyona eşitlenmiştir (Çizelge 3.8) (Şekil 3.7).

Çizelge 3.8. Transfeksiyonda kullanılacak plazmid DNA'larının hazırlanma protokolü

	Stok DNA konsantrasyonu (µg/µl)	Alınacak Stok DNA miktarı (µl)	Nükleaz-free su miktarı (µl)
pcDNA5/FRT_AQP2-WT plazmid*	0,632	28,47	151,3
pcDNA5/FRT_AQP2-A45T plazmid*	0,239	75,5	104,85
pcDNA5/FRT_AQP2-R85X plazmid*	0,670	26,86	153,14
pcDNA5/FRT_AQP2-A147T plazmid*	0,519	34,68	145,32
pog44**	0,239	301.25	418,75
*180 µl 0.1 µg/µl ** 720 µl 0.1 µg/µl			

### C. Pog44-FRT-Besiyeri Karışımının Hazırlanması

pog44:pcDNA5/FRT\_AQP2 (yabanıl tip, A45T, R85X ve A147T) plazmid oranları, 1:3, 2:2, 3:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyonlar Şekil 3.7'de yer alan transfeksiyon protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır.

### D. Lipofektamin-Besiyeri Karışımının Hazırlanması

Lipofektamin:Besiyeri oranları, 4:46, 8:12, 12:38 olacak şekilde transfeksiyon için gereken hacim hesaplanarak ayarlanmıştır (Çizelge 3.9) (Şekil 3.7).

Çizelge 3.9. Lipofektamin-Besiyeri karışımının hazırlanma protokolü\*

<b>Lipofektamin:Besiyeri Oranı</b>	<b>Lipofektamin (µl)</b>	<b>Besiyeri (µl)</b>
4:46	60	690
8:12	120	630
12:38	180	570

\*Hesaplamalar 750 µl için verilmiştir.

Karışımlar hazırlanmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- Karışım halindeki DNA ile Lipofektamin-Besiyeri karışımı karıştırılmış ve 20 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Transfeksiyon işlemi öncesi hücrelerin ortamı serumsuz besiyeri ile değiştirilmiştir.
- Pog44+FRT+Besiyeri ve Lipofektamin-Besiyeri karışımı hücreler üzerine homojen olarak dağıtılarak eklenmiştir.
- 5 saat sonra ortamdaki besiyeri, DMEM + %10 DBS besiyeri ile değiştirilmiştir.
- 24 saat sonra, her well 500 µl tripsin ile muamele edilerek içerisinde 3 ml DMEM + %10 DBS besiyeri olan 6 well platalere aktarılmıştır.
- 8 saat sonra (transfeksiyon sonrası toplam süre 32 saattir) besiyerleri 2 ml seçici besiyeri ile değiştirilir. Stabil transfekte hücrelerin, non-transfekte hücrelerden farklı olarak ikinci bir antibiyotik (Hygromisin Invitrogen®) seleksiyonuna direnç kazandığı bilinmektedir.
- Seçici besiyerinin hazırlanışı
  - ❖ 50 ml DMEM + %10 DBS besiyeri
  - ❖ 50 µl Blastisidin Invitrogen® (5 µg/ml olacak şekilde)
  - ❖ 500 µl Hygromisin Invitrogen® (500 µg/ml olacak şekilde)

## **E. Hücrelerin Seçici Besiyeri ile Seleksiyonu**

- Hücrelerin durumları mikroskop ile kontrol edilerek besiyeri değişimine karar verilmiştir.
- Hücrelerin tutunmaya başladığı kuyucuklarda selektif besiyeri ile seçime devam edilmiştir.
- İlgili kuyulardaki büyümekte olan hücreler, 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler beslenerek konfluent hale getirilmiş, ilgili flasklar için pasajlama yapılmıştır.
- İki pasajlama işleminin ardından hücreler dondurularak -80°C'de saklanmıştır.

### **3.4. Forskolin Uygulaması**

Yabanıl ve mutant tip MDCK hücrelerine forskolin (Sigma®) uygulaması için izlenen protokol aşağıda verilmiştir. Forskolin anti-hipertansif, pozitif inotropik ve adenil siklaz aktivasyon özelliklerine sahip bir diterpenoiddir. Biyolojik etkilerinin birçoğu, adenil siklazın aktivasyonundan ve hücre içi cAMP konsantrasyonunda meydana getirdiği artıştan kaynaklanmaktadır. Forskolin aracılı stimülasyon, mutant AQP2 proteinlerinin hücre içi ifade farklılıklarının ortaya konması için sıklıkla kullanılmaktadır.

1. Yabanıl ve mutant tip stabil transfekte hücreler 6-well platelere 200.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir.
2. Hücreler konfluent hale gelene dek üretilmişlerdir.
3. Forskolin uygulama (saf besiyeri:forskolin;1000:1) ve kontrol karışımı (saf besiyeri:DMSO; 1000:1) hazırlanmıştır.
4. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, hazırlanan uygulama ve kontrol karışımları ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon süresi sonunda hücreler üç kez 1X PBS ile yıkanmıştır.
6. Hücreler üzerine 1X sample buffer eklenerek toplanmış, elde edilen örnekler sonikasyon yapılarak deney sürecine kadar -20°C'de saklanmıştır.

#### **4X Sample buffer (pH= 6.8, 100 ml ddH<sub>2</sub>O)\***

Sigma (7-9)	3.03 g
Gliserol	40.0 ml
SDS	12 g
Bromofenolblue	24 mg

\*1X Sample buffer 60 mg/ml DTT içerecek şekilde hazırlanmıştır.

### **3.5. Deglikozilasyon Deneyleri**

Çalışma kapsamında, stabil yabanıl tip ve mutant MDCK hücre hatlarından elde edilen protein lizatları ile mutant proteinlerin hücre içi olgunlaşma sürecindeki farklılıkların tespiti için Endo H (NEB®) ve PNGase F (NEB®) enzimleri kullanılarak, deglikozilasyon deneyleri yapılmıştır. Kullanılan enzimlerden, Endo H yüksek mannoz (ve N-bağlı glikoproteinlerin bazı hibrit oligosakkaritleri) gruplarının ayrımını yaparken, PNGase F, asparajine bağlı N-glikanların tamamını ayırmaktadır.

Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda verilmiştir.

1. Yabanıl ve mutant tip stabil transfekte hücreler 6-well platelere 200.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir.
2. Konfluent hale gelen hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır.
3. Hücreler proteaz inhibitörü (leupeptin ve phephabloc) içeren 200 µl diseksiyon tamponu ile plate yüzeyinden kazınarak ve tüplere aktarılmıştır.

#### **Diseksiyon tamponu (pH= 7.2, 500 ml ddH<sub>2</sub>O)**

Sükroz	51.35 g
--------	---------



İmidazol	0.8513 g
EDTA	0.1861 g

4. Hücreler 30 saniye homojenize edilmiştir.
5. Nükleer fraksiyon 1000 g'de, 10 dakika ve 4°C'de santrifüje edilerek çöktürülmüştür.
6. Süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır (süpernatant; plazma membranı, mitokondri, lizozom ve ER fraksiyonu içerir).
7. Protein konsantrasyonları Quawell Q5000 UV Spektrofotometre (Quawell Technology, Inc) ile ölçülmüştür.
8. Konsantrasyonları belirlenen proteinler; Endo H (NEB®) ve PNGase F (NEB®) enzimleri ile kesime uğratılmıştır.
9. Reaksiyonlar kesim gerçekleştirilmeyen kontrollerle birlikte immüblot sisteminde değerlendirilerek analiz edilmiştir.

#### **Endo H (NEB®) Protokolü**

Reaksiyon aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilecektir.

- 1-20 µg glikoprotein, 1 µl 10X Glikoprotein Denatürasyon Tamponu ve H<sub>2</sub>O (gerekli ise) eklenerek toplam reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.
- Glikoprotein denatürasyonu, 100°C'de 10 dakika ısı reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.
- Toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, 2 µl GlikoBuffer 3 (10X), H<sub>2</sub>O ve 1,5 µl Endo H (NEB®) eklenmiştir.
- Reaksiyon karışımı 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

## **PNGase F Kesim (NEB®) Protokolü**

Reaksiyon aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1-20 µg glikoproteine, 1 µl 10X Glikoprotein Denatürasyon Tamponu ve H<sub>2</sub>O (gerekli ise) eklenerek toplam reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.
- Glikoprotein denatürasyonu 100°C'de 10 dakika ısı reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.
- Denatüre glikoproteinler buzda tutulduktan sonra tüpler spin edilmiştir.
- Toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, 2 µl GlikoBuffer 2 (10X), 2 µl %10 NP-40 ve 6 µl H<sub>2</sub>O eklenmiştir.
- Reaksiyona 1 µl PNGase F (NEB®) eklenerek hafifçe karıştırılmıştır.
- Reaksiyon karışımı 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.6. Sikloheksimid Analizi**

Sikloheksimid, *Streptomyces griseus* tarafından üretilen bir antibiyotiktir. Başlıca biyolojik aktivitesi, hücre büyümesinin durdurulması ve hücre ölümüyle sonuçlanan, ökaryotlarda protein sentezinin translasyon düzeyinde inhibisyonu üzerinedir. Sikloheksimid, protein sentezinin kontrollü inhibisyonunun gerçekleştirilmesi yoluyla, kısa ömürlü proteinlerin yarı-ömürlerinin tespiti çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, mutant AQP2 proteinlerinin yarı ömürlerinin yabanıl tip AQP2'den farklılıklarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

1. Yabanıl ve mutant tip stabil transfekte hücreler 6-well platelere 200.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Analizde uygulama ve kontrol grubu bulunmaktadır.

2. Hücreler konfluent hale gelene dek üretilmişlerdir.

3. Uygulama grubu hücrelerinin besiyeri 50 µM sikloheksimid (Sigma®) (DMSO içerisinde hazırlanmıştır) içeren besiyeri ile, kontrol grubu hücrelerinin besiyeri ise aynı konsantrasyonda DMSO içeren besiyeri ile değiştirilmiştir.
4. Hücreler 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında çeşitli sürelerde (24 saate kadar; 0., 4., 8., 12. ve 24.saatler) inkübe edilmiştir.
5. Belirlenen süre aralıklarının sonunda hücreler iki kez 1X PBS yıkamasının gerçekleştirilmesinin ardından 500 µl 1X sample buffer ile toplanmış, elde edilen örnekler sonikasyon yapılarak deney sürecine kadar -20°C'de saklanmıştır.
6. İmmunblot analizi sonrası protein yarı ömürlerinin hesaplanması için her inkübasyon süresine karşılık gelen ortalama bant yoğunluğu kontrollerle normalize edilerek, bağımsız deneylerden elde edilen sonuçlar, "Graphpad Prism 7 Software" kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.7. İmmünblot Analizi

Forskolin, Endo H (NEB®) ve PNGase F (NEB®) ve sikloheksimid uygulamaları sonrası hücre içinden elde edilen yabancı tip ve mutant protein örnekleri Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad Laboratories, Inc) precast jelde yürütülmüş, ardından proteinler PVDF membrana transfer edilerek işaretlenme ve görüntüleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

1. Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad Laboratories, Inc) precast jele yüklenen protein örneklerinin miktarı 30 µg'dır ve jel kuyucuk hacmi 30 µl'dir. Forskolin, Endo H, PNGase F ve sikloheksimid uygulamalarından elde edilen ve miktar ölçümleri gerçekleştirilen örneklerin jele yükleme konsantrasyonları yukarıdaki parametreler göz önüne alınarak eşitlenmiştir. Sikloheksimid deneyinde tüm örneklerin aktin kontrolleri için jel yüklemeleri yapılmıştır.
2. Örnekler 65°C'de 5 dakika boyunca denatüre edildikten sonra jele yüklenmiştir.
3. 30 dakika boyunca 200 Volt'da yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

4. Elektroforez sonrası jelde yer alan proteinler Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistem (Bio-Rad Laboratories, Inc) ile 7 dakika boyunca 25 V uygulanarak PVDF membrana transfer edilmiştir.

5. Transfer sonrası membran, %5 süttozu içeren PBST (%0.05 Tween-20 içeren 1X PBS) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloke edilmiştir

6. Membran, 3 kez 10 dakika aralıklarla PBST ile yıkanmıştır.

7. Yıkama sonrası membran poliklonal rabbit anti-AQP2 antikor (ab78230, Abcam, %5 süttozu içeren PBST'de 1:500 dilüsyonda hazırlanmıştır) ile gece boyunca 4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sikloheksimid deneyinin kontrol jelleri monoklonal anti-aktin antikor ile (ab 179467, Abcam, %5 süttozu içeren PBST'de 1:5000 dilüsyonda hazırlanmıştır) işaretlenmiştir.

8. Muamele sonunda membran, 3 kez 10 dakika aralıklarla PBST ile yıkanmıştır.

9. Yıkama sonrası membran HRP işaretli keçi anti-tavşan IgG H&L antikor (ab205718, Abcam, %5 süttozu içeren PBST'de 1:25000 dilüsyonda hazırlanmıştır) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

10. Antikorla muamele sonrasında membran, 3 defa 10 dakika aralıklarla PBST ile yıkanmıştır.

11. İlgili protein bantları, Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad Laboratories, Inc) ile kemilüminesans temelli belirlenmiş ve ChemiDoc™ görüntüleme sistemi (Bio-Rad Laboratories, Inc) ile görüntülenmiştir.

### **3.8. Yabancı ve Mutant Tip Hücrelerde İmmüsitokimyasal Analiz**

Mutant AQP2 proteinlerinin hücre içi trafiğinin belirlenmesi için immüsitokimyasal analizler uygulanmıştır.

İmmüsitokimya analizleri için,

1. Yabani ve mutant tip stabil transfekte hücreler coverslip üzerine 150.000 hücre olacak şekilde ekilmiş, %70-80 konfluent olduklarında, %4 paraformaldehit içeren 1X PBS ile oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek fikse edilmiştir.
2. Ardından üç kez, kısa süreli 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
3. Hücreler 10 dakika 1X PBS içerisinde hazırlanan %0.2 saponin içerisinde permeabilize edilmiştir.
4. Üç kez, 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
5. Bu işlemin ardından blokasyon aşağıda belirtilen çözeltiler kullanılarak iki aşamalı şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 30 dakika boyunca %10 DBS, %0.1 BSA ve %0.05 saponin içeren 1X PBS uygulanmıştır. İkinci aşamada ise 30 dakika boyunca %1 BSA, %0.2 balık jelatini, %0.05 saponin ve 0.05M glisin içeren 1X PBS ile oda sıcaklığında blokasyon gerçekleştirilmiştir.
6. Primer antikor ile işaretleme için poliklonal rabbit anti-AQP2 antikor (ab78230, Abcam, %0.5 BSA, %0.05 saponin içeren 1X PBS içerisinde, 1:25 dilusyonda hazırlanmıştır) ile 4°C'de gece boyu inkübasyon yapılmıştır.
7. Üç kez, beşer dakika %0.5 BSA ve %0.05 saponin içeren 1X PBS ile oda sıcaklığında yıkama yapılmıştır.
8. Sekonder antikor uygulaması, Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antikoruna ile (1:1000) %0.5 BSA ve % 0.05 saponin içeren 1X PBS'de hazırlanmış 1 saat nemli ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.
10. Üç kez, üçer dakika 1X PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir.
11. Çekirdeğe karşıt boya (counterstain) uygulaması yapılmış, (1:1000 1X PBS dilusyonunda hazırlanmıştır) ve 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir.
12. Üç kez, üçer dakika 1X PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir.

13. Örnekler, Glycergel Sabitleyici Medium (Dako) kullanılarak, cam lameller üzerine tutturulup süreci takiben mikroskopik analiz gerçekleştirilmiştir.

### 3.9. *Xenopus laevis* Oosit İfade Sistemi Çalışmaları

Bir *Xenopus* oositi, uygun hormonal stimülasyon altında fertilizasyon için yeterli hale gelebilen olgunlaşmamış bir yumurtadır. Oositler, bağ dokusu, kan damarları ve folikül hücrelerini içeren yumurtalık lobları olarak adlandırılan kümeler şeklinde yetişkin dişilerin karın boşluğunda depolanır ve aynı dişiden üç defaya kadar cerrahi prosedür ile çıkarılabilirler [129].

Oositler altı olgunlaşma aşamasından geçer (I-VI); evre V ve VI oositleri en büyük çapta olup (~ 1.2 mm çapında), genellikle elektrofizyolojik çalışmalar için kullanılır. Aşama IV oositleri, bazen çok hızlı kinetiğe sahip iyonik akımların çalışmaları için tercih edilir, çünkü daha küçüktürler ve daha iyi bir temporal kelepçeye izin verirler. Oositler, hayvansal kutup adı verilen siyah pigmentli bir bölge ve beyaz (pigmentsiz) bitkisel bir kutba sahip büyük hücrelerdir [129].

Oosit plazma membranı, oosit şeklinin korunmasına ve oositin manipülasyonlara daha dirençli hale getirilmesine yardımcı olan bir vitellin membran ile çevrilidir. Vitellin membranı, kanal ve taşıyıcılardan yoksun olduğu ve iyonların ve küçük moleküllerin nüfuzunu sağlamak için yeterince geniş bir ağı sahip olduğu için elektrofizyolojik kayıtları etkilemez. Bununla birlikte, tek kanallı kayıtlar için, vitellin membranı çıkarılır çünkü bu, yama pipeti ve oosit membranı arasında yüksek dirençli yalıtımın oluşmasını engeller. Vitellin zarının etrafında, oositi dış ortamdaki ayıran bir foliküler hücre tabakası bulunur [Şekil 3.8.b]. Vitellin membranının tersine, foliküler hücreler iyon kanallarını ve taşıyıcıları ifade eder, birbirlerine ve ara bağlantılarla oosite elektriksel olarak bağlanırlar. Bu nedenle elektrofizyolojik kayıtlar sırasında ciddi parazit oluşturabilir. Bu sebeple, söz konusu hücre tabakası, kollajenaz uygulaması ve elle soyma işleminin bir kombinasyonu ile enjeksiyondan önce ortamdaki uzaklaştırılır [129].

1971 yılında Gurdon ve arkadaşları, Güney Afrikalı pençeli kurbağa *Xenopus laevis*'ten elde edilen oositlerin, ilgili mRNA'nın enjekte edilmesiyle sonuçlanan

hemoglobini sentezleyebildiğini göstermiştir [130]. Gerçekten de oositler, mRNA enjeksiyonunu takiben proteinlerin ifadesi için oldukça uygundur. Çünkü bunlar, normal olarak, heterolog proteinler için gereken ve özellikle normalde fertilizasyondan sonra kullanılan enzimlerin, organellerin ve proteinlerin biriktirilmiş depolarını içerir [129].

Oositler, erken embriyogeneze, yani iribaş aşamasına kadar, gelişimin ilk aşamaları için gerekli tüm RNA ve proteinler açısından çok zengindir. 4 µg ribozomal RNA içerebilirler, bu nedenle her oosit günde 400 ng protein sentezleyebilir. Bu nedenle *X. laevis* oositleri tek hücre deneylerinde, sıklıkla kullanılmaktadır [131].

Dış kaynaklı (ekzojen) mRNA'yı proteinlere verimli bir şekilde çevirme yeteneklerinin yanı sıra, *Xenopus* oositleri başka deneysel avantajlara da sahiptir. Bunlar,

- *X. laevis*, belirli bir alanda tutulabilen ve düşük maliyetli bir laboratuvar hayvanıdır.
- Oositler kolayca toplanabilir ve büyük çapları (1-1.2 mm) nedeniyle enjekte edilebilecek kadar basittir.
- Kurbağa oositleri vücudun dışında uzun süre hayatta kalma kapasitesine sahiptir ve tatlı sudan biraz daha fazlasına ihtiyaç duyarlar.
- Oositler, düşük sayıda iç kaynaklı (endojen) membran taşıyıcı ve kanalı ifade eder; çünkü neredeyse ekzojen besinlerden bağımsızdırlar.
- Çoklu alt birimler tarafından oluşturulan protein komplekslerini çalışmak için birden fazla mRNA türü aynı anda enjekte edilebilir. Büyük multi-protein kompleksleri çalışmak için bu durum transfekte edilmiş memeli hücreleri ile yapılan çalışmalara göre önemli bir avantajdır.
- Standart elektrofizyolojik teknikler kolayca uygulanabilir.

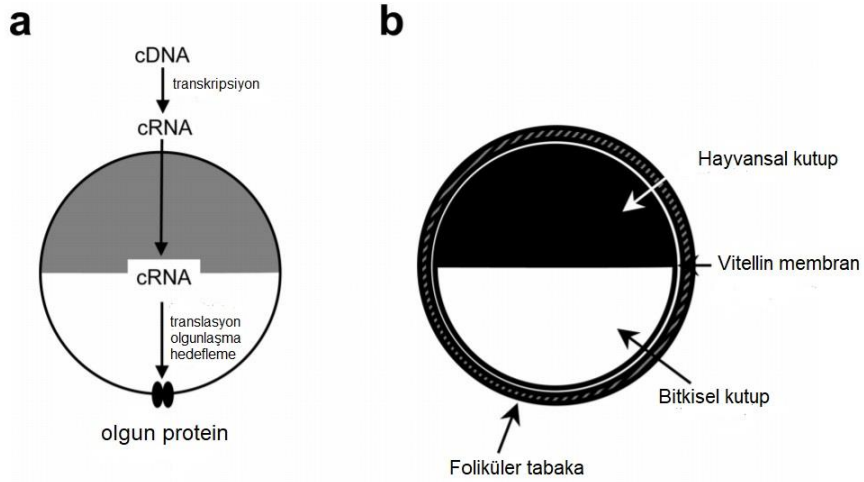
*Xenopus* oositleri kullanılan ilk çalışmalar, globin, interferon ve viral proteinler gibi elektrofizyologların çok az ilgi duyduğu proteinlerle gerçekleştirilmiştir. 1982'de

Miledi ve arkadaşları, ilk kez *Xenopus* oositlerinin çeşitli iyon kanallarının [132, 133] ifade edebildiklerini göstermiş ve oositler hızla, kanalların, reseptörlerin ve taşıyıcıların elektrofizyolojik analizi için tercih edilen bir materyal haline gelmiştir. *Xenopus* oositleri kullanan elektrofizyolojik çalışmalar şunları içerir,

- Kanal geçirgenlik özellikleri ve farmakolojik duyarlılık analizi,
- Mutant kanal alt birimlerinin yapı-işlev sorunlarını ele almak için özelliklerinin araştırılması,
- Kanal translasyon sonrası modifikasyonların analizi, kurulum ve stokiyometri,
- Reseptörler ve ikinci haberciler ile kanal modülasyonu üzerine çalışma,
- İyon kanal ve taşıyıcılarını kodlayan genler için fonksiyonel tarama.

*Xenopus* oositlerinde ekzojen proteinlerin ifadesi için en yaygın yaklaşım, *in vitro* transkripsiyonlu tamamlayıcı (komplementer) RNA'yı oosit sitoplazmasına enjekte etmektir [Şekil 3.8.a]. İfade, cDNA'nın oosit çekirdeğine enjekte edilmesiyle de sağlanabilir; ancak bu yöntem çekirdeğin görsel lokalizasyonunu gerektirir ve enjeksiyon sırasında çekirdek membranının zarar görme riskini taşır. Bu yaklaşım, çalışmayı teknik açıdan daha zor ve daha az verimli hale getirir. Son yıllarda sıklıkla kullanılan yöntem geçirilecek olan yöntem, tamamlayıcı RNA'nın (cRNA) oosit sitoplazmasına mikroenjeksiyonunu temel alan yöntemdir [129].





Şekil 3.8. a. *Xenopus* oositlerinde ekzojen proteinlerin ifadesinin şematik gösterimi. b. Bir yumurtalık lobunda bulunan evre V veya VI oositinin kollajenaz muamelesinin ardından (2 mg/ml konsantrasyonda, oda sıcaklığında 2 saat süre ile) görüntüsü. [Yumurtalık lobları 2 saat süreyle 2,5 mg/ml kollajenaz ile muamele edildiğinde foliküler tabaka ayrılır][129]

Mutant AQP2 proteinlerine ilişkin yapılan fonksiyonel ve biyokimyasal çalışmalar için *X. laevis* oosit ifade sistemi sıklıkla kullanılmaktadır [7, 8, 14, 15, 106].

Tez çalışması kapsamında, yabancı ve mutant cRNA'ların enjekte edildiği oosit ifade sisteminde;

- 1) Mutant AQP2 proteininin oositlerde ifade düzeylerini tespit edebilmek için total ve plazma membran izolasyonu,
- 2) Mutant AQP2 proteinlerinin su alımı üzerine etkilerinin belirlenmesi için su geçirgenliği testi yapılmıştır.

### 3.9.1. *Xenopus laevis* Oosit İfade Sistemi Çalışmalarında Kullanılacak Olan Yabancı Tip ve Mutant pT7TS-AQP2 Vektörlerinin Hazırlanması

İfade vektörü olarak oosit ifade vektörü kullanılmıştır (pT7TS). Bu amaçla pT7TS vektörü ticari olarak satın alınmış (<https://www.addgene.org/17091/>) ve transformasyon ile çoğaltılmıştır. Yabancı ve mutant AQP2 kodlayan gen dizileri, hücre kültürü çalışmalarında kullanılan pcDNA5/FRT plazmidinden, pT7TS ifade

vektörlerine klonlama (sub-cloning) ile aktarılmıştır. Klonlamada kullanılmak üzere bir çift primer dizayn edilmiştir.

Elde edilen yabancı tip ve mutant *AQP2* dizilerini içeren amplikonlar, pT7TS vektörü içerisine *Bgl*III NEB® ve *Spe*I NEB® restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak aktarılmış ve bakteri hücrelerine transforme edilmiştir.

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 *AQP2* dizisi içeren pT7TS vektörünü taşıyıp taşımadıklarını anlamak için koloni PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA kalıbı olarak 2 µl bakteri kültürü alınmış, bakterilerdeki vektörün *AQP2* 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 ve ertesi gün bu bakterilerden kit ile plazmid DNA'sı izole edilmiş ve PZR ile tüm *AQP2* dizisi yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılmıştır. Klonlama sonrası elde edilen pT7TS-yabancı tip, pT7TS-A45T, pT7TS-R85X ve pT7TS-A147T vektörlerinin dizileri sekans reaksiyonu ile kontrol edilmiştir.

### **3.9.2. *Xenopus laevis* Oositlerine Enjeksiyonu Gerçekleştirilecek Yabancı Tip ve Mutant cRNA'ların *in vitro* Eldesi için Yapılan Çalışmalar**

#### **3.9.2.1. Yabancı ve Mutant Tip Oosit İfade Vektörlerinin Doğrusal Hale Getirilmesi (Linearizasyonu)**

cRNA eldesinin yüksek verimlilikte olması için vektörün tam olarak linearize edilmesi gerekmektedir. Linearizasyon için 10 µg plazmid DNA'sı ile kullanılmış ve kesim reaksiyonu 200 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için literatüre uygun olarak *Sall* enzimi kullanılmıştır (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Vektör linearizasyonu için kullanılan bileşen miktarları

	pT7TS-AQP2 (141 ng/µl)	pT7TS AQP2-A45T (194,375ng/µl)	pT7TS AQP2-R85X (163,5 ng/µl)	pT7TS AQP2-A147T (181,76 ng/µl)
<b>Kalıp DNA (10 µg)</b>	71	52	61	55
<b>Sall (20 U/µl)</b>	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>Neb 3.1. Buffer (µl)</b>	20	20	20	20
<b>Distile su (µl)</b>	107,5	126,5	117,5	123,5

Kesim reaksiyonları 37°C'de gece boyu inkübasyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 65°C'de 20 dakika tutularak ısı inaktivasyonu ile durdurulmuştur. Vektör linearizasyonun kontrolü için kesim örneklerinden 5 µl alınarak %1'lik agaroz jele yüklenmiştir.

### 3.9.2.2. Yabancı ve Mutant Tip Lineer Oosit İfade Vektörlerinin Pürifikasyonu

Linearizasyon sonrası kalan hacimdeki örnekler;

- 1/20 hacim 0.5 M EDTA,
- 1/10 hacim 3 M Sodyum asetat,
- 2 hacim %100 etanol ile iyice karıştırılarak 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmış ve -20°C'de 2 saat presipitasyona bırakılmıştır.

Kullanılan bileşen miktarlarının ayrıntıları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Linearizasyon sonrası pürifikasyon işlemi için kullanılan bileşenler

<b>Linear DNA miktarı (µl)</b>	<b>0.5 M EDTA (1/20 µl)</b>	<b>3 M Sodyum asetat (1/10 µl)</b>	<b>%100 Alkol (2X µl)</b>
pT7TS-AQP2 (168,2)	8,41	16,82	336,4
pT7TS-AQP2- A45T (161)	8,08	16,16	323,2
pT7TS-AQP2-R85X (169)	8,45	16,9	338
pT7TS-AQP2-A147T (167,5)	8.375	16,75	335

4. Ardından örnekler 15 dakika maksimum hızda santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. Kalıntıların uzaklaşması için tüpler spin edilerek işlem tekrarlanmıştır.
6. Kalan pelet final konsantrasyon 0.2-0.5 µg/µl olacak şekilde nükleaz-free suda çözülmüştür.

Elde edilen lineer vektör kalıplarının saflık ve miktar dereceleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

### **3.9.2.3. Yabancı ve Mutant Tip cRNA'ların Eldesi/Ekstraksiyonu**

Yabancı tip ve mutant AQP2 dizilerini içeren pT7TS plazmidinin *Sall* enzimi ile linearize edilmesi ile elde edilen kalıplar kullanılarak mMessage mMachinE T7 kit (Ambion, Austin Tx) ile cRNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Yöntemin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

#### **Önemli noktalar**

- RNA polimeraz enzim karışımı ve 2x NTP/CAP ribonükleotid buzda tutulmuştur.
- 10X reaksiyon tamponu içerisinde bulunan spermidin, buz üzerinde presipite olması nedeniyle tampon, reaksiyon boyunca oda ısısında tutulmuştur.
- 10X reaksiyon tamponu, su ve NTP'den sonra konulmuştur.
- Reaksiyonun verimliliğinin test edilmesi amacıyla kit kontrol plazmidini kullanılmıştır.

Reaksiyonda kullanılan bileşenlere ait miktarlar Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. cRNA eldesi için kullanılan reaksiyon bileşen miktarları

	pT7TS-AQP2	pT7TS-AQP2- A45T	pT7TS-AQP2-R85X	pT7TS-AQP2-A147T	Kontrol
Nükleaz-free su (µl)	3,66	3,63	4	4	4
2x NTP/CAP (µl)	15	15	10	10	10
10x reaksiyon tamponu (µl)	3	3	2	2	2
Linear kalıp DNA (µl)	5,34	5,37	2	2	2
Enzim karışımı (µl)	3	3	2	2	2
Toplam reaksiyon hacmi (µl)	30	30	20	20	20

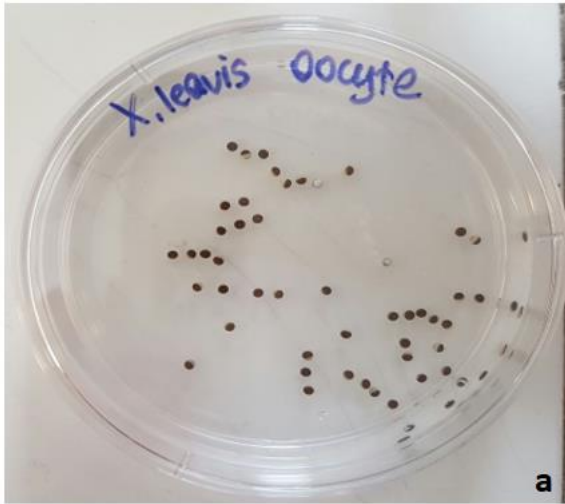
1. Bileşenler iyice karıştırılarak 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 1 µl TURBO DNase ile iyice karıştırılmış ve 37°C'de 15 dakika boyunca tekrar inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonlar 30 µl nükleaz free su ve 30 µl LiCl presipitasyon çözeltisi ile durdurulmuştur. Kuvvetlice karıştırılmış ve 1.5 ml'lik ependorfa aktarılarak 1 saat -20°C'de presipite olması için bekletilmiştir.
4. Örnekler 4°C'de 15 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
5. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış, pelet 1 ml %70'lik etanol ile yıkanmış ve bağlanmamış nükleotidlerin uzaklaşması için yeniden santrifüj edilmiştir.
6. %70'lik etanol dikkatlice uzaklaştırılmış, kuruması beklenerek final RNA peleti 25 µl nükleaz-free suda çözülmüştür.
7. Konsantrasyonları ölçülen cRNA örnekleri 4 µl aliquotlar halinde -80°C'de saklanmıştır.

### 3.9.3. *Xenopus laevis* Oositlerinin ve İlgili Besiyerlerinin Temini

Çalışılan AQP2 mutasyonlarının fonksiyon analizlerinin gerçekleştirilmesinde kullanılacak olan *X. laevis* evre V ve VI oositleri ve bunların standart besiyerleri Ecocyte Bioscience firmasından ticari olarak temin edilmiştir (Şekil 3.9.a, Şekil 3.9.b). Ticari olarak alınan oosit besiyeri olan Standart Barth's Çözeltisi, %5 horse serum ve 2.5 mM sodyum pirüvat çözeltilerinin ilavesi ile modifiye edilmiştir.

#### 50 ml oosit besiyeri içeriği

Standart Barth's Çözeltisi	46,25 ml
Horse Serum (%100)	2,5 ml
Na Piruvat (100 mM)	1,25 ml



Şekil 3.9. a. *Xenopus laevis* oositleri, b. Standart Barth's çözeltisi

### 3.9.4. *Xenopus laevis* Oositlerine Yabancı Tip ve Mutant pT7TS-AQP2 Vektörlerinden *in vitro* Olarak Elde Edilen cRNA'ların Enjeksiyonun Yapılması

Yabancı tip ve mutant pT7TS-AQP2 vektörlerinden *in vitro* olarak elde edilen cRNA'ların *X. laevis* oositlerine enjeksiyonu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyofizik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Nuhan PURALI ve ekibi tarafından geliştirilen düzenek ile gerçekleştirilmiştir.

Enjeksiyon işlem basamakları ve uygulamaya ait görüntüler Şekil 3.10'da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 3.10. cRNA enjeksiyon basamağına ait görüntüler a. İnjeksiyon sisteminin genel görüntüsü b. İnjeksiyon için kullanılan uçların hazırlanma aparatı c. İnjeksiyon uygulama anına ilişkin görüntü.

Uygulanan yöntem aşağıdaki gibidir.

1. RNAz içermeyen su ve RNA buz üzerinde çözülmüştür.
2. 6-well plate'ler içerisine oositler sıralanmıştır (kalite kontrol için).
3. Çekici ayarı #8'de iğneleri çekilmiştir. Her bir iğnenin ucunu makasla kırpılmıştır.
4. Sarı bir uç ve pipet kullanarak yaklaşık 15 µl mineral yağ ile iğne doldurulmuştur. Yağın içinde hava kabarcığı olmadığından emin olunması gerekmektedir. Bir petri plağından, ucun içine 500 nl nükleaz-içermeyen su (düğmeyi saat yönünün tersine çevirerek "50 yönünde"), bunu takiben 4 µl RNA örneği çekilmiştir.

5. Oositler taze Barth's çözültisi içerisinde ızgaralı bir petri plağına yerleştirilmiştir. Olası hava kabarcıklarını çıkarmak için plağın dışına 50 nl çıkarılmıştır. Işık tarafında veya ışık/karanlık arayüzünde, her oosite 50 nl\* (saat yönünde, pipet üzerinde "5 yönünde") ilgili cRNA dilusyonundan enjekte edilmiştir. 6-well plate'e geri dönmüştür ve oositler 18°C'de inkübe edilmiştir.

\*Enjekte edilecek cRNA konsantrasyonları 50 nl enjeksiyon hacmi için yabancı tip için 1 ng, mutantlar için ise 10 ng olarak belirlenmiştir.

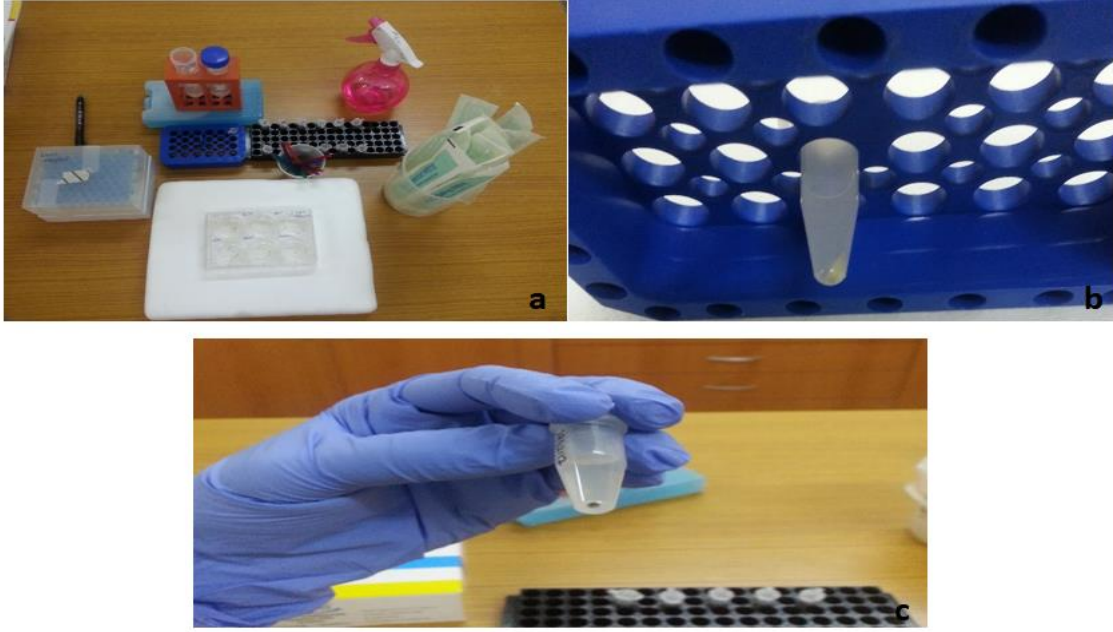
6. Barth's çözültisi değiştirilmiş ve analize kadar günlük olarak hatalı oositler çıkarılmıştır.

### **3.9.5. İmmünblot Analizleri/*Xenopus laevis* Oositlerinden Total ve Plazma Membranlarının İzole Edilerek, Yabancı ve Mutant Protein Miktarlarının Karşılaştırılması**

#### **Total membran izolasyonu**

1. Yabancı tip ve mutant cRNA enjeksiyonu yapılan 5 oosit 1 ml 1X PBS içerisinde (PMSF destekli) ezilmiştir. Örnekler 250 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde yolk proteinleri uzaklaştırılmıştır.
2. Debris atılmıştır.
3. Süpernatant 20000 g'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Elde edilen pellet membrandır ve 10 µl 1X PBS'te çözülmüş (2 µl/oosit) ve örnekler -20°C'de saklanmıştır. Uygulamaya ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.11).





Şekil 3.11. a. Total membran izolasyonu uygulamaları için çalışma alanı, b. Yolk proteinlerini içeren debris, c. Total membran fraksiyonunu içeren lizat

### **Plazma membran izolasyonu**

1. Yabanıl tip ve mutant cRNA enjeksiyonu yapılan 40'ar oosit MES-buffered salin ile yıkanmıştır.

### **MBSS tamponu, pH 6.0**

80 mM NaCl

20 mM MES

Oositler 10 dakika oda sıcaklığında MBSS+%0.005 Subtilisin A çözeltisinde bekletilmiştir.

Bu aşama vitellin membranın uzaklaşması için ajitasyon evresidir.

2. Oositler 4°C'de %1 Iudox çözeltisinde bekletilmiştir.

3. Arada MBSS yıkaması gerçekleştirilmiştir.

4. Oositler 4°C'de %0.1 poliakrilik asit çözeltisinde bekletilmiştir.

5. Arada MBSS yıkaması gerçekleştirilmiştir.
6. Oositler 0.5 ml soğuk HbA ile homojenize edilmiştir (P-200 pipeti ile yaklaşık 15 kez pipetaj yapılarak, partiküller görünmeyene dek işleme devam edilmiştir). Bu işlem, daha sonraki santrifüj adımlarında görülebilen vitellin membranlara bağlanmış geniş plazma zarlarının bulunduğu homojen bir çözelti üretir.

#### **Hb A çözeltisi, pH 7.4**

5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

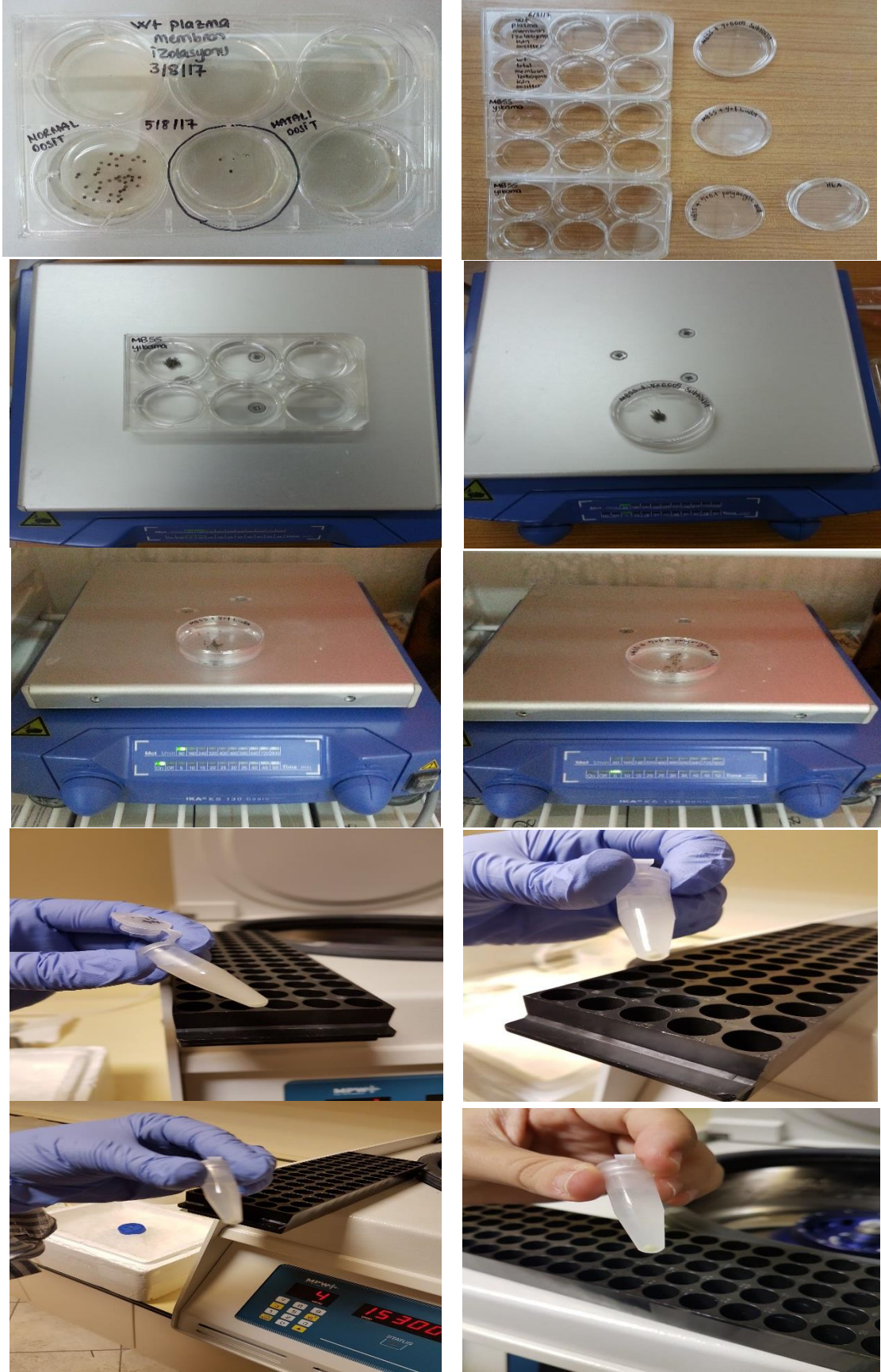
1 mM EDTA

80 mM sukroz

20 mM Tris

7. Homojenat HbA ile 1,5 ml'ye tamamlanmıştır.
8. 16 g 30 saniye 4°C'de santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırılmış, 75-100 µl çözelti aşağıda bırakılmıştır (Bu kısım plazma membranını içermektedir).
10. Lizat 1 ml soğuk HbA ile seyreltilmiştir.
11. Tekrar santrifüj edilmiştir (Süpernatant atılır).
12. Taze HbA ile değiştirilir, plazma membranı görünene dek çalkalanır.
13. 25 g 30 saniye 4°C'de santrifüj edilmiştir.
14. Süpernatant atılmış, 1 ml HbA eklenmiştir.
15. 35 g 30 saniye 4°C'de santrifüj edilmiştir.
16. Süpernatant atılmış, 1 ml HbA eklenmiştir.
17. 16000 g 20 dakika santrifüj edilmiştir.
18. Pelet 10 µl HbA'da çözülmüştür.

Uygulamaya ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Plazma membran izolasyonu uygulama basamakları

## **İmmünblot analizi**

Enjekte oositlerin total ve plazma membran izolasyonlarından elde edilen hücre içi yabancı tip ve mutant protein örnekleri Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad Laboratories, Inc) precast jelde yürütülmüş, ardından proteinler PVDF membrana transfer edilerek işaretlenme ve görüntüleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.9.6. Su Geçirgenlik Testinin Uygulanması**

Yabancı tip ve mutant cRNA'ların injekte edildiği oositlere su geçirgenlik testleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyofizik Anabilimdalı'nda, Prof. Dr. Nuhan PURALI'nın laboratuvarında, ortak çalışma ile oluşturduğumuz sistemle gerçekleştirilmiştir.

Enjeksiyondan 24 saat sonra su geçirgenliği testi uygulanacak oositlerin vitellin membranları uzaklaştırılmış ve su geçirgenlik testi uygulanmıştır. Bunun için gereken bileşenlere ilişkin ayrıntılar aşağıda verilmiştir.

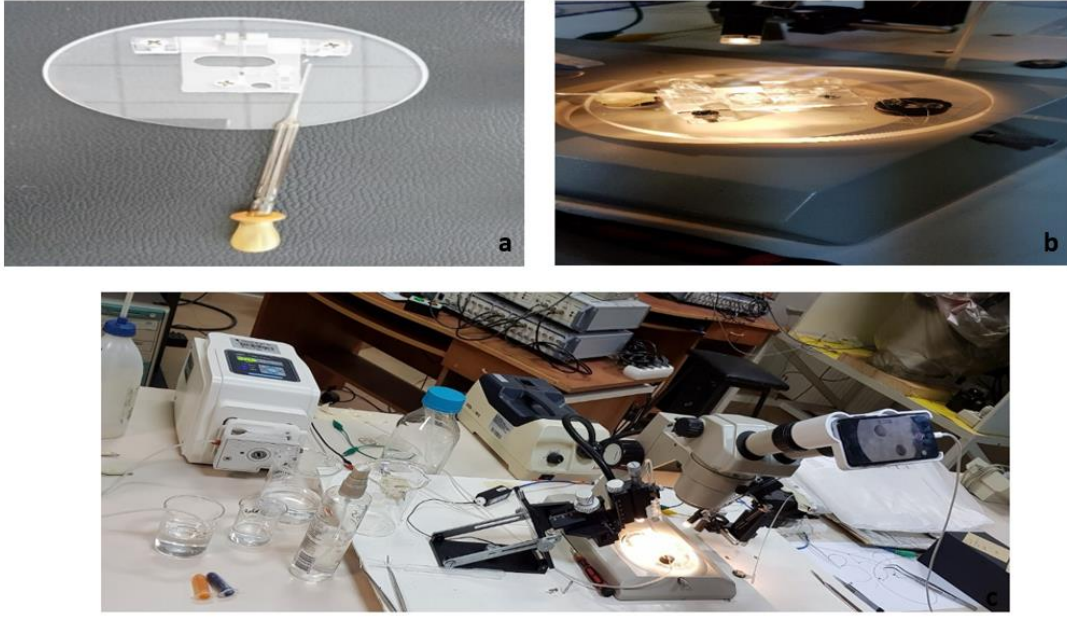
### **Vitellin membranın uzaklaştırılmasında kullanılacak çözeltilerin hazırlanması**

0.05 mg/ml proteaz (Tip-VIII) hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 4-5 dakikalık uygulaması ile vitellin membran ayrılmış, ardından oositler bath (yıkama) çözeltisine transfer edilerek ve enzim aktivitesi durdurulmuştur.

### **Osmotik gradient için hipotonik ve izotonik çözeltilerin hazırlanması**

Osmotik gradient oosit besiyeri olan Barth's çözeltisinin 200 mosmol/kgH<sub>2</sub>O ve 2 mosmol/kgH<sub>2</sub>O değerlerine sahip çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin osmolalite değerlerinin kontrolü osmometre ile gerçekleştirilmiştir.

Su geçirgenlik testi başlatılmadan önce, oositler 15-30 dakika izotonik çözeltide (200 mOsm) bekletilmiş, ardından sisteme hipotonik çözelti (2 mOsm) geçişi sağlanmıştır. Sistem ticari olarak satın alınan bir perfüzyon çemberinin modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur. Sistemin ayrıntıları Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.13. Su geçirgenliği test sisteminin bileşenleri a. Ticari olarak satın alınan perfüzyon çemberi b. Modifiye perfüzyon çemberi c. Sistemin genel görüntüsü.

Yabancı tip ve mutant cRNA'ları içeren oositlerde oluşturulan osmotik gradient yardımı ile hacimsel farklılıkları belirlemek amacıyla 1 dakika video kaydı alınmıştır. Videolardan süre başlangıcı ve süre sonu fotoğraf kareleri ayrılarak, elde edilen görüntüler Image J 1.51p programı ile analiz edilmiştir.

Değişen oosit hacmi çekilen fotoğrafların cross-sectional alanlarından,  $(A/A_0) = V/V_0$  formülü ile hesaplanmıştır. Ardından çıkan fark yabancı tip oosit için % 100 kabul edilerek göreceli değişim hacmi belirlenmiştir.

A : şişme sonrası yüzey alanı

$A_0$ : başlangıç yüzey alanı

V : şişme sonrası hacim

$V_0$ : başlangıç hacim

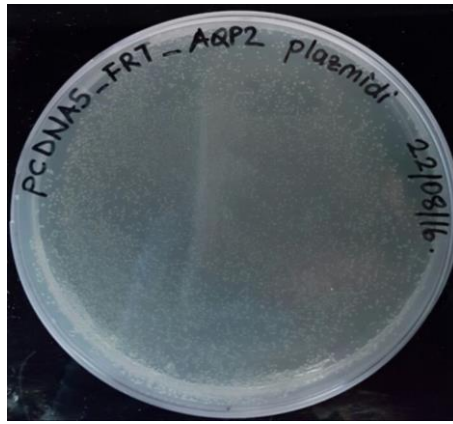


## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılacak Mutant AQP2 İçeren İfade Vektörlerinin Site-Directed Mutagenез Yöntemi ile Hazırlanması

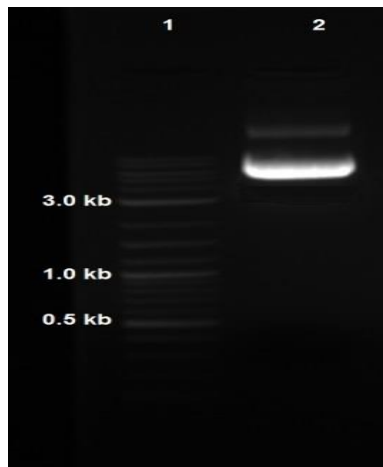
#### 4.1.1. AQP2 Geni Taşıyan İfade Vektörü İzolasyonu

Ticari olarak temin edilen pcDNA5/FRT\_AQP2 plazmidinin retransformasyonu sonucu elde edilen plak görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. pcDNA5/FRT\_AQP2 plazmidinin retransformasyon sonrası plak görüntüsü

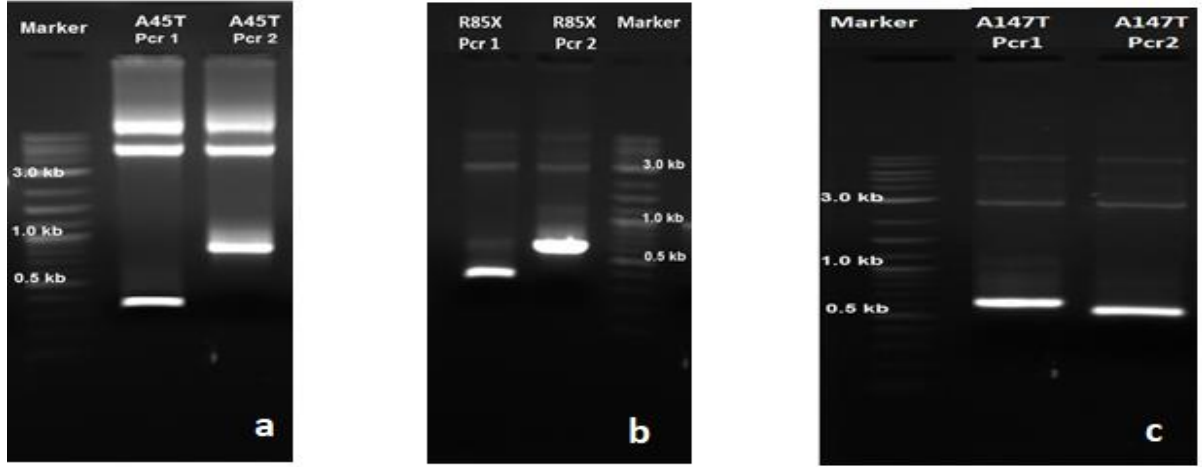
Tek bir koloniden elde edilen bakteri kültüründen izole edilen plazmid DNA'sının agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. pcDNA5/FRT\_AQP2 plazmidinin %1'lik agaroz jel görüntüsü  
[1: marker, 2: pcDNA5/FRT\_AQP2 vektörü (6135 bp)]

#### 4.1.2. Yabancıl *AQP2* cDNA Dizisinde Site-Directed Mutagenез ile Çalışılacak Olan Mutasyonların Oluşturulması, Oluşturulan Dizilerin İfade Vektörlerine Aktarılması ve Doğrulanması

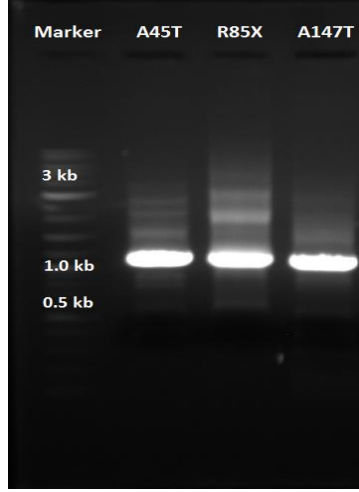
*AQP2* geninde ilgili mutant nükleotidi içeren ve birleştirme reaksiyonunda kullanılacak olan kısa PZR ürünlerinin (PZR ürünü 1 ve PZR ürünü 2) %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. *AQP2* geni A45T, R85X ve A147T mutasyonlarına ilişkin kısa PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde gösterimi

(a. pcDNA5/FRT\_ *AQP2*\_dış forward + A45T R: 314 bp, pcDNA5/FRT\_ *AQP2*\_dış reverse + A45T F: 826 bp; b. pcDNA5/FRT\_ *AQP2*\_dış forward + R85XR: 436 bp, pcDNA5/FRT\_ *AQP2*\_dış reverse + R85X F: 705 bp; c. pcDNA5/FRT\_ *AQP2*\_dış forward + A147T R: 619 bp, pcDNA5/FRT\_ *AQP2*\_dış reverse + A147T F: 520 bp).

İlgili mutant nükleotidi içeren *AQP2* gen bölgesinin tamamını oluşturmak için, her iki PZR ürününün kalıp olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. *AQP2* geni A45T, R85X ve A147T mutantlarına ilişkin fusion PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde gösterimi (PZR ürün boyutu 1140 bp'dir).

Elde edilen mutant *AQP2* dizilerin pcDNA5/FRT\_ *AQP2* vektör içerisine restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak aktarılmasına ilişkin kesim sonuçları Şekil 4.5.'te verilmiştir.

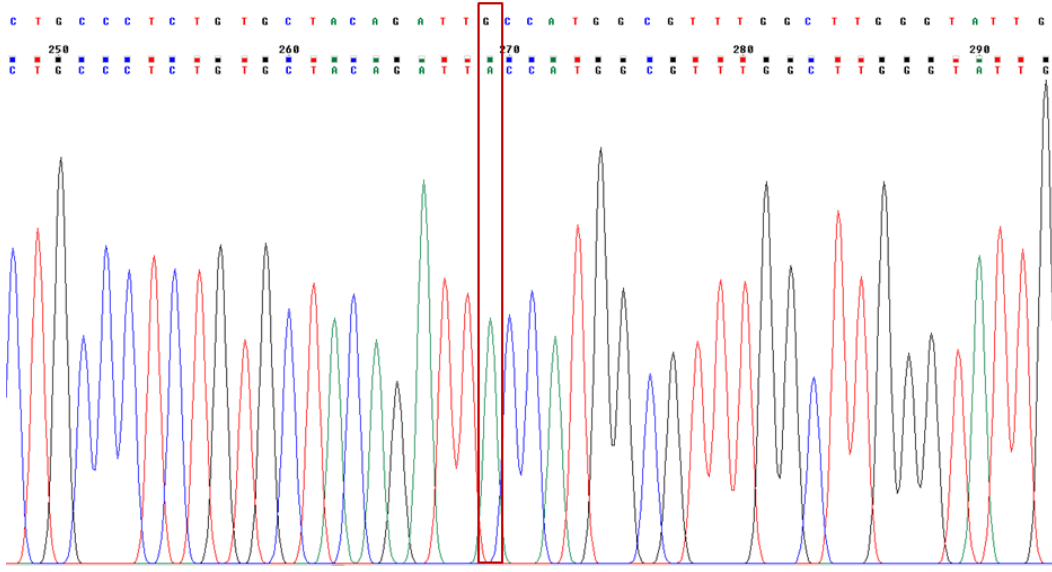


Şekil 4.5. pcDNA5/FRT\_ *AQP2* vektörü ve A45T, R85X ve A147T fusion PZR'larının *XhoI* ve *HindIII* ile kesimleri sonucu agaroz jel görüntüsü

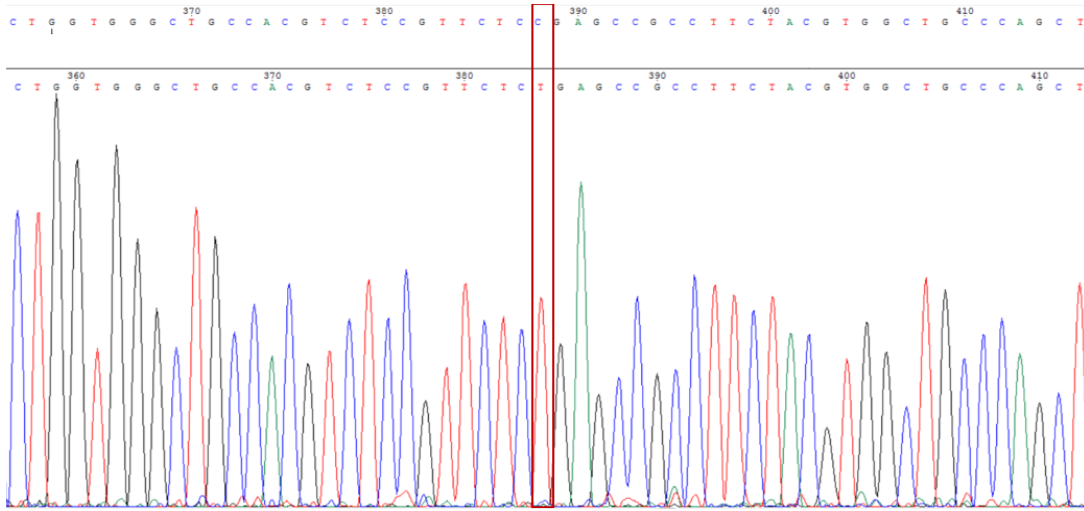
(Kırmızı ok ile gösterilen bantlar jelden pürifiye edilerek ligasyon ile birleştirilmiştir).

*AQP2* gen dizisinde A45T, R85X ve A147T mutasyonlarını içeren plazmid DNA'larının sekanslanması ile elde edilen kromatogram görüntüleri Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

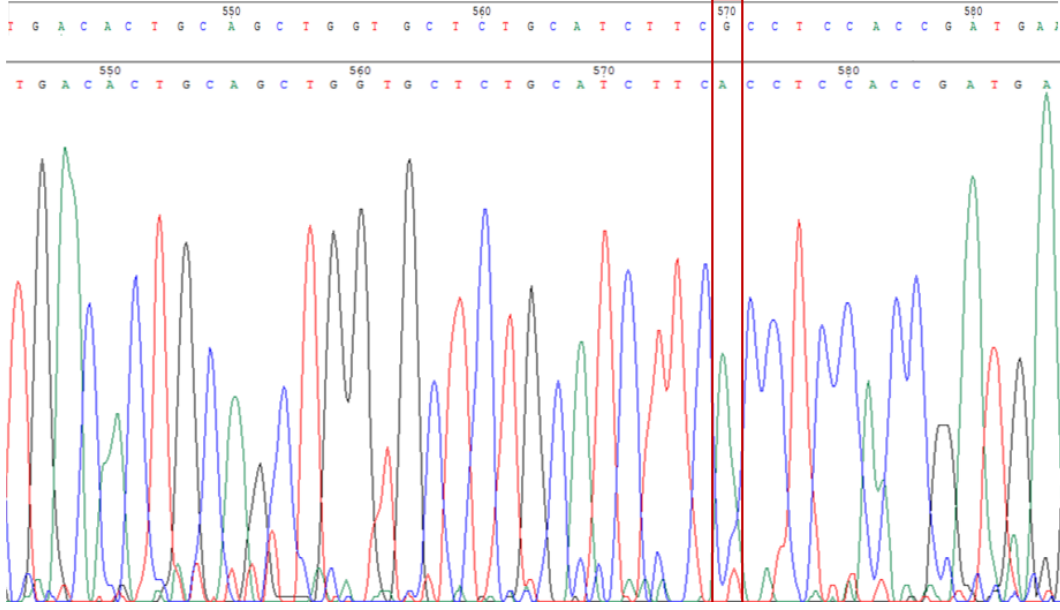




Şekil 4.6. A45T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü (üst dizi. yabancı tip AQP2 dizisi, alt kromatogram. A45T mutasyonunu içeren AQP2 dizisindeki GCC---ACC dönüşümü)



Şekil 4.7. R85X mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü (üst dizi. yabancı tip AQP2 dizisi, alt kromatogram. R85X mutasyonunu içeren AQP2 dizisindeki CGA---TGA dönüşümü)

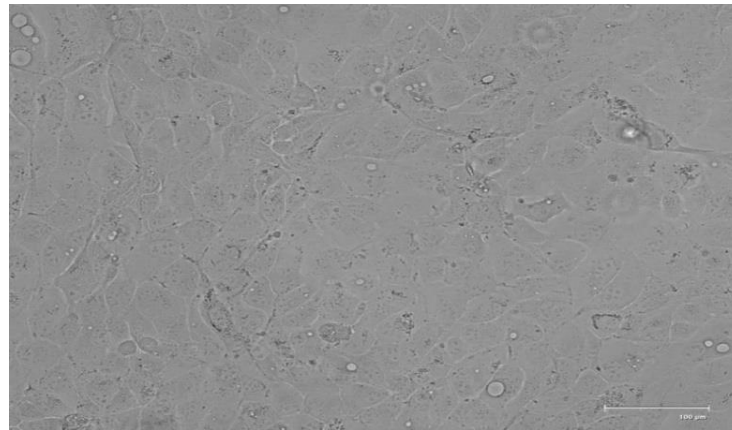


Şekil 4.8. A147T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü (üst dizi yabancı tip AQP2 dizisi, alt kromatogram. A147T mutasyonunu içeren AQP2 dizisindeki GCC--ACC dönüşümü)

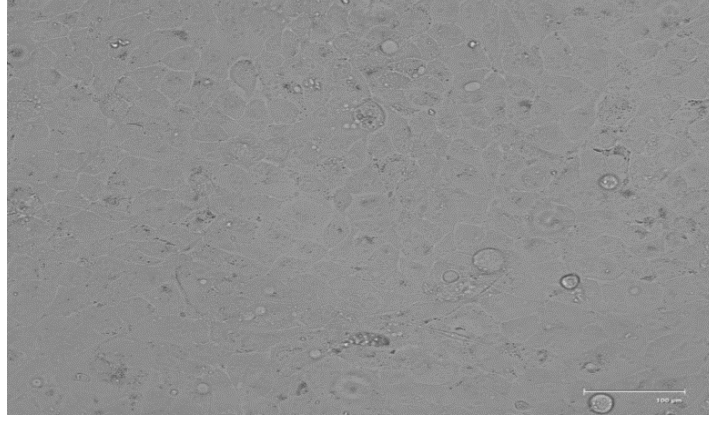
## 4.2. MDCK Hücre Hattı ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar

### 4.2.1. Stabil Transfeksiyon Protokolü Uygulanarak Elde Edilen Hücre Hatlarına İlişkin Görüntüler

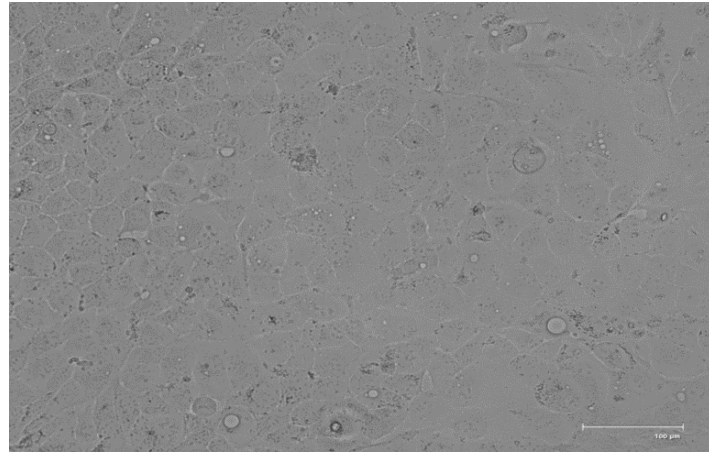
İlgili görüntüler Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.



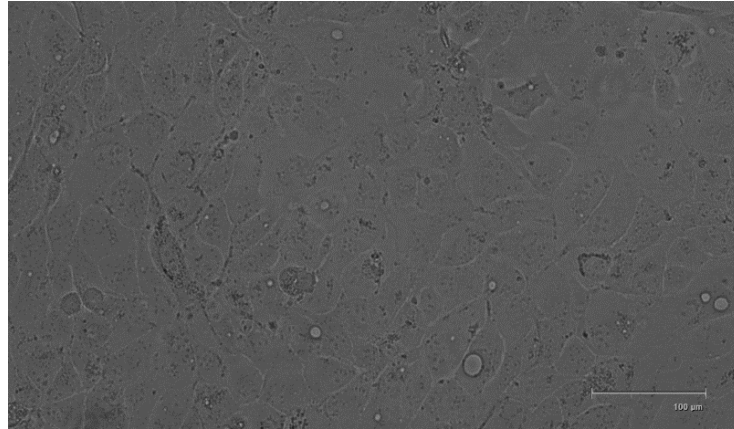
Şekil 4.9. pcDNA5/FRT\_AQP2-WT plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü (Ölçek çubuğu:100 µm)



Şekil 4.10. pcDNA5/FRT\_AQP2-A45T plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü (Ölçek çubuğu:100 µm)



Şekil 4.11. pcDNA5/FRT\_AQP2-R85X plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü (Ölçek çubuğu:100 µm)



Şekil 4.12. pcDNA5/FRT\_AQP2-A147T plazmidi ile ko-transfekte edilen MDCK hücrelerinin konfluent görüntüsü (Ölçek çubuğu:100 µm)

#### **4.2.2. Yabanıl ve mutant AQP2 protein ifadelerinin, stabil MDCK hücre hattı ve *Xenopus laevis* ifade sisteminde immünblot analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde ön bilgi**

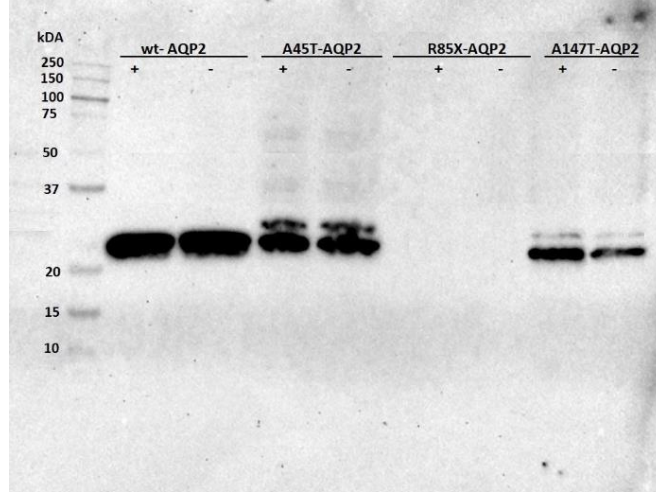
Literatür bilgileri, diğer glikozile membran proteinleri gibi AQP2 proteininin de ER'de sentez edilerek katlanma geçirdiğini ve bu lokalizasyonda homotetramer hale getirildiğini işaret etmektedir. Ek olarak, bu organelde, yüksek mannozlu şeker grupları, AQP2'nin bir N-glikozilasyon konsensüs sitesi olan Asn123'üne bağlanır. Plazma membranına ilerlerken, yüksek mannozlu şeker grupları Golgi kompleksinde çıkarılır, daha sonra bu AQP2 molekülleri kompleks glikozile edilir. Diğer AQP'lere benzer şekilde, fakat çoğu glikozile proteinin aksine, bir AQP2 tetrameri içinde sadece bir veya iki monomer glikozile edilir. Kompleks glikozile AQP2 moleküler ağırlığı 40 ila 45 kDA arasındadır; bu AQP2 formları bu nedenle sadece yüksek miktarlarda yükleme yapıldığında immünblotlarda tespit edilir [7, 8, 14].

ER'de uygun şekilde katlanmayan proteinlerin, moleküler şaperonlar olarak adlandırılan ER katlanma proteinleri ile olan uzamış etkileşim sürelerine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde, yanlış katlanmış AQP2 mutantları, wt-AQP2 için karakterize deglikozile edilmiş 29-kDA formuna ek olarak, immünblot üzerinde 32 kDA'lık yüksek mannozlu glikozile proteinler şeklinde tespit edilmektedir [7, 8, 14].

Mutant proteinlere dair elde edilen paternler bu bilgiler ışığında değerlendirilmiştir.

#### **4.2.3. Forskolin Uygulaması Sonuçları**

Forskolin uygulaması ardından elde edilen immünblot analizleri sonucunda yabanıl tip (wt)-AQP2, A45T-AQP2 ve A147T-AQP2 mutant proteinlerinin monomerik halde bulunan yaklaşık 29 kDA ağırlığında olan (glikolize olmayan form) bant paternine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca A45T-AQP2 mutant proteininin karakteristik 32 kDA bandı (yüksek mannoz taşıyan form) taşıdığı gösterilmiştir. R85X-AQP2 mutant proteini yaklaşık 9 kDA ağırlığa sahiptir, ilgili protein jelde tespit edilememiştir. Forskolin uygulaması immünblot analiz sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Forskolin uygulaması immünblot analiz sonuçları, (+) forskolin uygulaması yapılan hücrelerin protein lizatlarının yükleme alanlarını, (-) uygulama yapılmamış hücrelerin protein lizatlarının yükleme alanlarını göstermektedir.

#### 4.2.3.1. Forskolin Uygulama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

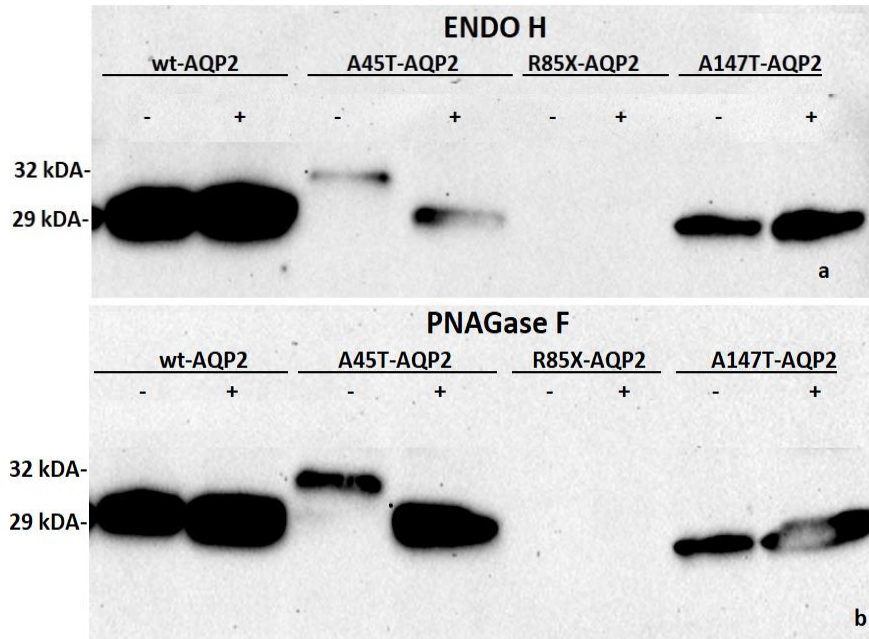
AQP2 proteininin hazır durumda bulunduğu hücre içi veziküllerden apikal membrana taşınması için Ser256 fosforilasyonu gereklidir [47]. Forskolin, fosforilasyon mekanizmasını tetikleyecek yolda aktivatör olarak işlev görmektedir [15]. Yapılan çalışmada forskolin uygulanan ve uygulama yapılmayan (kontrol) gruplarında protein ifade paternleri açısından değişiklik görülmemiştir, forskolinin aktivasyon mekanizması ve hücrelerden total protein izolasyonu gerçekleştirildiği göz önüne alındığında farklılık bulunmaması normaldir.

Uygulama sonrasında elde edilen protein lizatları kullanılarak gerçekleştirilen immünblot analizlerinde, stabil transfekte mutant A45T-AQP2-MDCK hücrelerinin yabancı tipten farklı ekspresyon paterni gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Bu mutant için tespit edilen 32 kDa karakterize bant, mutant proteinin ER'de tutuklandığını işaret etmektedir. Mutant A147T-AQP2-MDCK hücrelerinin immünblot analizinde görülen 29 kDa'luk bant, literatürde mutasyona ilişkin gerçekleştirilen çalışmaları destekler şekilde [13, 105], mutant proteinin yabancı tipe benzer ekspresyona sahip olduğunu göstermiştir. R85X-AQP2-MDCK hücrelerinin taşıdığı mutasyon 85. kodonda yer alan bir stop mutasyondur ve oluşan protein yaklaşık olarak 9 kDa ağırlığa sahip olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerden elde edilen lizatlarda mutant AQP2 protein ifadesinin, proteinin düşük moleküler ağırlığı

ya da antikorun bağlanma etkinliğinin farklılığı nedeniyle tespit edilemediği düşünülmüştür.

#### 4.2.4. Deglikozilasyon Deney Sonuçları

Mutant proteinlerin hücre içi olgunlaşma sürecinin karakterizasyonunu belirlemek için proteinler, Endo H ve PNGase F enzimleri ile kesime uğratılmış ve kesim gerçekleştirilmeyen kontrol örnekleri ile birlikte immünblot analizi uygulanmıştır. Analize ilişkin jel görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir. A45T-AQP2 mutant protein bandının her iki enzim muamelesiyle proteinin glikolize (yüksek mannoz) formundan (32 kDA), glikolize olmayan (29 kDA) form hizasına geldiği görülmektedir. Glikozilasyon içermediği düşünülen wt-AQP2 ve A147T-AQP2 mutant proteinin ise herhangi bir değişim göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.14. a. Endo H deneyi immünblot analiz sonuçları, (-) Endo H uygulaması yapılmamış kontrol proteinlerini, (+) Endo H uygulaması yapılmış proteinleri göstermektedir. b. PNGase F deneyi immünblot analiz sonuçları, (-) PNGase F uygulaması yapılmamış kontrol proteinlerini, (+) PNGase F uygulaması yapılmış proteinleri göstermektedir.

##### 4.2.4.1. Deglikozilasyon Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

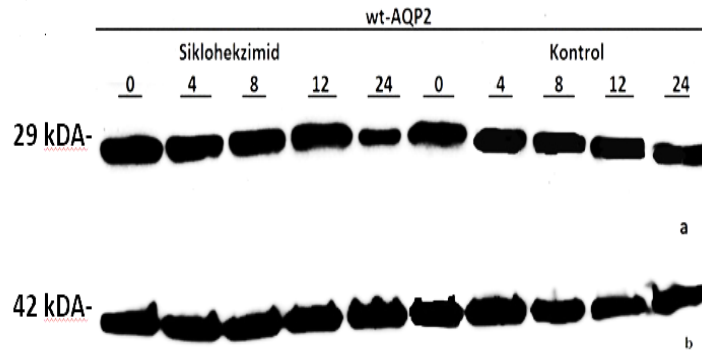
Çalışmamızda, stabil yabanıl tip ve mutant MDCK hücre hatlarından elde edilen protein lizatları ile Endo H ve PNGase F enzimleri kullanılarak deglikozilasyon

deneyleri yapılmıştır. Kullanılan enzimlerden, Endo H yüksek mannoz (ve N-bağlı glikoproteinlerin bazı hibrit oligosakkaritleri) gruplarına ayırım yaparken, PNGase F, asparajine bağlı N-glikanların tamamını ayırmaktadır [7].

İmmunblot sonuçlarında, wt-AQP2 ve A147T-AQP2 için uygulama öncesi ve sonrası bant paterninin değişmeyerek 29 kDA'da kaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.14.a, Şekil 4.14.b). Mutant A45T-AQP2 proteininin bant paterni ise, Endo H ve PNGase F uygulaması sonrası 32 kDA'dan 29 kDA'ya inerek değişiklik göstermiştir. Elde edilen sonuçlar A45T-AQP2 mutant proteininin ER'de tutuklanma süreci geçirdiğini desteklemektedir. Yüksek mannozlu şeker kısımlarını spesifik olarak ortadan kaldıran Endo H ya da PNGase F ile ayırım için 32 kDA bantların hassasiyeti, bu AQP2 formlarının ER-tutuklu proteinler olduğunu kuvvetli bir şekilde göstermektedir [9]. Aksine, hücrelerde wt-AQP2 için olduğu gibi düzgün bir şekilde işlenen proteinler söz konusu olduğunda, ER'de alıkonma süresi çok kısadır ve bu nedenle, immünblot analizlerinde 29 kDA bandı tespit edilir [7].

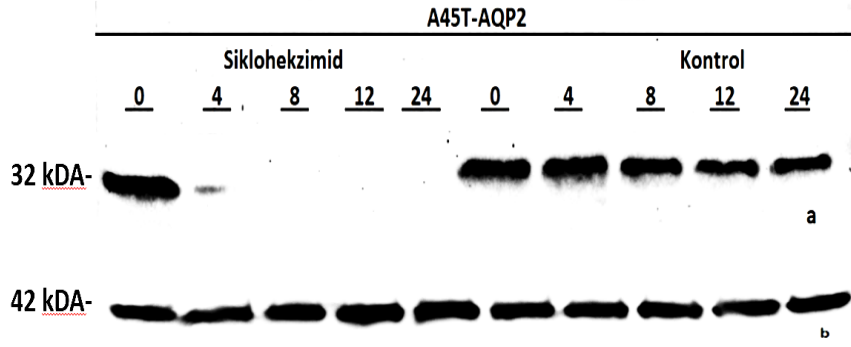
#### 4.2.5. Sikloheksimid Analizi Sonuçları

Sikloheksimid uygulaması yapılan hücreler ve kontrol grubu hücrelerden elde edilen protein lizatlarından yapılan immünblot analizleri (aktin kontrolleri ile birlikte) Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. A45T-AQP2 ( $1.18 \pm 0.034$  saat) ve A147T-AQP2 ( $3.43 \pm 0.8$  saat) mutant proteinlerin yarı ömürlerinin wt-AQP2'ye ( $4.37 \pm 0.64$  saat) kıyasla önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.18).

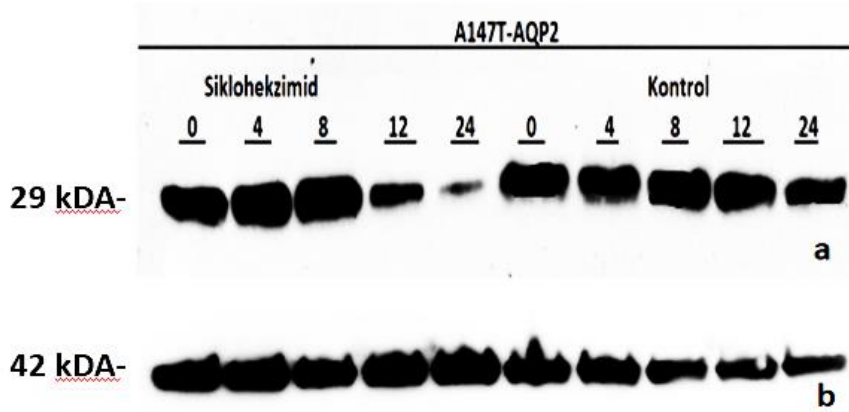


Şekil 4.15. a. Yabani tip (wt)-hücrelerde sikloheksimid uygulamasına bağlı AQP2 proteini ifadesindeki değişim b. Aktin ifade kontrol jeli

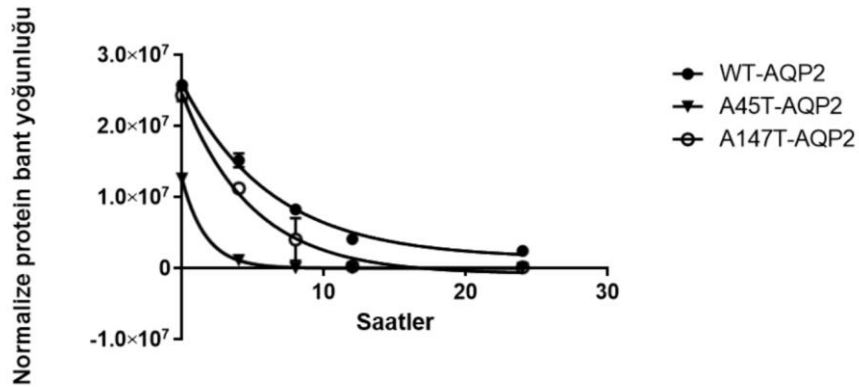




Şekil 4.16. a. Mutant A45T-hücrelerinde sikloheksimid uygulamasına bağlı AQP2 proteini ifadesindeki değişim b. Aktin ifade kontrol jeli



Şekil 4.17. a. Mutant A147T-hücrelerinde sikloheksimid uygulamasına bağlı AQP2 proteini ifadesindeki değişim b. Aktin ifade kontrol jeli



Şekil 4.18. Stabil tranfekte MDCK hücrelerine sikloheksimid uygulaması sonrası wt-AQP2 ve A45T-AQP2, A147T-AQP2 mutant protein yarı ömürlerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi



#### 4.2.5.1. Sikloheksimid Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

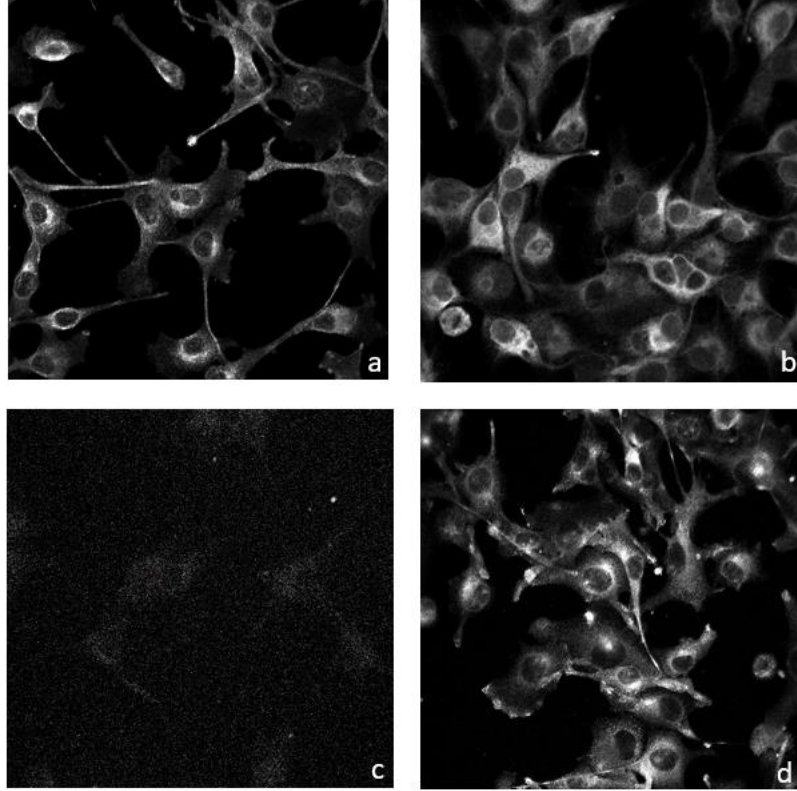
ER'nin kalite kontrolü, yanlış katlanmış proteinlerde molekülün yüzeyinde açıkta kalan hidrofobik peptit elemanları gibi bazı konformasyonel özelliklerini tanır ve çoğu durumda bu proteinler hızla bozulmaya uğrar, nitekim oosit ifade sisteminde gerçekleştirilen bazı çalışmalarda mutant AQP2 proteinlerinin daha az kararlılığa (indirgenmiş yarı ömre) sahip olduğu gösterilmiştir [9, 105].

Tez çalışması kapsamında wt-AQP2 proteininin yarı ömrü  $4.37 \pm 0.64$  saat olarak belirlenmiştir. A45T-AQP2 ve A147T-AQP2 mutant proteinlerinin, wt-AQP2 proteinine göre indirgenmiş yarı ömre sahip olduğu bulunmuştur. A45T-AQP2 proteininin wt-AQP2'ye göre yarı ömründeki azalma, A147T-AQP2'ye göre daha fazladır. A45T-AQP2 proteininin ( $1.18 \pm 0.034$  saat) yarılanma ömrü ile oldukça düşük stabiliteye sahip olduğu gösterilmiştir. Mutant A147T-AQP2 için elde edilen sonuç ise ( $3.43 \pm 0.8$  saat), daha önce oosit ifade sisteminde gerçekleştirilen bir çalışmada tespit edilen, stabilitede wt-AQP2'ye göre %10 azalma şeklindeki veriyi desteklemektedir [105]. Bu mutasyon için bir diğer çalışma CHO hücreleri ile geçici transfeksiyon gerçekleştirilerek yapılmış ve mutant proteinin yarı ömrünün yabancı tipe oranla %50 azaldığı gösterilmiştir [13].

Bu konuda bir diğer yaklaşım, süreci, mutasyonların protein üzerinde yerleşim gösterdiği noktalar ile ilişkilendirmiştir [105]. Buna göre A45T ve A147T mutasyonları transmembran domenynde yer almaktadır ve yanlış katlanmanın hidrofobik bölgeleri açığa çıkararak, mutant proteinleri, ER'de yer alan proteazlara açık hale getirdiği düşünülmüştür. Nitekim AQP2 proteinin hidrofilik ektramembran ilmeklerinde yer alan (G64R, N68S, T126M ve R187C) mutantlarının oosit ifade sisteminde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları, bu mutant proteinlerin stabilizasyonunda değişiklik olmadığını göstermiştir [13, 105].

#### 4.2.6. Yabancı ve Mutant Tip Hücrelerde İmmünsitokimyasal Analiz Sonuçları

Yabancı ve mutant tip stabil transfekte hücrelerin immünsitokimyasal analizlerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Yabanıl ve mutant tip *AQP2* ekspresyonu gösteren stabil MDCK hücre hatlarının *AQP2* işaretli konfokal mikroskop görüntüleri a. Yabanıl tip, b. A45T, c. R85X, d. A147T.

#### 4.2.6.1. Yabanıl ve Mutant Tip Hücrelerde İmmünsitokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

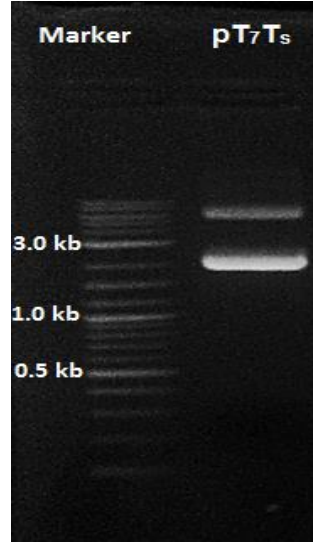
Literatürde yer alan bilgiler, wt-AQP2 proteininin ağırlıklı olarak hücre içi kompartmanlarda yer aldığına işaret etmiştir. Nitekim çalışmamızda wt-AQP2 proteininin stabil transfekte hücre hatlarında immün işaretli AQP2'nin konfokal mikroskopi analizi, wt-AQP2 için hücre içi kompartmanlarda bir nokta şeklinde belirgin bir patern ortaya çıkarırken, A45T mutant hücrelerinde hücre içinde daha dağınık bir işaretlenme gözlenmiştir. A147T hücrelerinde işaretlenme paterninin ise yabanıl tipe benzer şekilde belirgin nokta görünümünde olduğu belirlenmiştir. R85X mutant hücrelerinde ise spesifik işaretlenme görülmemiştir (Şekil 4.19). İmmünsitokimyasal analiz sonuçları, mutant proteinlerin hücre içi trafiğindeki farklılaşmaya işaret etmiştir.

#### 4.3. *Xenopus laevis* Oosit İfade Sistemi Çalışmalarında Kullanılacak Olan Yabancıl Tip ve Mutant pT7TS-AQP2 Vektörlerinin Hazırlanmasına İlişkin Sonuçlar

Ticari olarak temin edilen pT7TS plazmidinin retransformasyonu sonucu elde edilen plak görüntüsü Şekil 4.20'de verilmiştir. Tek bir koloniden elde edilen bakteri kültüründen izole edilen pT7TS plazmid DNA'sının agaroz jel görüntüsü Şekil 4.21'de verilmiştir.

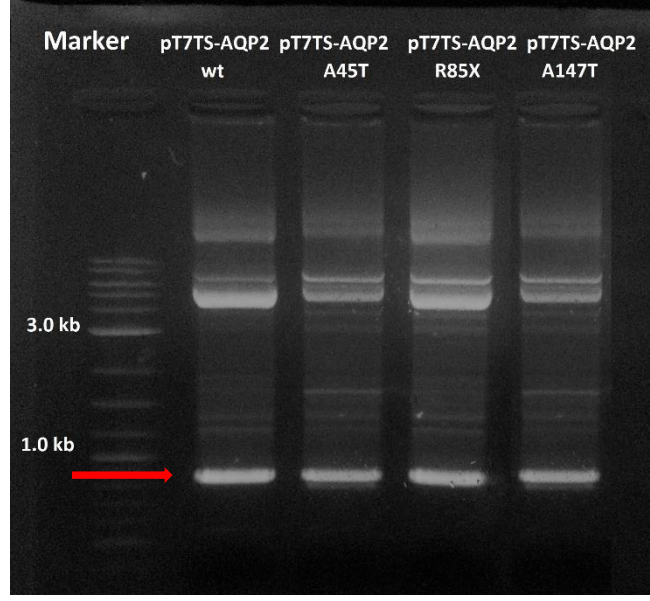


Şekil 4.20. pT7TS plazmidinin retransformasyon plak görüntüsü



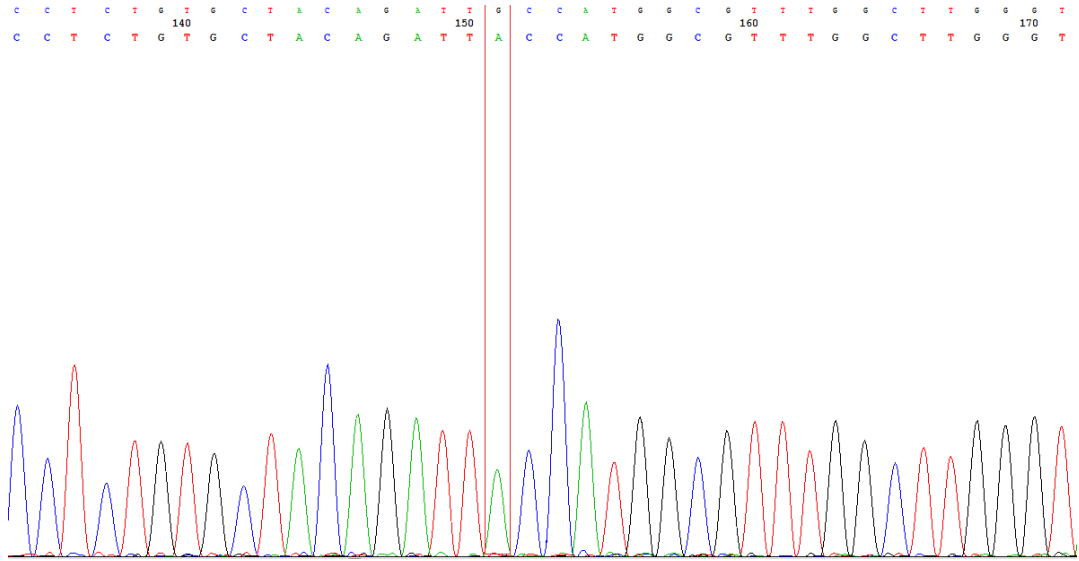
Şekil 4.21. pT7TS plazmidinin %1'lik agaroz jelde gösterimi (Backbone yaklaşık 3000 bp)

Subcloning için gerçekleştiren PZR sonuçları Şekil 4.22'de verilmiştir.

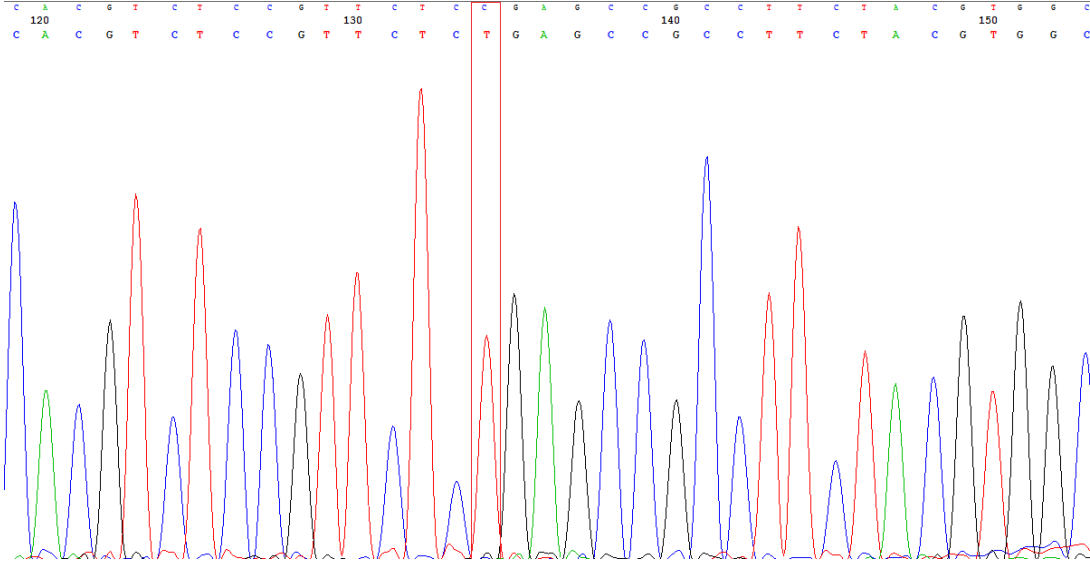


Şekil 4.22. *Bgl*III ve *Spe*I ile çoğaltılan amplifikasyon görüntüleri (Ok işareti: 844 bç'lik amplifikasyonları işaret etmektedir)

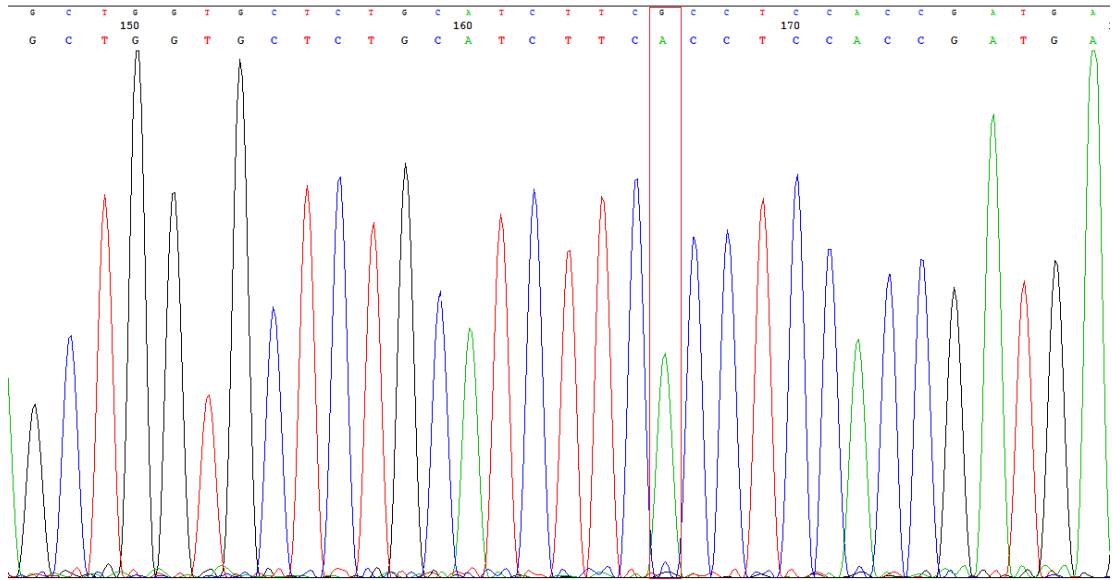
Subcloning sonrası elde edilen pT7TS-A45T, pT7TS-R85X ve pT7TS-A147T vektörlerinin sekans görüntüleri Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.23. A45T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü (üst dizi. yabancı tip AQP2 dizisi, alt kromatogram. A45T mutasyonunu içeren AQP2 dizisindeki GCC---ACC dönüşümü)



Şekil 4.24. R85X mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü (üst dizi. yabancı tip AQP2 dizisi, alt kromatogram. R85X mutasyonunu içeren AQP2 dizisindeki CGA---TGA dönüşümü)



Şekil 4.25. A147T mutasyon örneğinin kromatogram görüntüsü (üst dizi yabancı tip AQP2 dizisi, alt kromatogram. A147T mutasyonunu içeren AQP2 dizisindeki GCC---ACC dönüşümü)

#### 4.4. *Xenopus laevis* Oositlerine İnjesiyonu Gerçekleştirilecek Yabancı Tip ve Mutant cRNA'ların *in vitro* Eldesi için Yapılan Çalışma Sonuçları

##### 4.4.1. Yabancı ve Mutant Tip Oosit İfade Vektörlerinin Linearizasyon Sonuçları

Yabancı tip ve mutant AQP2 dizilerini içeren pT7TS plazmidinin *Sall* enzimi ile linearize edilmesi ile elde edilen kalıpların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Yabancı ve mutant tip vektörlerin linearizasyon sonuçları

Elde edilen lineer vektör kalıplarının saflık ve miktar derecelerinin spektrofotometrik olarak ölçümleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

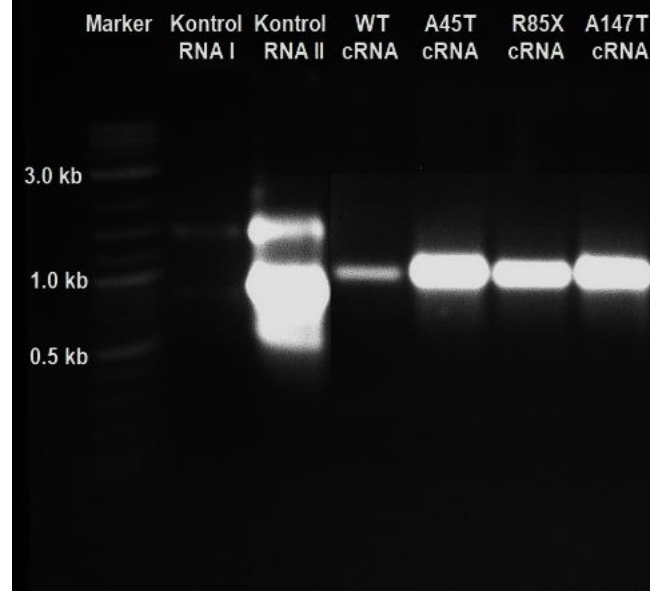
Çizelge 4.1. Yabancı ve mutant tip vektörlerin linearizasyon pürifikasyonuna ait sonuçlar

Lineer vektör kalıpları	A260/A280 oranı	Final konsantrasyon (ng/μl)
pT7TS-AQP2	1.80	187,34
pT7TS-AQP2-A45T	1.73	144,10
pT7TS-AQP2-R85X	1.77	505,1
pT7TS-AQP2-A147T	1.78	513,7

##### 4.4.2. Yabancı ve Mutant Tip cRNA'ların Eldesi/Ekstraksiyonu

Yabancı tip ve mutant AQP2 dizilerini içeren pT7TS plazmidinin *Sall* enzimi ile linearize edilmesi ile elde edilen kalıplar kullanılarak mMessage mMachine T7 kit

(Ambion, Austin Tx) ile elde edilen cRNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Yabanıl ve mutant tip cRNA örneklerinin %1'lik agaroz jelde görüntüsü (Kontrol cRNA; 1.8 kb transkript boyutuna sahiptir. wt cRNA; 1/10 oranında dilüedir)

Çizelge 4.2. Yabanıl ve mutant tip cRNA örneklerine ait sonuçlar

cRNA örnekleri	A260/A280 oranı	Final konsantrasyon (ng/µl)
pT7TS-AQP2	2,04	1352,12
pT7TS-AQP2-A45T	2,05	1303,33
pT7TS-AQP2-R85X	2,04	842,00
pT7TS-AQP2-A147T	2,09	1508,52
Kontrol	2,17	1224,17

#### 4.4.3. İmmunblot Analiz Sonuçları/*Xenopus laevis* Oositlerinden Total ve Plazma Membranlarının İzole Edilerek, Yabanıl ve Mutant Protein Miktarlarının Karşılaştırılmasına İlişkin Veriler

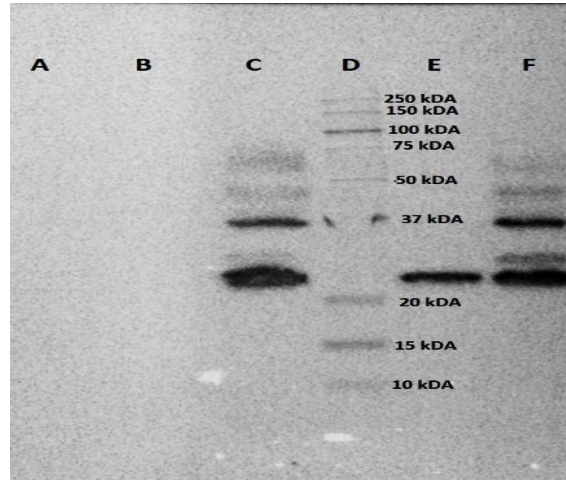
Yabanıl tip ve mutant cRNA'ların injekte edildiği oositlerden total ve plazma membran izolasyonu gerçekleştirilerek elde edilen lizatların immünblot analizine ilişkin sonuçlar Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da verilmiştir.

Total membran izolasyonu sonucu elde edilen lizatların immünblot jelinde, wt-AQP2, A45T-AQP2 ve A147T-AQP2 mutant proteinlerinin monomerik halde

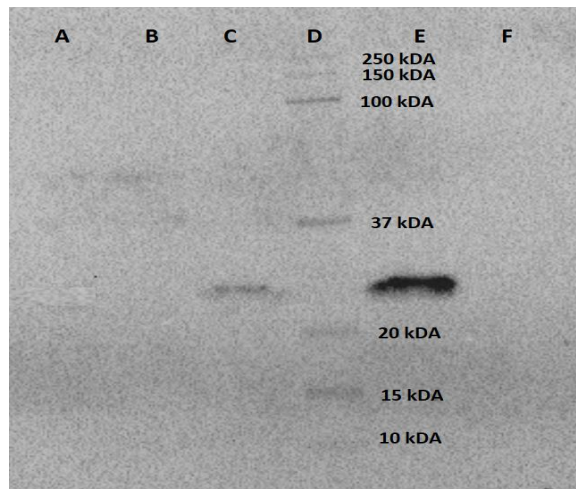


bulunan yaklaşık 29 kDA ağırlığında olan (glikolize olmayan form) bant paterni gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca A45T-AQP2 mutant proteininin karakteristik 32 kDA bandı (yüksek mannoz taşıyan formu) taşıdığı gösterilmiştir. R85X-AQP2 mutant proteini yaklaşık 9 kDA ağırlığa sahiptir, ilgili protein jelde tespit edilememiştir.

Plazma membran izolasyonu sonucu elde edilen lizatların immünblot jelinde, yalnızca wt-AQP2 ve A147T-AQP2 mutant proteinlerinin monomerik halde bulunan yaklaşık 29 kDA ağırlığında olan (glikolize olmayan form) bant paterni gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.28. Total membran izolasyonu immünblot analiz sonuçları (A: Kontrol, B: R85X, C: A147T, D: Marker, E: Yabanıl tip (wt), F: A45T)



Şekil 4.29. Plazma membran izolasyonu immünblot analiz sonuçları (A: Kontrol, B: R85X, C: A147T, D: Marker, E: Yabanıl tip (wt), F: A45T).



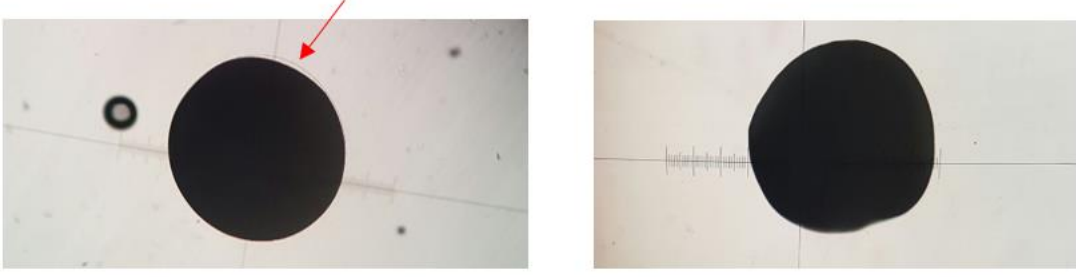
#### **4.4.3.1. *Xenopus laevis* Oosit İfade Sistemi İmmunblot Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

*X. laevis* oosit ifade sisteminde gerçekleştirilen immünblot analizlerinde hücre kültür sisteminde elde edilen sonuçlara benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 4.27, Şekil 4.28). wt-AQP2 ve mutant AQP2 proteinlerinin oosit total membranlarındaki ifadesi değerlendirildiğinde, mutant A45T-AQP2 proteinin, yabancı tip proteinde yer alan, 29 kDA'luk glikolize olmayan AQP2 bandının yanı sıra, ER'de tutuklanma ile karakterize 32 kDA'luk banda sahip olduğu, mutant A147T-AQP2 proteininin ise önceki çalışmalara benzer şekilde [13, 105] yabancı tip paterni gösterdiği görülmüştür. R85X-AQP2 proteininin ifadesinin, yukarıda öngörülen nedenler doğrultusunda oosit total membranında da tespit edilemediği düşünülmüştür.

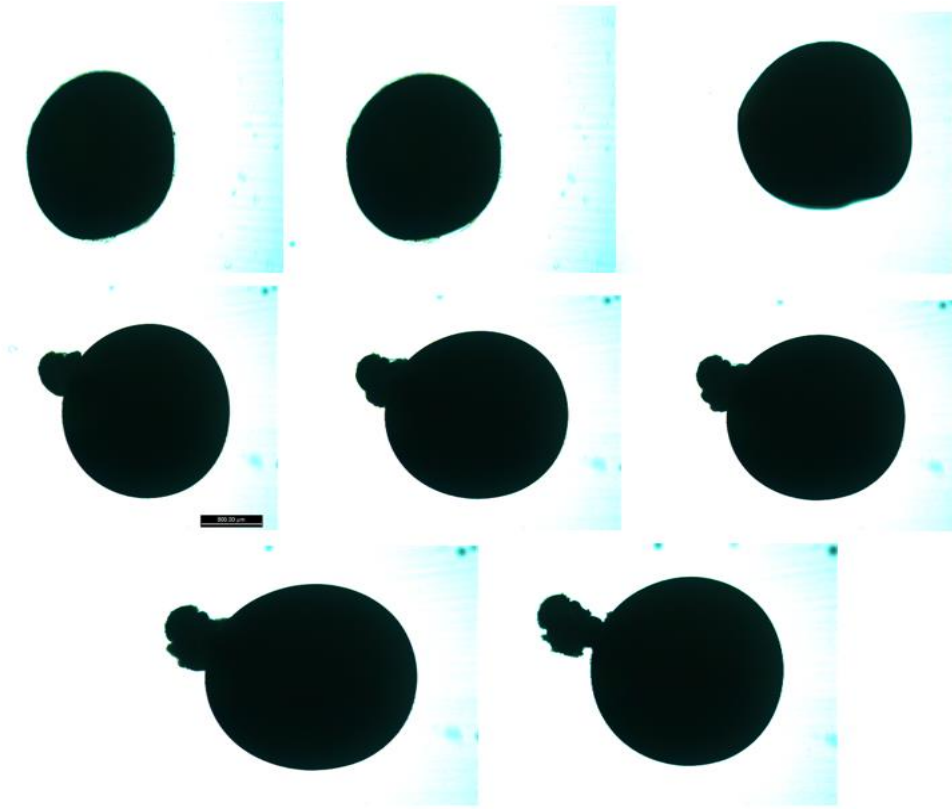
Oosit ifade sisteminde, plazma membran izolasyonu, mutant proteinlerin membrana hedeflenme/ulaşma süreçlerinin belirlenmesi için gerçekleştirilmektedir. Yapılan analizlerde 29 kDA bant ifadesi, wt-AQP2 proteinin yanı sıra, A147T mutantında da tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Bu bant, jelle yüklenen toplam protein miktarı (40 oositten elde edilmiştir) aynı olmasına rağmen, yabancı tipe oranla oldukça siliktir; ancak bu mutant proteininin plazma membranına kısmen ulaştığını göstermektedir. A45T mutasyonunu taşıyan protein için 29 kDA bant immünblot sisteminde yer almamaktadır, bu durum mutant A45T-AQP2 proteinin plazma membranına ulaşamadığını göstermektedir. R85X-AQP2 proteininin ifadesi tespit edilememiştir; ancak zaten mutasyonun proteinde oluşturduğu domeyn kayıpları, plazma membranına ulaşamayacağını öngörmektedir.

#### **4.4.4. Su Geçirgenlik Testine İlişkin Sonuçlar**

Oositlerde su geçirgenlik testinin gerçekleştirilmesi için vitellin membranın uzaklaştırılmış olması önemli bir basamaktır. Hazırlanan 0.05 mg/ml proteaz çözeltisi uygulaması ile vitellin membranın uzaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.30). Ardından ozmotik indüklenme sağlanarak 1 dakika süre ile video kaydı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.31).

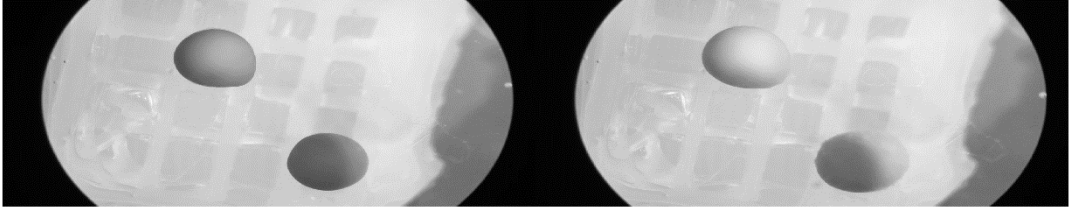


Şekil 4.30. Proteaz uygulama öncesi ve sonrası oosit fotoğrafları (Ok; vitellin membranı işaret etmektedir)

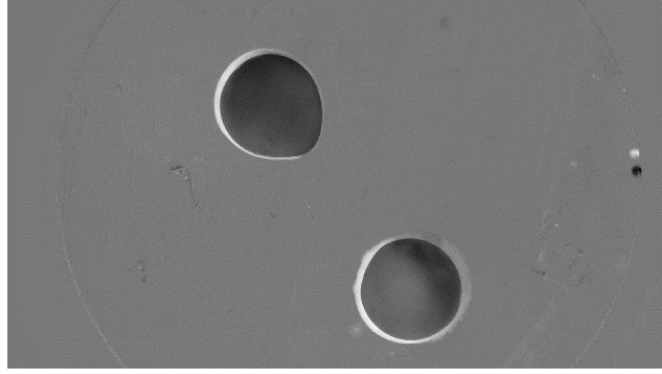


Şekil 4.31. Su geçirgenlik testi uygulanan oositin 1 dakika içerisinde çekilmiş fotoğrafları

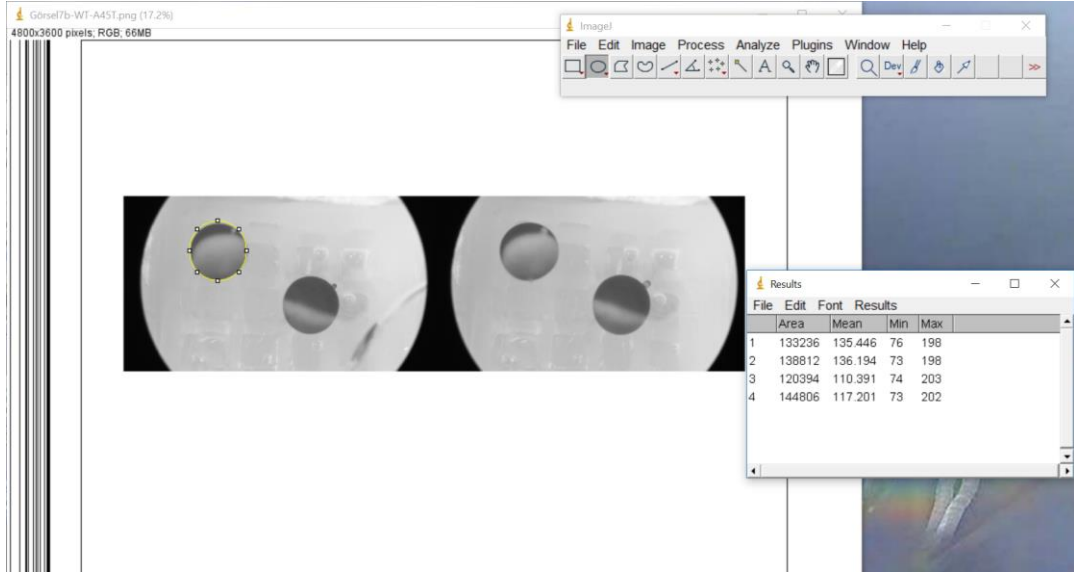
Image J analizi için video görüntüleri sürelerle bağlı olarak ayrılmış ve analize hazırlanmıştır. Analizde kullanılan görüntülere ilişkin örnekler ve program ara yüzü Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.32. Su geçirgenlik testi uygulanan iki oositin 0. ve 60.sn'deki fotoğrafları



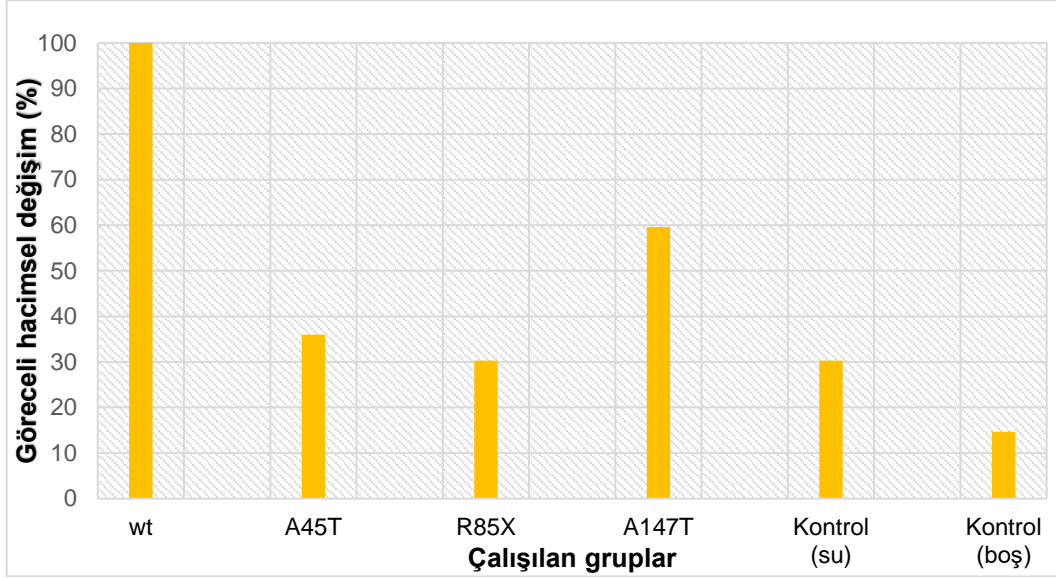
Şekil 4.33. 4.31'de yer alan görüntülerin çakıştırılmış hali, beyaz dairesel hat hacimsel büyümeye işaret etmektedir



Şekil 4.34. Fotoğrafların Image J programı ile analizine ilişkin ara yüz

Buna göre; çalışmamızda yabancı ve mutant cRNA'ların injekte edildiği oositlere, 24 saat sonra su geçirgenliği testi uygulanmıştır. Oluşturulan osmotik gradient ile oositlerin başlangıç ve 1 dakikalık süre sonundaki hacimsel farklılıkları belirlenmiş, wt-cRNA injekte edilen oositler için değişim %100 kabul edilerek belirtilen süre sonunda oositlerin göreceli hacimsel değişiklikleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre

göreceli hacimsel değişiklik A45T-AQP2 injekte oositler için %36, R85X-AQP2 injekte oositler için %30.25 ve A147T-AQP2 injekte oositler için %59.6'dır. Su injekte kontrol oositleri için göreceli hacim değişiklik değeri %30.3 iken, injekte edilmemiş oositler için değer %14.7 olarak belirlenmiştir. Göreceli hacim değişimi hesaplamasına ilişkin sonuçlar Şekil 4.35'te belirtilmiştir.



Şekil 4.35. *Xenopus* oositlerinde yabancı tip ve mutant AQP2 proteinlerinin göreceli su geçirgenliği

#### 4.4.4.1. Su Geçirgenlik Testine İlişkin Sonuçların Değerlendirilmesi

NDI'ye yol açan mutasyonların mekanizmaların araştırılmasında *X. laevis* oosit sisteminde su geçirgenlik testi sıklıkla kullanılmaktadır [134].

*Xenopus* oositi,  $5 \times 10^4$  somatik hücreye karşılık gelecek büyük bir translasyon kapasitesine sahiptir; bu nedenle, heterolog gen anlatımı ile ilgilenilen proteinin yüksek ekspresyon seviyeleri elde edilebilir. Memeli hücrelerinde geçici olarak eksprese edilen proteinler için iyi karakterize edildiği gibi, yüksek ekspresyon seviyeleri, proteinin sadece düşük seviyelerde eksprese edildiğinde lokalize olduğu organelde bir "depolama doygunluğuna" yol açar, bu da diğer organellerde proteinin ortaya çıkmasına neden olur. Oositlerde gerçekleştirilen çalışmalarda, organel aşırı yüklenmesinin bu özelliği, wt-AQP2'ye kıyasla mutantların AQP2 proteinlerinin su geçirgenliğini belirlemek için kullanılmıştır. Aksine, hücre için yönetilebilen bir

seviyede, endojen olarak ifade edilen proteinler, hücrelerin plazma membranlarında hiç tespit edilmemiştir. Benzer şekilde, orta ekspresyon seviyelerinde, ER'de tutuklanan AQP2 mutantları oositlerin plazma membranında görünmez [7]. Bu hipotezden hareketle gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, memeli hücrelerinde *in vitro* ya da *in vivo* olarak eksprese ettirilen bazı ER-tutuklu proteinlerin ER'den çıkış gösteremediği, ancak bunların oosit ifade sisteminde plazma membranına taşınarak fonksiyonel olabileceği gösterilmiştir. Oosit plazma membranlarındaki mutant proteinlerin yüksek düzeylerdeki ifadeleri, indirgenmiş yıkım düzeyi ile ilişkilendirilmiştir, çünkü oositler sıcaklık duyarlılığı gösterirler ve memeli hücreleri 37° C'de kültüre edilirken, oositler 18°C'de kültürlenirler. Örneğin, ER'de tutukluluk gösteren, Phe508 (CFTR F508) içermeyen, kistik fibrozis transmembran iletkenlik regülatörü oositlerde klorür iletkenliği verir, ancak memeli hücrelerinde ER'den çıkamaz [135], Hereditör uzun QT sendromuna neden olan HERG voltaj kapılı potasyum kanalındaki mutantlar [136] ve albinizmde tirozinaz mutantları [137] bu duruma örnek olarak gösterilebilir. ER'de tutuklanmasına rağmen, yüksek cRNA konsantrasyonları ile oluşturulan yüksek ekspresyon düzeylerinin ER'den çıkışına ve plazma membranına yönlendirilmesine izin verdiği bazı AQP2 mutantları tespit edilmiştir ve bunların su geçirgenliği gösterebildiği görülmüştür. Bu şekilde etki gösteren mutasyonlar, fonksiyonel mutantlar olarak tanımlanmaktadır [134].

*Xenopus* oositlerinde mutant AQP2 proteinlerinin su geçirgenliğinin olmaması ya da çok düşük olması,

- 1) Mutant cRNA'ların oositlerdeki stabiliteilerinin düşüklüğü
- 2) Mutant AQP2 proteinlerinin oositlerdeki stabiliteilerinin düşüklüğü
- 3) Mutant AQP2 proteinlerinin plazma membranına hedeflenme kusuru
- 4) Mutant AQP2 proteinlerinin fonksiyonel olmayan kanal oluşturmaları ile ilişkilidir [105].

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, mutant A147T-AQP2 proteininin su-injekte kontrollere göre su geçirgenliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 147. kodonda yer alan alaninin, MIP aile üyeleri içerisinde iyi korunmuş düzeyde olduğu A147T-AQP2 proteininin wt-AQP2'ye göre azalmış su geçirgenlik kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir [13, 105]. Çalışmamız bu verileri destekler niteliktedir. Mutant A45T-AQP2 ve R85X-AQP2 injekte oositler, su injekte kontrollere yakın bir hacimsel değişikliğe sahiptir. Bununla birlikte azalmış su kanalı fonksiyonunun NDI'ye katkıda bulunabileceği göz ardı edilemese de, yapılan çalışmalar, ER'de tutuklanma ve bunu takiben degradasyonun majör olduğunu ileri sürmektedir. Bu hipotez, otozomal resesif NDI olan hastaların idrarında mutant AQP2 proteinlerinin yokluğu ile desteklenir, AQP2 sağlıklı bireylerin idrarında kolaylıkla tespit edilir [138] [139].

A45T-AQP2 mutant proteininin gerçekleştirilen immünblot analizlerinde, plazma membranına ulaşamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Bu mutant protein, ER'de tutuklanma ve bunu takiben degradasyon hipotezine uymaktadır (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.16). Bu bilgiler ışığında A45T mutasyonunun hedefleme kusuru olan ve aynı zamanda fonksiyonel olmayan bir su kanalı oluşturan protein oluşumuna neden olduğu düşünülmüştür (Şekil 4.35).

R85X-AQP2 proteini, taşıdığı stop mutasyonu nedeniyle 4 transmembran domeyni kaybeden, yaklaşık 9 kDA moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. İmmunblot analizlerinde tespit edilememiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.28, Şekil 4.29), su geçirgenliği testinde kontrole yakın bir değere sahiptir (Şekil 4.35), proteinin fonksiyonel su kanalı oluşturamayacağı düşünülmüştür.

A147T-AQP2 mutant proteininin literatürdeki verileri destekler şekilde [13, 105] yanlış hedefleme (Şekil 4.29), stabilitede düşüş (Şekil 4.17) gibi özellikler göstermesine rağmen kısmen fonksiyonel bir su kanalı olduğu düşünülmüştür (Şekil 4.35).

NDI, aşırı miktarda sıvı tüketimi ve yüksek miktarda idrar çıkarma gibi semptomlarla karakterize edilen nadir bir hastalıktır. Yetişkinlerin çoğu kazanılmış NDI patolojisi göstermektedir; bunun yanı sıra hastalığın konjenital formu da bulunmaktadır. Özellikle konjenital formlarda tedavi gerçekleşmezse, hasta normal bir şekilde

gelişim gösteremez. Ağır vakalarda beyin dehidrasyonu ve beyin ödeminin tekrarlanan periyotlarla gerçekleşmesi zihinsel geriliğe neden olabilir, bu durum NDI'nin ciddi komplikasyonu olarak değerlendirilir. Bu tür komplikasyonlar çoğunlukla, *AVPR2* ve *AQP2* genlerinde yer alan, klinik teşhiste gecikmeye yol açacak *de novo* mutasyonlardan kaynaklanır.

*X. laevis* oositleri ve hücre hatları gibi çoğunlukla heterolog ifade sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar, NDI'ya neden olan *AQP2* mutasyonlarının anahtar özelliklerini, protein sentezinin etkili şekilde indirgenmesi [7] [8], non-fonksiyonel sentez (kalite kontrolü/olgunlaşma) ve hatalı yönlendirme [7, 9, 10] açısından tanımlamışlardır. Bu tanımlamalar, çeşitli *AQP2* gen mutasyonlarının, oositlerde *AQP2* proteininin ER'de tutuklanmasına neden olduğunu [7, 9, 10, 14, 79, 105, 106]; ancak bazı *AQP2* mutantlarının oosit ifade sisteminde aşırı ifadesinin sağlanması ile bu mutantların su kanalları olarak işlev görme yeteneğinin araştırılabileceğini öngörmüştür, nitekim ER'de tutuklanma ile karakterize olan ancak fonksiyonel su kanalı olarak işlev görebilen mutasyonlar tespit edilmiştir. Tedavi stratejileri açısından bu sonuçlar kritiktir, çünkü işlevsel kanalların normal sinyal iletimini atlayarak zara ulaşmaya teşvik edilebileceğini önermektedirler [7, 105-107].

*AQP2* fonksiyon ve trafiğinin değerlendirilmesindeki problemlerden biri de çalışılan ifade sistemleri arasındaki sonuç farklılıklarıdır. Örneğin, literatürde otozomal çekinik NDI'ya neden olan iki yeni mutasyon (K228E ve V24A) tanımlanmıştır [14] ve bu mutasyonların oositlerde yapılan analizleri, mutant proteinlerin zara uygun şekilde hedeflendiğini ve *AQP2*'nin "fonksiyonel varyantları" olduklarını ve dolayısıyla NDI fenotipinin kolaylıkla açıklanamayacağını göstermiştir. Bununla birlikte, memeli hücrelerinde ilgili mutantlarla yapılan çalışmalar, hasarlı protein trafiğine işaret ederek, *AQP2* mutantlarının trafik için ilgili sistemleri içeren hücre hatlarında ek çalışmalarının önemini vurgulamıştır [49].

NDI patogenezi için neden olduğu bilinen, yayınlanmış mutasyon ve varyasyonların sunulduğu HGMD veri tabanında *AQP2* gen bölgesi için günümüz itibarıyla 58 mutasyon yer almaktadır [72]. Bu mutasyonların iki farklı moleküler çıktı ile sonuçlandığı bilinmektedir. *AQP2* genindeki bir mutasyon,

- Bir hedefleme sinyalini etkileyebilir ve işlevsel AQP2'nin membrana yönlendirilmesini engelleyebilir ya da,
- AQP2'nin kanal oluşturan yapısının kurulumunda bir kusura neden olur ve bu da fonksiyonel olmayan su kanalı oluşturur [71].

AQP2'nin NDI'deki rolü ilk olarak tanımlandığından bu yana, NDI ile sonuçlanan AQP2 mutasyonlarının bazıları incelenmiş ve çeşitli model sistemlerde çalışılmıştır. Memeli hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalar, mutant AQP2 proteininin trafiği ve hedeflenme süreci hakkında bilgi vermiştir, buna karşın *X. laevis* oosit sisteminde AQP2'nin ifadesi, fonksiyona, yani mutasyonların, membranlar boyunca AQP2 aracılı su akışını değiştirmeye yönelik kabiliyetlerini değerlendirmeye imkan sağlamıştır [71].

Tez çalışması kapsamında ilgili mutant proteinlerin karakterizasyonu aynı anda stabil transfekte MDCK hücreleri ve *X. laevis* oosit ifade sisteminde değerlendirilmiştir ki bu durum, çalışmayı anlamlı ve farklı kılmaktadır. Çalışılan mutant proteinlerine ilişkin her iki sistemden elde edilen veriler birbirini desteklemektedir. Buna göre A45T-AQP2 mutant ER'de tutuklanma ile karakterize, indirgenmiş yarı ömre sahip, hedefleme kusuru gösteren bir proteindir; aynı zamanda fonksiyonel olmayan bir su kanalı oluşumuna neden olur. R85X-AQP2 proteini, immüblot analizlerinde tespit edilememiştir, ancak su geçirgenlik testi verilerine göre, bu mutant proteinin fonksiyonel su kanalı oluşturamadığı aşikardır. A147T-AQP2 mutant proteininin karakterizasyonu daha önce çalışılmıştır; çalışmamız da literatürdeki verileri destekler şekilde [13, 105] mutant proteinin kısmi yanlış hedefleme, indirgenmiş yarı ömür gibi özellikler göstermesine rağmen kısmen fonksiyonel bir su kanalı olduğunu ortaya koymuştur.

Bu tez çalışması kapsamında NDI patogenezinde yol açtığı bilinen, AQP2 geninde grubumuzca tanımlanmış mutasyonların fonksiyon analizlerinin yapılmış olması, ülkemizde bu bağlamda gerçekleştirilmiş ilk çalışma olması açısından ayrıca önem arz etmektedir. Mutant su kanallarının hücre içi fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar, hastalık fenotipine yol açan mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve bu patolojik



mekanizmalara ilişkin farmakolojik stratejilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Katsura, T., et al. "Constitutive and Regulated Membrane Expression of Aquaporin-1 and Aquaporin-2 Water Channels in Stably Transfected Llc-Pk1 Epithelial-Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), pp. 7212-7216, 1995.
2. Nielsen, S. and P. Agre. "The Aquaporin Family of Water Channels in Kidney." *Kidney International*, 48(4), pp. 1057-1068. 1995.
3. M.A. Knepper, and T. Inoue. "Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin." *Current Opinion in Cell Biology*, 9(4), pp. 560-564, 1997.
4. BM, Hristensen, Z.M. Aperia, A, Nielsen. "S Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment." *Am J Physiol Renal Physiol*, 278, pp. 29–42, 2000.
5. Sands, J.M. and D.G. Bichet, "Nephrogenic diabetes insipidus." *Annals of Internal Medicine*, 144(3), pp. 186-194, 2006.
6. Bichet, D.G.a.T.M.F. Nephrogenic diabetes insipidus. In : *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. (8th ed). New York: McGraw-Hill, 2001.
7. Marr, N., et al. "Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus." *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(9), 2002.
8. Guyon, C., et al. "Characterization of D150E and G196D aquaporin-2 mutations responsible for nephrogenic diabetes insipidus: importance of a mild phenotype." *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(2), pp. 489-498, 2009.
9. Deen, P.M.T., et al. "Water Channels Encoded by Mutant Aquaporin-2 Genes in Nephrogenic Diabetes-Insipidus Are Impaired in Their Cellular Routing." *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), pp. 2291-2296, 1995.
10. Lin, S.H., et al. "Two novel aquaporin-2 mutations responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus in Chinese families." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), pp. 2694-2700, 2002.
11. Robben, J.H., N.V.A.M. Knoers, and P.M.T. Deen, "Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic

- diabetes insipidus." *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(2), pp. 257-270, 2006.
12. Schenk, A.D., et al. "The 4.5 angstrom structure of human AQP2." *Journal of Molecular Biology*, 350(2), pp. 278-289, 2005.
  13. Tamarappoo, B.K. and A.S. Verkman, "Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones." *Journal of Clinical Investigation*, 101(10), pp. 2257-2267, 1998.
  14. Leduc-Nadeau, A., et al. "New autosomal recessive mutations in aquaporin-2 causing nephrogenic diabetes insipidus through deficient targeting display normal expression in *Xenopus oocytes*." *Journal of Physiology-London*, 588(12), pp. 2205-2218, 2010.
  15. Kamsteeg, E.J., et al. "An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." *Embo Journal*, 18(9), pp. 2394-2400, 1999.
  16. de Mattia, F., et al. "A novel mechanism in recessive nephrogenic diabetes insipidus: wild-type aquaporin-2 rescues the apical membrane expression of intracellularly retained AQP2-P262L." *Human Molecular Genetics*, 13(24), pp. 3045-3056, 2004.
  17. Park EJ, K.T. "A Minireview on Vasopressin-regulated Aquaporin-2 in Kidney Collecting Duct Cells." *Electrolyte Blood Press*, 13(1), pp. 1-6, 2015.
  18. Knepper, M.A., T.H. Kwon, and S. Nielsen, "Molecular Physiology of Water Balance." *New England Journal of Medicine*, 372(14), pp. 1349-1358, 2015.
  19. Nielsen, S., et al. "Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine." *Physiological Reviews*, 82(1), pp. 205-244, 2002.
  20. Tae-Hwan Kwon, J.F.a.S.N. "Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis." *Kidney Res Clin Pract*, 32(3), pp. 96–102, 2013.
  21. Knepper, M.A. "Systems biology in physiology: the vasopressin signaling network in kidney." *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(11), pp. 1115-1124, 2012.
  22. Kwon TH, N.J., Moller HB, Fenton RA, Nielsen S, Frokiaer J. "Aquaporins in the kidney." *Handb Exp Pharmacol*, pp. 95-132, 2009.
  23. Finkelstein, A. "Water and Nonelectrolyte Permeability of Lipid Bilayer Membranes." *Journal of General Physiology*, 68(2), pp. 127-135, 1976.

24. Denker BM, S.B., Kuhajda FP, Agre P. "Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules." *J Biol Chem*, 263, pp. 15634-15642, 1988.
25. Smith BL, A.P. "Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins." *J Biol Chem* 266, pp. 6407-6415, 1991.
26. Brown, D. "The Discovery of Water Channels (Aquaporins)." *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70, pp. 37-42, 2017.
27. Day RE, K.P., Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, "Conner MT, Human aquaporins: regulators of transcellular water flow." *Biochim Biophys Acta.*, 1840(5), pp. 1492-506, 2014.
28. Fushimi, K., et al., "Cloning and Expression of Apical Membrane Water Channel of Rat-Kidney Collecting Tubule." *Nature*, 361(6412), pp. 549-552, 1993.
29. Nielsen S, C.C., Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA, "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci*, 92, pp. 1013-1017, 1995.
30. Terris J, E.C., Marples D, Knepper MA, Nielsen S, "Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney." *Am J Physiol*, 269, pp. 775-785, 1995.
31. Ecelbarger CA, T.J., Frindt G, et al, "Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney." *Am J Physiol*, 269(663-672), 1995.
32. Kwon TH, L.U., Marples D, et al. "Altered expression of renal AQPs and Na(+) transporters in rats with lithium-induced NDI." *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, pp. 552-564, 2000.
33. Marples D, C.S., Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S, "Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla." *J Clin Invest*, 95, pp. 1838-1845, 1995.
34. Ma T, S.Y., Yang B, et al, "Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels." *Proc Natl Acad Sci*, 97, pp. 4386-4391, 2000.
35. Chou CL, M.T., Yang B, Knepper MA, Verkman AS, "Fourfold reduction of water permeability in inner medullary collecting duct of aquaporin-4 knockout mice." *Am J Physiol*, 274, pp. 549-554, 1998.

36. Knepper MA, N.S., Chou CL, DiGiovanni SR, "Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct." *Semin Nephrol*, 14, pp. 302-321, 1994.
37. Jung HJ, K.T. "Molecular mechanisms regulating aquaporin-2 in kidney collecting duct." *Am J Physiol Renal Physiol*, 311(6), pp. 1318-1328, 2016.
38. Nielsen S, K.T., Christensen BM, Promeneur D, Frokiaer J, Marples D, "Physiology and pathophysiology of renal aquaporins." *J Am Soc Nephrol*, 10, pp. 647-663, 1999.
39. Os CH, D.P. "Role of aquaporins in renal water handling: Physiology and pathophysiology." *Nephrol Dial Transplant*, 13, pp. 1645-1651, 1998.
40. Martin PY, S.R. "Role of aquaporin-2 water channels in urinary concentration and dilution defects." *Kidney Int*, 53(suppl 65), pp. 6-57, 1998.
41. Lee JW, C.C., Knepper MA, "Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes." *J Am Soc Nephrol*, 26(11), pp. 2669-77, 2015.
42. Moeller HB, F.R. "Cell biology of vasopressin- regulated aquaporin-2 trafficking." *Pflugers Arch*, 464, pp. 133-144, 2012.
43. Barile M, P.T., Yu MJ, et al "Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct." *Mol Cell Proteomics*, 4, pp. 1095-1106, 2005.
44. Hoffert JD, P.T., Wang G, Shen RF, Knepper MA. "Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites." *Proc Natl Acad Sci*, 103, pp. 7159-7164, 2006.
45. Hoffert JD, F.R., Moeller HB, et al. "Vasopressin- stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2." *J Biol Chem*, 283, pp. 24617-24627, 2008.
46. Hoffert JD, P.T., Knepper MA. "Phosphoproteomics of vasopressin signaling in the kidney." *Expert Rev Proteomics*, 8, pp. 157-163, 2011.
47. Katsura T, G.C., Ausiello DA, Brown D. "Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells." *Am J Physiol*, 272, pp. 817-822, 1997.
48. Moeller HB, K.M., Fenton RA. "Serine 269 phosphorylated aquaporin-2 is targeted to the apical membrane of collecting duct principal cells" *Kidney Int*, 75, pp. 295-303, 2009.

49. Moeller HB, P.J., Rutzler MR, Fenton RA. "Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its endocytosis and protein-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci*, 107, pp. 424-429, 2010.
50. Nedvetsky PI, T.V., Tamma G, et al. "Reciprocal regulation of aquaporin-2 abundance and degradation by protein kinase A and p38-MAP kinase." *J Am Soc Nephrol*, 21, pp. 1645-1656, 2010.
51. Rinschen MM, Y.M., Wang G, et al. "Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor-dependent signaling pathways in renal collecting duct cells." *Proc Natl Acad Sci*, 107, pp. 3882-3887, 2010.
52. Choi HJ, J.H., Kwon TH. "Extracellular pH affects phosphorylation and intracellular trafficking of AQP2 in inner medullary collecting duct cells." *Am J Physiol Renal Physiol*, 308, pp. 737-748, 2015.
53. Sandoval PC, S.D., Pisitkun T, Saeed F, Hoffert JD, Knepper MA. "Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells." *J Am Soc Nephrol*, 24, pp. 1793-1805, 2013.
54. Kamsteeg EJ, H.G., Boone M, et al. "Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel." *Proc Natl Acad Sci*, 103, pp. 18344-18349, 2006.
55. Lee YJ, L.J., Choi HJ, et al. "E3 ubiquitin-protein ligases in rat kidney collecting duct: response to vasopressin stimulation and withdrawal." *Am J Physiol Renal Physiol*, 301(883-896), 2011.
56. Matsumura Y, U.S., Rai T, Sasaki S, Marumo F, "Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP." *J Am Soc Nephrol*, 8, pp. 861-867, 1997.
57. Lee RC, F.R., Ambros V. "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell*, 75, pp. 843-854, 1993.
58. Kim JE, J.H., Lee YJ, Kwon TH. "Vasopressin-regulated miRNAs and AQP2-targeting miRNAs in kidney collecting duct cells." *Am J Physiol Renal Physiol*, 308, pp. 749-764, 2015.
59. Kwon TH, N.J., Kim YH, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S, "Regulation of sodium transporters in the thick ascending limb of rat kidney: response to angiotensin II." *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, pp. 152-165, 2013.

60. Lee YJ, S.I., Jang KJ, Nielsen J, Frokiaer J, Nielsen S, Kwon TH, "Increased AQP2 targeting in primary cultured IMCD cells in response to angiotensin II through AT1 receptor." *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, pp. 340-350, 2007.
61. Jung HJ, K.S., Choi HJ, et al. "Tankyrase-mediated beta-catenin activity regulates vasopressin-induced AQP2 expression in kidney collecting duct mpkCCDc14 cells." *Am J Physiol Renal Physiol*, 308, pp. 473-486, 2015.
62. Valenti G, P.G., Tamma G, Carmosino M, "Svelto M: Minireview, Aquaporin 2 trafficking." *Endocrinology*, 146, pp. 5063-5070, 2005.
63. JM, C. "Diabetes insipidus." *Crit Care Nurse*, 9, pp. 86-93, 1989.
64. J, T.T.P. "The vasopressin system: physiology and clinical strategies." *Anesthesiology*, 105, pp. 599-612, 2006.
65. Saborio P, T.G., Chan JCM. "Diabetes Insipidus." *Pediatric in Review*, 21, pp. 122-129, 2000.
66. Chan JCM, K.S., Roth KS, Wilson TA, *Pediatric diabetes Insipidus Medescape*, 2013.
67. Di Largi N, N.F., Allergi A, Oliveri I, Berteli C, Gallizia A et al, "Diabetes Insipidus, diagnosis and management." *Horm Res Pediatr*, 77, pp. 69-84, 2012.
68. Ghiradello S, G.M., Rossi A, Maghnie M, "The diagnosis of children with central diabetes insipidus." *J Pediatr Endocrinol Metab*, 20, pp. 359-75, 2007.
69. Arthus MF, L.M., Crumley MJ, Naumova AK, Morin D, "Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." *J Am Soc Nephrol*, 11, pp. 1044-54, 2000.
70. al, A.M.e. "Diabetes insipidus: the basic and clinical review." *Int J Res Med Sci*, 4(1), pp. 5-11, 2016.
71. Moeller HB, R.S., Fenton RA, "Nephrogenic diabetes insipidus: essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment." *Endocr Rev*, 34(2), pp. 278-301, 2013.
72. hgmd.
73. Lolait, S.J., O'Carroll, A.-M., McBride, O.W. et al "Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus." *Nature*, 357, pp. 336-339, 1992.

74. Rosenthal, W., Seibold, A., Antaramian, A. et al, "Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus." *Nature*, 359, pp. 233–235, 1992.
75. van den Ouweland, A.M., Dreesen, J.C., Verdijk, M. et al. "Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus." *Nat Genet.* 2, pp. 99–102, 1992.
76. Pan, Y., Metzenberg, A., Das, S. et al. "Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." *Nat Genet*, 2, pp. 103–106.
77. Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y. et al, "Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule." *Nature*, 361, pp. 549–552, 1993.
78. Sasaki, S., Fushimi, K., Saito, H. et al, "Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct." *J Clin Invest*, 93, pp. 1250–1256, 1994.
79. Deen, P.M.T., Verdijk, M.A.J., Knoers, N.V.A.M. et al "Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine." *Science*, 264, pp. 92–95, 1994.
80. Sasaki, S., Chiga, M., Kikuchi, E. et al, "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, pp. 338–344, 2013.
81. Bockenhauer, D., Bichet, D.G. "Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus." *Nat Rev Nephrol*, 11, pp. 576–588, 2015.
82. Bichet DG, B.D. "Genetic forms of nephrogenic diabetes insipidus (NDI): Vasopressin receptor defect (X-linked) and aquaporin defect (autosomal recessive and dominant." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 30(2), pp. 263-76, 2016.
83. Wesche D, D.P., Knoers NV, "Congenital nephrogenic diabetes insipidus: the current state of affairs." *Pediatr Nephrol*, 27, pp. 2183–2204, 2012.
84. van Lieburg AF, K.N., Monnens LA, "Clinical presentation and follow-up of 30 patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus." *J Am Soc Nephrol*, 10, pp. 1958–1964, 1999.
85. DG, B. "Nephrogenic diabetes insipidus." *Adv Chronic Kidney Dis*, 13, pp. 96–104, 2006.



86. DG, B. "Hereditary polyuric disorders: new concepts and differential diagnosis." *Semin Nephrol*, 26, pp. 224–233, 2006.
87. Kim JK, S.S., Wood WM, Brown JL, Schrier RW, "Arginine vasopressin secretion with mutants of wildtype and Brattleboro rats AVP gene." *J Am Soc Nephrol*, 8, pp. 1863–1869, 1997.
88. Valtin H, S.H. "Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain)." *Am J Physiol*, 206, pp. 425–430, 1964.
89. Di Giovanni SR, N.S., Christensen EI, Knepper MA. "Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat." *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, pp. 8984–8988, 1994.
90. RA, F., "Essential role of vasopressin-regulated urea transport processes in the mammalian kidney." *Pflugers Arch*, 458, pp. 169–177, 2009.
91. Fenton RA, K.M. "Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium." *Physiol Rev*, 87, pp. 1083–1112, 2007.
92. Heinke F, L.D., Membrane protein stability analyses by means of protein energy profiles in case of nephrogenic diabetes insipidus. *Comput Math Methods Med*, 281-790, 2012.
93. Moeller HB, O.E., Fenton RA, "Regulation of the water channel aquaporin-2 by posttranslational modification." *Am J Physiol Renal Physiol*, 300, pp. 1062–1073, 2011.
94. Mulders, S.M., Bichet, D.G., Rijss, J.P.L. et al "An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the golgi complex." *J Clin Invest*, 102, pp. 57–66, 1998.
95. Robertson, G.L., Kopp, P. *A novel dominant mutation of the aquaporin-2 gene resulting in partial nephrogenic diabetes insipidus*. in: Global conference proceedings. NDI Foundation, 2002.
96. Sohara, E., Rai, T., Yang, S.S. et al "Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation." *Proc Natl Acad Sci*, 103, pp. 14217–14222, 2006.
97. Rojek A, F.E., Kwon TH, Frøkiaer J, Nielsen S. "Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice." *Proc Natl Acad Sci*, 103, pp. 6037–6042, 2006.

98. Yang B, Z.D., Qian L, Verkman AS, "Mouse model of inducible nephrogenic diabetes insipidus produced by floxed aquaporin-2 gene deletion." *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, pp. 465–472, 2006.
99. Ma T, Y.B., Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS, "Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels." *J Biol Chem*, 273, pp. 4296–4299, 1998.
100. Yang B, G.A., Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. "Neonatal mortality in an aquaporin-2 knock-in mouse model of recessive nephrogenic diabetes insipidus." *J Biol Chem*, 276, pp. 2775–2779, 2001.
101. Yang B, Z.D., Verkman AS, "Hsp90 inhibitor partially corrects nephrogenic diabetes insipidus in a conditional knock-in mouse model of aquaporin-2 mutation." *Faseb J*, 23, pp. 503–512, 2009.
102. Lloyd DJ, H.F., Tarantino LM, Gekakis N, "Diabetes insipidus in mice with a mutation in aquaporin-2." *PLoS Genet*, 1, pp. 20, 2005.
103. Shi PP, C.X., Qu J, Volk KA, Kirby P, Williamson RA, Stokes JB, Yang B, "Nephrogenic diabetes insipidus in mice caused by deleting COOH-terminal tail of aquaporin-2." *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, pp. 1334–1344, 2007.
104. McDill BW, L.S., Kovach PA, Ding L, Chen F, "Congenital progressive hydronephrosis (cph) is caused by an S256L mutation in aquaporin-2 that affects its phosphorylation and apical membrane accumulation." *Proc Natl Acad Sci*, 103, pp. 6952–6957, 2006.
105. Mulders SM, K.N., Van Lieburg AF, Monnens LA, Leumann E, Wuhl E, Schober E, Rijss JP, Van Os CH, Deen PM, "New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels." *J Am Soc Nephrol*, 8, pp. 242–248, 1997.
106. Marr N, K.E., van Raak M, van Os CH, Deen, PM. "Functionality of aquaporin-2 missense mutants in recessive nephrogenic diabetes insipidus." *Pflugers Arch*, 442, pp. 73–77, 2001.
107. Canfield MC, T.B., Moses AM, Verkman AS, Holtzman EJ, "Identification and characterization of aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus with partial vasopressin response." *Hum Mol Genet*, 6, pp. 1865–1871, 1997.
108. Kamsteeg EJ, B.D., Konings IB, Nivet H, Lonergan M, Arthus MF, van Os CH, Deen PM, "Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes

- dominant nephrogenic diabetes insipidus." *J Cell Biol*, 163, pp. 1099–1109, 2003.
109. Boone M, D.P. "Congenital nephrogenic diabetes insipidus: what can we learn from mouse models?" *Exp Physiol*, 94, pp. 186–190, 2009.
  110. de Mattia F, S.P., Kamsteeg EJ, Konings IB, van der Sluijs P, Mallmann R, Oksche A, Deen "PM Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2–R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." *J Am Soc Nephrol*, 16, pp. 2872–2880, 2005.
  111. Savelkoul PJ, D.M.F., Li Y, Kamsteeg EJ, Koningsl B, vander Sluijs P, Deen PM, "p.R254Q mutation in the aquaporin-2water channel causing dominant nephrogenic diabetes insipidus is due to a lack of arginine vasopressin induced phosphorylation." *Hum Mutat*, 30, pp. 891–903, 2009.
  112. Kuwahara M, I.K., Ooeda T, Igarashi T, Ogawa E, Katsushima Y, Shinbol, Uchida S, Terada Y, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Bichet DG, 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, pp. 738–748, 2001.
  113. Babey M, K.P., Robertson GL, "Familial forms of diabetes insipidus: clinical and molecular characteristics." *Nat Rev Endocrinol*, 7, p. 701–714, 2011.
  114. Kamsteeg EJ, S.M., Tamma G, Koningsl B, Deen PM, "Repulsion between Lys258 and upstream arginines explains the missorting of the AQP2 mutant p.Glu258Lys in nephrogenic diabetes insipidus." *Hum Mutat*, 30, pp. 1387–1396, 2009.
  115. Bouley R, H.U., Lu HA, Nunes P, Brown D, "Bypassing vasopressin receptor signaling pathways in nephrogenic diabetes insipidus." *Semin Nephrol*, 28, pp. 266–278, 2008.
  116. Bouley R, B.S., Sun T, McLaughlin M, Nsumu NN, Lin HY, Ausiello DA, Brown D, "Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells." *J Clin Invest*, 106, pp. 1115–1126, 2000.
  117. Wang W, L.C., Nejsun LN, Li H, Kim SW, Kwon TH, Jonassen TE, Knepper MA, Thomsen K, Frøkiaer J, Nielsen S, "Biphasic effects of ANP infusion in conscious, euvolumic rats: roles of AQP2 and ENaC trafficking." *Am J Physiol Renal Physiol*, 290, pp. 530–541, 2006.

118. Bouley R, P.-S.N., Cohen O, McLaughlin M, Breton S, Brown D, "Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra)." *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, pp. 1103–1112, 2005.
119. Sanches TR, V.R., Massola Shimizu MH, Braganca AC, "Oshiro-Monreal F, Seguro AC, Andrade L, Sildenafil reduces polyuria in rats with lithium-induced NDI." *Am J Physiol Renal Physiol*, 302, pp. 216–225, 2012.
120. Bouley R, L.H., Nunes P, Da Silva N, McLaughlin M, Chen Y, Brown D, "Calcitonin has a vasopressin-like effect on aquaporin-2 trafficking and urinary concentration." *J Am Soc Nephrol*, 22, pp. 59–72, 2011.
121. de Rouffignac C, E.J. "Effects of calcitonin on the renal concentrating mechanism." *Am J Physiol*, 245, p. 506–511, 1983.
122. Li W, Z.Y., Bouley R, Chen Y, Matsuzaki T, Nunes P, Hasler U, Brown D, Lu HA, "Simvastatin enhances aquaporin-2 surface expression and urinary concentration in vasopressin-deficient Brattleboro rats through modulation of Rho GTPase." *Am J Physiol Renal Physiol*, 301, pp. 309–318, 2011.
123. Procino G, B.C., Carmosino M, Tamma G, Milano S, De Benedictis L, Mola MG, Lazo-Fernandez Y, Valenti G, Svelto M, "Fluvastatin modulates renal water reabsorption in vivo through increased AQP2 availability at the apical plasma membrane of collecting duct cells." *Pflugers Arch*, 462, pp. 753–766, 2011.
124. Li JH, C.C., Li B, Gavrilova O, Eisner C, Schnermann J, Anderson SA, Deng CX, Knepper MA, 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, pp. 3115–3126, 2009.
125. Olesen ET, R.M., Moeller HB, Praetorius HA, Fenton RA, "Vasopressin-independent targeting of aquaporin-2 by selective E-prostanoid receptor agonists alleviates nephrogenic diabetes insipidus." *Proc Natl Acad Sci*, 108, pp. 12949–12954, 2011.
126. Robben JH, S.M., Knoers NV, Deen PM. "Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus." *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, pp. 253–260, 2007.
127. Duzenli, D., et al. "Mutations in the AVPR2, AVP-NP11, and AQP2 genes in Turkish patients with diabetes insipidus." *Endocrine*, 42(3), pp. 664-669, 2012.

128. O'Gorman S, F.D., Wahl GM. "Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells." *Science*, 15(251(4999)), pp. 1351-5, 1991.
129. Bianchi L, D.M. *Heterologous expression of C. elegans ion channels in Xenopus oocytes Wormbook*, 2006.
130. Gurdon, J.B., et al. "Use of Frog Eggs and Oocytes for Study of Messenger Rna and Its Translation in Living Cells." *Nature*, 233(5316), pp. 177, 1971.
131. Parisi, N. *Xenopus laevis as a Model System*. 2012.
132. Miledi, R., I. Parker, and K. Sumikawa. "Synthesis of Chick Brain Gaba Receptors by Frog Oocytes." *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*, 216(1205), pp. 509-515, 1982.
133. Miledi, R., I. Parker, and K. Sumikawa. "Properties of Acetylcholine-Receptors Translated by Cat Muscle Messenger-Rna in Xenopus Oocytes." *Embo Journal*, 1(11), pp. 1307-1312, 1982.
134. Loonen, A.J.M., et al. "Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus." *Seminars in Nephrology*, 28(3), pp. 252-265, 2008.
135. Drumm, M.L., et al. "Chloride Conductance Expressed by Delta-F508 and Other Mutant Cftrs in Xenopus Oocytes." *Science*, 254(5039), pp. 1797-1799, 1991.
136. Ficker, E.K., et al. "Rescue of a misprocessed mutant HERG channel linked to hereditary long QT syndrome." *Biophysical Journal*, 78(1), pp. 342a-342a, 2000.
137. Halaban, R., et al. "Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), pp. 5889-5894, 2000.
138. Deen, P.M.T., et al. "Urinary content of aquaporin 1 and 2 in nephrogenic diabetes insipidus." *Kidney International*, 50(5), pp. 1768-1769, 1996.
139. Kanno, K., et al. "Urinary-Excretion of Aquaporin-2 in Patients with Diabetes-Insipidus." *New England Journal of Medicine*, 332(23), pp. 1540-1545, 1995.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: TUĞÇE KARADUMAN

Doğum Yeri: ANKARA

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: tugcekaraduman@hacettepe.edu.tr

Adresi: Pınarbaşı Mah. Anız Sok. No: 9/9 Keçiören /ANKARA

## Eğitim

Lise: Özel Cemal Şaşmaz Fen Lisesi

Lisans: İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Upper-intermediate (orta üstü)

## İş Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Araş. Gör. (2011-...)

## Deneyim Alanları

Moleküler Genetik

## Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

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

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FHD-2018-16485 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Destek miktarı: 30.000,00 TL'dir.

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

## Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

### **Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

Nefrojenik Diabetes İnsipidus'lu Hastaların *AQP2* Geninde Tespit Edilen Mutasyonların *Xenopus laevis* Oosit İfade Sistemi İle Fonksiyonel Karakterizasyonu, Tuğçe Karaduman, Emel Sağlar, Berk Sağlam, Bora Ergin, Merve Özcan Türkmen, Ferrat Deniz, Beril Erdem, Hatice Mergen, 40. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi, 9-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye (Sözlü Bildiri).



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 27/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: **Diabetes İnsipidus'lu Hastaların AQP2 Geninde Tanımlanan Mutasyonların Fonksiyonel Analizleri**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 111 sayfalık kısmına ilişkin, 21/06/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

27/06/18

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Tuğçe KARADUMAN  
Öğrenci No: N13241653  
Anabilim Dalı: Biyoloji  
Programı: Moleküler Biyoloji  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Hatice MERGEN

(Unvan, Ad Soyad, İmza)