

**BAZI FARMAKOLOJİK ŞAPERONLARIN MUTANT
AVPR2 PROTEİNLERİNDE GÖZLENEN
FONKSİYON KAYIPLARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION of the EFFECTS of SOME
PHARMACOLOGICAL CHAPERONES on
OBSERVED FUNCTION LOSSES of MUTANT
AVPR2 PROTEINS**

DİLARA ŞAHİN

PROF. DR. HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

DİLARA ŞAHİN'in hazırladığı "**Bazı Farmakolojik Şaperonların Mutant AVPR2 Proteinlerinde Gözlenen Fonksiyon Kayıpları Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER

Başkan



Prof. Dr. Hatice MERGEN

Danışman



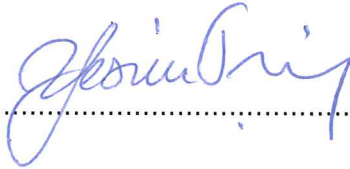
Doç. Dr. Ceren ACAR

Üye



Doç. Dr. Yeşim DOĞAN

Üye



Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS 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 etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun Aralık 2019 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

13 / 07 / 2018



Dilara ŞAHİN

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.

20/06/2018



DİLARA ŞAHİN

ÖZET

BAZI FARMAKOLOJİK ŞAPERONLARIN MUTANT AVPR2 PROTEİNLERİNDE GÖZLENEN FONKSİYON KAYIPLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilara ŞAHİN

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Haziran 2018, 93 sayfa

Protein katlanmasındaki hatalar, anormal ya da olgunlaşmamış proteinlerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Yanlış katlanmış proteinler agregatlar halinde birikmekte ve endoplazmik retikulumda toksik etki yaratmaktadırlar. Bu süreç, ilgili genlerdeki mutasyonların neden olduğu ve protein homeostatisini bozan konformasyonel hastalıklara neden olmaktadır. Çeşitli araştırma grupları, farmakolojik şaperon olarak adlandırılan küçük hücre-geçirgen moleküllerin, konformasyonel hastalıklar üzerinde terapötik etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu küçük bileşikler, yanlış katlanmış proteinleri stabilize ederek doğal bir şekilde kendilerine özgü katlanmalarına izin vermektedir. Dolayısıyla işlevlerini geri kazanabilecekleri moleküler üç boyutlu formlarını kazanmalarına yardımcı bir iskelet oluşturmaktadırlar.

Arjinin Vazopressin Reseptör 2 (AVPR2) ve onu kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar; nadir bir hastalık olan X'e bağlı Nefrojenik Diabetes İnsipidus'a (NDI) neden olmaktadır. NDI'a neden olan AVPR2 genindeki mutasyonlar farklı fenotipte reseptör oluşumuna

neden olabilirler. Ancak *in vitro* AVPR2 çalışmalarında, oluşan mutasyon sonucu yanlış katlanan ve endoplazmik retikulum kalite kontrol sistemine takılı kalan bu hücre içi reseptörlerin, apikal membrana ulaştıklarında fonksiyonel işlevlerini yerine getirebildikleri gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; NDI hastalığına neden olan ve fonksiyon kaybına neden olduğu tespit edilen R68W, ΔR67_G69/G107W (Compound hemizigot) ve T273M mutant AVPR2 proteinlerinin farmakolojik şaperon uygulamasıyla, kalite kontrol sisteminden kurtarılıp görev gördükleri apikal membrana ulaşma durumlarının araştırılmasıdır.

Bu amaçla yapılan deneysel çalışmalarda, yabancı tip ve mutant AVPR2 gen dizilerini içeren plazmidler COS-7 hücrelerine geçici transfeksiyon yöntemi ile aktarılmıştır. Transfekte mutant ve yabancı tip COS-7 hücrelerine üç farklı farmakolojik şaperon, peptid olmayan antagonist OPC41061 (Tolvaptan), OPC31260 (Mozavaptan) ve OPC21268 uygulaması yapılmıştır. Mutant ve yabancı tip AVPR2'lerin hücre içi ve hücre yüzeyi miktarlarının belirlenmesi için, hücre yüzey ELISA ve total ELISA yöntemi uygulanmıştır. Önceki çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen mutant proteinlerin normal şartlar altında elde edilen sonuçları ile farmakolojik şaperon uygulama sonrasındaki ELISA sonuçları karşılaştırılarak, farmakolojik şaperon etkisi gözlemlenmiştir. Ayrıca farmakolojik şaperon uygulama sonrası mutant ve yabancı tip AVPR2'lerin hücre içerisindeki yerleşimlerini tespit etmek amacıyla Endoplazmik Retikulum (ER)-izleyici ve Golgi aygıtı-izleyici boyama yöntemi sonrası floresans mikroskopunda görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yapılan tüm deneysel çalışmalar sonucu, OPC41061, OPC31260 ve OPC21268 farmakolojik şaperonlarının, R68W, ΔR67_G69/G107W (Compound hemizigot) ve T273M mutant AVPR2 proteinlerin üzerinde

başarılı olduğu tespit edilmiştir. Mutant proteinlerin, kontrol grubu mutant proteinlerine oranla hücre yüzeyine ulaşmalarında ve toplam hücre içi miktarlarında artış gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Farmakolojik Şaperonlar, Kalite Kontrol Sistemleri, Nefrojenik Diabetes Insipidus, AVPR2 mutasyonları

ABSTRACT

INVESTIGATION of the EFFECTS of SOME PHARMACOLOGICAL CHAPERONES on OBSERVED FUNCTION LOSSES of MUTANT AVPR2 PROTEINS

Dilara ŞAHİN

Master ,Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

June 2018, 93 pages

Faults in protein folding cause production of abnormal or immature proteins. Misfolded proteins accumulate in aggregates and have toxic effect in endoplasmic reticulum. This process results in conformational diseases caused by mutations in related genes which disrupt protein homeostasis. Various research groups proved that small cell-permeable molecules, called pharmacological chaperones, have therapeutic effects on conformational diseases. These small compounds stabilize misfolded proteins, allowing them to fold in their

natural form, thus create a structure which helps them regain their three-dimensional molecular forms and their functions.

Mutations in *AVPR2* and related genes cause NDI which is the X-linked; a conformational disease. Mutations in *AVPR2* gene - that cause NDI - can cause formation of receptors in different phenotypes. However, in vitro *AVPR2* expression studies show that these intracellular receptors, which are misfolded as a result of the mutation and caught in quality control system of endoplasmic reticulum, can fulfill their functions when they reach the apical membrane.

Purpose of this study is to investigate R68W, Δ R67_G69/G107W (Compound heterozygote) and T273M mutant *AVPR2* proteins which causes NDI disease and loss of functions, through pharmacological chaperone application; and observe if they are released from quality control mechanism and reach the apical membrane where they fulfill their functions.

In experimental studies conducted for this purpose, plasmids used in previous studies, containing wild-type and mutant *AVPR2* gene sequences, were transferred into COS-7 cells by transient transfection method. Three different pharmacological chaperones, non-peptide antagonists OPC41061 (Tolvaptan), OPC31260 (Mozavaptan) and OPC21268 were applied to transfected mutant and wild-type COS-7 cells. Cell surface ELISA and total ELISA methods were applied to determine intracellular and cell surface expression of mutant and wild-type *AVPR2*. Pharmacological chaperone effect was observed by comparing the results of function loss performed in previous studies to ELISA results after pharmacological chaperone application. Additionally, in order to determine the location of mutant and wild-type *AVPR2*s in the cells after pharmacological chaperone

application, imaging studies in fluorescence microscope were performed after ER-tracker and Golgi apparatus-tracer dyeing method.

All experimental studies proved, pharmacological chaperones of OPC41061, OPC31260 and OPC21268 were successful on R68W, Δ R67_G69/G107W (Compound heterozygote) and T273M mutant AVPR2 proteins. Observations showed that ratio of mutant proteins reaching cell surface and their intracellular quantities are higher compared to control group mutant proteins.

Keywords: Pharmacological Chaperones, Quality Control Systems, Nephrogenic Diabetes Insipidus, *AVPR2* Mutations

TEŞEKKÜR

Lisansüstü çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e

Her konuda bana kapılarının açık olduğunu bildiğim hocalarım, Emel SAğLAR ve Sibel KÜÇÜKYILDIRIM'a

Tüm tez çalışmam boyunca bana sabırla her yaptığım hatada tekrar tekrar anlatıp, tezimin her aşamasında bana destek olan hocam, Beril ERDEM'e

Hacettepe'ye ilk geldiğim günden beri bana destek olup, bilgi ve tecrübelerini hiç esirgmeden paylaşan, her şartta sevgi ile yaklaşan, hem arkadaşım hem hocalarım olan Tuğçe KARADUMAN ve Merve ÖZCAN TÜRKMEN'e,

Geç karşılaşmış olsakta her derdimi, sevincimi paylaşan, yüzümü hep güldüren minik arkadaşım Gülsen BAYRAK'a,

Hayatımdaki varlıklarına her daim minnettar olduğum annem Zuhal ŞAHİN'e, babam Fikret ŞAHİN'e, kardeşim Oytun Uras ŞAHİN'e ve eşim Egemen HALICI'ya bana bu denli sevgi ve saygı ile katlandıkları için,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK	i
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER	xi
ŞEKİLLER	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİ.....	2
2.1. Farmakolojik Şaperonlar	2
2.2. Farmakolojik Şaperonların Etki Konsantrasyonları	5
2.3. Farmakolojik Şaperonların Yapısal Mekanizması	5
2.3.1. Rekabetçi Antagonistler/İnhibitörler	6
2.3.2. Agonistler, Ters Agonistler, Kısmi Agonistler ve Allosterik Ligandlar.....	8
2.4. Farmakolojik Şaperonların Hedef Proteinler Üzerindeki Etkisi ...	15
2.4.1. Moleküler Yapıların Farmakolojik Şaperonlar ile Stabilizasyonu	15
2.5. Farmakolojik Şaperonlar ve Proteostaz Düzenleyicilerin Hedef Proteinler Üzerindeki İşbirliği	18
2.6. Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol Sistemi	21
2.6.1. Birincil Kalite Kontrol; ER-İlişkili Katlanma	22
2.6.2. İkincil Kalite Kontrol; Taşıma Yolağı.....	24
2.6.3. Üçüncül Kalite Kontrol; Hedef Bölgeye Ulaşma.....	25
2.7. NDI Hastalığına Neden Olan ve Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol Sistemine Takılı Kalan AVPR2 Mutantları	26
2.7.1. Transmembran Domeyn Mutasyonları.....	27

2.7.2. Sistein Mutasyonları	27
2.6.2.3. Hücre İçi Halka ve C-Ucu Mutasyonları.....	28
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Mutant ve Yabanıl Tip AVPR2 Dizilerini İçeren Memeli İfade Vektörlerinin <i>E.coli</i> (DH5 α) Hücrelerine Transforme Edilmesi.....	33
3.2. Mutant ve Yabanıl Tip AVPR2 Dizilerini İçeren Memeli İfade Vektörlerinin Çoğaltılması.....	34
3.3. COS-7 Hücrelerinin Üretilmesi ve Hazırlanması	35
3.4. Yabanıl ve Mutant DNA Dizilerini İçeren Memeli İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonu	37
3.5. AVPR2 Mutantlarına, Farmakolojik Şaperon Uygulaması için Konsantrasyon Belirlenmesi; MTT Testi	38
3.6. Farmakolojik Şaperon Uygulaması Yapılmış Yabanıl Tip ve Mutant AVPR2'lerin Hücre İçi ve Hücre Yüzeyindeki İfadelerinin Belirlenmesi	40
3.6.1. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi İçin COS-7 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Transfeksiyonu	41
3.6.2. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi İçin Farmakolojik Şaperon Uygulaması	42
3.6.3. Yüzey ELISA Yöntemi	42
3.6.4. Total ELISA Yöntemi İçin COS-7 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Transfeksiyonu	43
3.6.5. Total ELISA Yöntemi İçin Farmakolojik Şaperon Uygulaması .	44
3.6.6. Total ELISA Yöntemi.....	45
3.7. Floresan Görüntüleme Çalışmaları.....	46
3.7.1. Floresan Görüntüleme Çalışmaları İçin COS-7 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Transfeksiyonu	46
3.7.2. Floresan Görüntüleme İçin Farmakolojik Şaperon Uygulaması	47
3.7.3. Floresan Görüntüleme Yöntemi	47
3.7.3.1. Hücrelerin ER-İzleyici ile Boyanması	48
3.7.3.2. COS-7 Hücrelerinin Golgi Aygıtı-İzleyici ile Boyama	48

3.8. Farmakolojik Şaperonların Etkilerinin Tespiti İçin Yapılan Tekrarlı Ölçümler Varyans Analizi (Tekrarlı Ölçümler ANOVA)	49
3.9. İstatistiksel Testler	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
4.1. R68W Mutasyonu Sonuçları.....	73
4.2. ΔR67_G69/G107W, ΔR67_G69 ve G107W Mutasyonu Sonuçları	75
4.3. T273M Mutasyonu Sonuçları.....	77
5. KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	95

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 3.1. Transfeksiyon Yöntemleri ve Kullanılan Malzeme Miktarları	38
Çizelge 4.1. Yabanıl ve Mutant Tip AVPR2 cAMP Sonuçları	51
Çizelge 4. 2. %0,5 DMSO için Tek Örnek T Testi Sonucu	53
Çizelge 4.3. Tekrarlı Ölçümler ANOVA Testi Mutant Proteinlerin Uygulama Sonrası Ortalama Değerler	55
Çizelge 4.4. Tekrarlı Ölçüm ANOVA Testi Yabanıl ve Mutant Tip Proteinler Üzerindeki Üç Farklı Farmakolojik Şaperon Ortalamaları	56
Çizelge 4.5. Çoklu Varyasyon Testleri ile Antagonistler Arasındaki Farklar.....	57
Çizelge 4.6. Farmakolojik Şaperonların Karşılaştırma Değerleri	58
Çizelge 4.7. Kontrol ve Farmakolojik Şaperon Uygulama Hücre Yüzey ELISA Sonuçları	61
Çizelge 4.8. Kontrol ve Farmakolojik Şaperon Uygulama Total ELISA Sonuçları.....	64

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Tez Kapsamında kullanılan Farmakolojik Şaperonlar.	8
Şekil 2.2. Agonist ve Reseptör TMD Etkileşimleri.	12
Şekil 2.3. Ortosterik ve Allosterik Bağlanma.	14
Şekil.2.4. ER-İlişkili Protein Katlanması.	23
Şekil 2.5. Sentezlenen Proteinlerin Modifiye Edildiği ER ve Golgi-aygıtı QC Sistemleri	25
Şekil 2.6. Tez Kapsamındaki Mutantların AVPR2 Üzerindeki Gösterimi	29
Şekil 3.1. COS-7 Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri.....	5236
Şekil 4.1. %0,5 DMSO'nun Mutant Proteinler Üzerindeki Etkisi	52
Şekil 4.2. MTT testine ait grafik. 16 ve 18 Saatlik Dozaj Uygulama Sonuçları.....	54
Şekil 4.3. Hücre Yüzey ELISA Sonuç Grafiği..	62
Şekil 4.4. Total ELISA Sonuç Grafiği..	65
Şekil 4.5. OPC41061 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü.....	67
Şekil 4.6.OPC31260 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü.....	69
Şekil 4.7. OPC21268 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

α	Alfa
B	Beta
Δ	Delta
μ	Mikro
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
AQP2	Akuaporin2
AVPR2	Arjinin vazopressin 2 reseptörü
AVP	Arjinin vazopressin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CFTR	Kistik fibröz transmembran regülatör
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
COS7	CV1 Origin SV40
COPI	ER'yi sıkıştırıran kaplama proteini I
COPII	ER'yi sıkıştırıran kaplama proteini II
C-terminal	Karboksil-terminal
DAPI	4',6-diamidino-2- phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit

DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Bufferer saline
DTT	Ditiyotretol
E.coli (DH5 α)	Escheria coli
ECL	Hücre dışı halka
EC50	Etki konsantrasyonun yarı değeri
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim bağılı immünosorbent testi
ER	Endoplazmik retikulum
ERGIC	ER-Golgi aygıtı ara kontrol
ERp57	Protein disülfid izomeraz
ERQC	Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol
FBS	Fetal sığır serumu
g/L	gram/litre
GnHR	Gonadotropin hormon reseptöleri
GPCR	G protein bağılı reseptör
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HA	Hemaglutinasyon
HCl	Hidrojen klorür
HSF1	Isı şok faktör 1
Hsp	Isı-şok proteinleri
HSRI _{ısı}	Isı- şok cevabı
IC50	İnhibe edici konsantrasyonun yarı değeri
ICL	Hücre içi halka
Kd	Kimyasal denge
LB	Luria Bertani

M	Molar
μ l	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
mM	Milimolar
MTT	Metiltiazoldifenil Tetrazolyum Tuzları
N-bağlı	Azot-bağlı
NDI	Nefrojenik diabetes insipidus
nm	Nanometre
NP-40	Nonidet P-40 (Oktilfenokspolietoksiletanol)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
PDI	Protein disülfid izomerazı
pEGFP	GFP içeren plazmid
pH	Potential of hydrogen
pLV2R	Vazopressin reseptör 2 kodlayan plazmid
PR	Proteostasis düzenleyiciler
R	İnaktif Form
R ₀	Nötr form
R*	Aktif form
R'	Birinci ara form
R''	İkinci ara form
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SLC	Çözünen taşıyıcı
SOC	Super Optimal Broth
SV40	Simian Vacuolating Virus 40

QC	Kalite kontrol
QCS	Kalite kontrol sistemi
TM	Transmembran
TMD	Transmembran Domeyni
UPR	Katlanmamış protein cevabı
V ₁	Vazopressin Reseptör1
V ₂	Vazopressin Reseptör 2
VIP	Vesiküler integral membran proteini

1.GİRİŞ

Hemen hemen her biyokimyasal süreç protein aktivitesi ile devam etmektedir. Her proteinin amino asit dizisi kendine özgü üç boyutlu yapısını belirler ki bu da proteinin işlevini ve biyolojik aktivitesini saptamaktadır [1]. Bu nedenle, proteinlerin etkin bir yapıda katlanması, aktivitesinin sağlanması için temeldir. Yanlış katlanmış proteinler, hücresel proteozom yolağının aktivasyonu ile elimine edilmektedir. Canlı organizmaların sahip olduğu kalite kontrol sistemi Endoplazmik Retikulum (ER), Golgi aygıtı ve bu organellerin içerdikleri şaperon olarak bilinen birçok proteini içermektedir. Şaperonlar protein agregasyonunu önlemekte ve katlanma sürecini desteklemektedirler. Ancak bu hücresel mekanizma içerisindeki tüm proteinlerin üç boyutlu yapısının ve stabilizasyonunun bozulmasından sorumlu nokta mutasyonlarının meydana gelmesi ile sentezlenen polipeptid zincirleri tehlikeye girebilir [2][3]. Bunun sonucunda, iki tehlikeli senaryo ortaya çıkar; ya yanlış katlanan proteinler agregasyon oluşturur ki buda ER stresine neden olur ya da yanlış katlanmış proteinler erken degradasyona uğrarlar. Her iki patolojik durum da konformasyonel hastalıklara neden olmaktadır [4][5].

Genetik hastalıkların yaklaşık yüzde kırkı, mutasyonlar sonucu yanlış katlanan ya da katlanamayan proteinlerin, kalite kontrol (QC) sistemi tarafından tanınarak, genellikle ER'da takılı kalması sonucu meydana gelmektedir. Kalite kontrol sisteminde takılı kalan ilgili proteinler fonksiyon kaybına uğramaktadırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, farmakolojik şaperon olarak adlandırılan, seçici moleküler bileşikler, yanlış katlanmış proteinleri stabilize edebilmekte ve ER'den hedef bölgelere ulaştırabilmektedirler. Böylece proteinlerin fonksiyonlarını geri kazanmalarına katkı sağlamakta ve konformasyonel hastalıkların tedavisi için yeni terapötik ajanlar olarak

gösterilmektedirler. Farmakolojik şaperonlar, ligand destekli protein katlanma mekanizmalarını kullanmaktadırlar ve enzimleri, reseptörleri, taşıyıcıları ve iyon kanallarını hedeflemektedirler. G-protein bağlı reseptörler (GCPR) de farmakolojik şaperonların hedefleri arasında yer almaktadır. G-protein bağlı reseptörlerin içerdikleri mutasyonlar da birçok konformasyonel hastalığa neden olmaktadır. Lizozomal depo hastalıkları, kistik fibroz ve NDI gibi hastalıklar üzerinde farmakolojik şaperonların tedavi etme potansiyellerinin çok büyük olduğu yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmektedir.

AVPR2 genini kodlayan dizide, NDI'ya neden olan 200'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutant reseptörlerin büyük bir kısmı doğru bir şekilde katlanamamakta ve böylece hücre kalite kontrol sistemlerine takılı kalarak, hücre yüzeyine ulaşamamaktadırlar.

Yapılan bu çalışmada, peptid olmayan antagonist OPC41061, OPC31260 ve OPC21268'in, *AVPR2*'de fonksiyon kaybına neden olduğu daha önceki çalışmalarda tespit edilen R68W, Δ R67_G69/G107W (Compound hemizigot) ve T273M mutant reseptör proteinleri üzerindeki etkileri tespit edilmiştir.

2.GENEL BİLGİ

2.1. Farmakolojik Şaperonlar

Farmakolojik şaperonlar, hedef proteine spesifik olarak bağlanan ve doğal yapısını stabilize eden, doğal olmayan bağlar kurarak hedef proteinin kendine özgü katlanmasını kolaylaştırmayı hedefleyen küçük moleküllerdir [6][7][8][9][10].

Farmakolojik şaperonlar, proteinlere elektrostatik güç, van der Waals etkileşimleri ya da hidrojen bağları ile bağlanırlar. Farmakolojik şaperonlar, hedef proteinleri yeniden katlama özelliğine sahip değildirler, fakat termodinamik açıdan dengeyi katlanmış duruma doğru kaydırırlar ve bu nedenle protein denatürasyonunu indükleyen mutasyonlar için geçerlidirler. Farmakolojik şaperonlar mutant proteinlere, protein domeyni ya da alt domeynleri arasındaki ara yüzlerde bulunan spesifik ligand bağlanma bölgelerinden bağlanırlar. Bu nedenle farmakolojik şaperonlar, özellikle bir proteini stabilize etmekte etkili olabilirler [11]. Bu bilgilerin ışığında farmakolojik şaperonların, proteinlere ve bazı mutasyonlara spesifik oldukları söylenebilir.

En çok kullanılan farmakolojik şaperonlar yanlış katlanmış enzimlere karşı yönlendirilmiş substrat temelli olanlardır. Ancak, bunlar yüksek konsantrasyonlarda iken enzimin fonksiyonunu inhibe etmenin dezavantajına sahiptirler [12]. Çünkü mutant olan enzime bağlı substrat temelli farmakolojik şaperonların nihai hedefe ulaştıklarında enzimin kendi substratı ile yer değiştirmeleri gerekmektedir. Fakat yer değiştirme zorlanacak ve kurtarma etkisini azaltacaktır [7][13]. Bunun yanı sıra, substrat benzeri olmayan, dolayısıyla inhibitör olmayan farmakolojik şaperonlar da bazı genetik bozukluklarda kullanılmaktadır. Farmakolojik şaperon uygulamalarında temel olarak 2 farklı strateji çıkmaktadır; antagonist/inhibitör ve inhibitör olmayan/agonist [13].

Antagonistler, hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri aracılığıyla hedef enzimin aktif bölgesine dönüşümlü olarak bağlanan rekabetçi farmakolojik şaperonlardır. Bu stratejide, enzimler sabit kalır, fakat bir süre için katalitik olarak aktiftirler [14]. Bununla birlikte agonist farmakolojik şaperonlar hedef proteinin aktif bölgesinden kovalent bağlar ile bağlanır ve proteini stabilize ederler.

Bunların yanı sıra, antagonistlerin ve agonistlerin etkisini arttırmayı veya azaltmayı hedefleyen allosterik uygulamalarda; şaperon rekabetsizdir ve proteinin aktif bölgesinden başka bir bölgesine bağlanır [15]. Bu farmakolojik şaperonlar hedef enzimi inhibe etmez ve dolayısıyla, aktif bölgeyi hedef alan farmakolojik şaperonlarla kombinasyon oluştururlar ki bu da yeni nesil şaperonlar için büyük bir potansiyele sahiptir [16]. Enzim kofaktörleri de başka bir farmakolojik şaperon türü sayılabilir, çünkü bir enzimin doğal kofaktörünün miktarındaki artış o enzimin, stabilize edilmesine yardımcı olabilir [17]. Bunlara ek olarak endojen ısı şok proteinleri (Hsp) ile moleküler şaperonlar indüklenerek, bazı hastalıklarda, mutant proteinler stabilize edilebilir [18].

Farmakolojik şaperon terapileri genellikle mutasyona özgüdür ve bu nedenle, aynı genetik hastalığa sahip olan tüm hastalar için kullanılamayabilir [19]. Bununla birlikte, bazı farmakolojik şaperolar mutasyona özgü değildir. Gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörü, vazopressin 2 reseptörü ve rodopsin mutant formlarının çoğu, aynı farmakolojik şaperonlar tarafından hücre kültürlerinde başarılı bir şekilde kurtarılmıştır [20]. Bu nedenle hedef enzimin farklı mutant formları olan hastaları tedavi etmek için tek bir farmakolojik şaperonun kullanılabileceği düşünülmektedir.

Farmakolojik şaperonlar, aynı zamanda proteostazis düzenleyiciler (PR) ile kombinasyon halinde de kullanılabilir [21]. Farmakolojik şaperonlar, doğal olarak katlanmış proteinlerin havuzunu stabilize ederken, PR'ler proteostazis ağ kapasitesini artırır. Bu nedenle birlikte uygulanmaları, sinerjik bir etki oluşturarak protein katlanmasına katkıda bulunabilir [22][23]. PR'ler katlanmamış protein cevabını (UPR) aktive eder ve bu durum, farmakolojik şaperonların proteinleri stabilize ederek katlanmış mutant proteinlerin havuzunu arttırmasını sağlar. Protein kalite kontrol sisteminin spesifik

hastalıklarda etkili olduğuna dair kesin mekanizmanın açıklanması, hastalar için gelişmiş bireysel tedavi seçeneklerinin tasarlanmasını sağlayabilir [24].

2.2. Farmakolojik Şaperonların Etki Konsantrasyonları

Farmakolojik şaperonların şaperonlama konsantrasyonları, ilacın maksimum etki konsantrasyonunun yarı değeri (EC_{50}) olsa da, hedef proteinlerini aktive etme ya da inhibe etme kabiliyetleri ile ligandlarına bağlanma afiniteleri (K_d) arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır. EC_{50} değeri genellikle şaperonlama için uygun olsa da, proteinin fonksiyonunu aktive veya inhibe etmesi için ihtiyaç duydukları konsantrasyon düşük potansiyele sahip olabilir [25][26][27]. Şaperonlamanın düşük potensiyeli yani olgunlaşmamış ara ürünler ile farmakolojik şaperon arasındaki etkileşimin düşük afinitesi, kendi doğal bağlanma afinitesinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır [28].

Salgı yolağı proteinleri için, ER lümenindeki protein konsantrasyonları, pH, iyonik ortam ve membran potansiyeli, farmakolojik şaperonların etkisini ve ER'deki hedefe ulaşabilmesini etkileyen ek faktörlerdir.

2.3. Farmakolojik Şaperonların Yapısal Mekanizması

Proteinler, üç boyutlu yapılarını, elektrostatik kuvvetler ile tuz köprüleri oluşturan hidrojen bağları, disülfid köprüleri içeren kovalent bağları ve kovalent olmayan etkileşimleri ile stabilize etmektedirler. Stabilizasyonun sağlanamaması ve proteinlerin yanlış katlanması sonucu hidrofobik bölgelerin yüzeyde kalması, eşlenmemiş ya da yanlış eşlenmiş sisteinlerin oluşması, olgunlaşmamış glikanların ve bazı primer amino asit sekans motiflerinin ortaya çıkması kalite kontrol sistemi tarafından tanımlanır ve stabil olmayan bu proteinler

degradasyona yönlendirilirler [29]. Farmakolojik şaperonlar antagonist ve agonist özellikleri sayesinde, ligandların katlanma verimliliğini artırarak, doğal yapıyı teşvik ederek ve proteolitik yıkımdan koruyarak hedef proteinler üzerinde stabilize edici etkilere sahiptirler [30].

Farmakolojik şaperonların mekanizmalarını temel olarak, anahtar kilit ilişkisinden yola çıkarak açıklayabiliriz. Reseptör ve ligandlar, birbirlerine özgü anahtar-kilit yapısındadırlar, bazen benzer şekle sahip bir anahtar kilide sığabilir ve dönüp kilidi açabilir (agonist), fakat bazıları kilide uygun gibi gözükse de, kilit içerisinde dönemez ve sıkışıp kalır (antagonist). Temelde mekanizmayı anlamak için güzel bir metafor olan bu yaklaşım, allosterik ligandlar (modülatör) ve ters agonistler sisteme dahil olduklarında daha karmaşık bir yapıyla karşılaşılmaktadır.

2.3.1. Rekabetçi Antagonistler/İnhibitörler

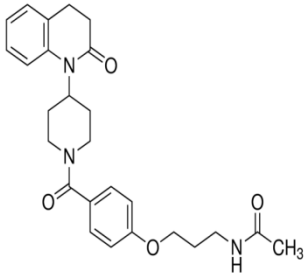
Antagonistler, vücutta bir reseptöre bağlanarak, reseptörü doğal olarak uyaran bileşiğin yerine geçer ve reseptör uyarıldığında doğal olarak meydana gelen sonucu engelleyen inhibitör bileşiklerdir. Yüksek afiniteli antagonist/inhibitör farmakolojik şaperonlar, çeşitli hastalıklara neden olan, yanlış katlanma sonucu ER'de tutuklanmış mutantların kurtarılmasında oldukça etkilidirler. Ancak bu şekilde kurtarılan proteinler, agonist aktivasyonunu veya substrat bağlanma potansiyelini önleyen antagonist/inhibitör bağlı bir durumda fonksiyonel hedeflerine ulaşamamaktadırlar. Meydana gelen bu durumu önlemek için, inhibisyona neden olan konsantrasyonlardan daha küçük konsantrasyonlar kullanılabilir [9][31][32]. Bu nedenle işlevsel kurtarma sadece farmakolojik şaperonların hedef proteinini uygun şekilde katlaması ve hedef bölgeye ulaştırması kabiliyeti değildir; Aynı zamanda antagonist/inhibitör farmakolojik şaperonların,

agonist/substratları ile yer değiştirme yeteneklerine de bağlıdır. Antagonist farmakolojik şaperonların yer değiştirmesi, özellikle reseptör ve iyon kanalları için zordur. Bunun nedeni ise birçok antagonist farmakolojik şaperonun kurtarma EC_{50} değerinin, maksimum inhibe konsantrasyon yarı değerinden (IC_{50}) yüksek olmasıdır.

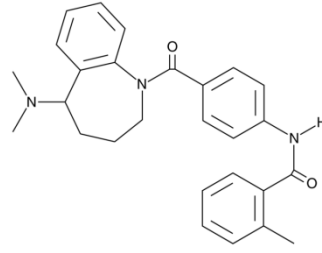
Reseptör antagonistlerin geniş bir terapötik uygulamaya sahip olup olmadığı tam olarak açık olmasa da yapılan bir çalışmada NDI hastalarının tedavisinde vazopressin 2 reseptörü antagonist YM087 (conivaptan) etkinliği insanlarda gösterilmiştir [33].

Farmakolojik şaperonların kurtarmadaki başarısını, şaperonlama için gerekli olan maruz kalma süresinin farmakolojik şaperonun yarı ömründen kısa olmasına bağlamaktadırlar [32]. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, farmakolojik şaperonlar, hedeflerinden uzaklaştırılması ya da yüksek oranda agonist/substratları [34] ile muamelesi yoluyla geri dönüşümsüz olarak etkisiz hale getirilerek hücrelerden ayırılmaktadırlar [31]. Yani farmakolojik şaperonun ortamdan uzaklaştırılması ile şaperonlanan proteinin aktif olabildiği, antagonistlerin substratlar ile yer değiştirmesinin daha kolay olabileceği bir aralık oluşmakta ve protein işlevini gösterebilmektedir [35][36]. Bu tür bir yaklaşım özellikle lizozomal depo hastalıklarında etkili olabilmekte ve enzim yer değiştirme terapileri olarak çalışılmaktadır [37][38][39].

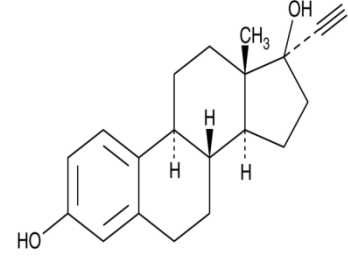
Bu tez çalışmasında kullanılan üç farklı peptid olmayan antagonist Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bunlar; tolvaptan (OPC41061), mozavaptan (OPC31260) ve OPC21268'dir.



OPC41061



OPC31260



OPC21268

Şekil 2.1. Tez Kapsamında kullanılan Farmakolojik Şaperonlar. Tolvaptan (OPC41061), Mozavaptan (OPC31260) ve OPC21268'in Kimyasal Yapıları

Tolvaptan, seçici rekabetçi arjinin vazopressin 2 reseptör antagonistidir. Böbrek toplama kanallarındaki arjinin vazopressin 2 reseptörünü bloke ederek akuaporin kanallarından suyun geri emilimini engeller. Bunun sonucunda idrar hacminde artış, idrar ozmolalitesinde azalma ve intravasküler hacmi azaltmak için serum sodyum seviyesinde artış meydana gelir. (V_2 için, $IC_{50} = 3nM$)

Mozavaptan, arjinin vazopressinin, vazopressin 2 reseptörlerine bağlanmasını antagonize eden bir benzazepin türevidir. AVP'nin antidiüretik etkisini inhibe edebilmektedir. (V_2 için, $IC_{50} = 14nM$)

OPC21268 ise peptid olmayan vazopressin V_1 reseptör antagonistidir. V_1 reseptörleri için V_2 reseptöründen 1000 kat seçicilik sergilemektedir.

2.3.2. Agonistler, Ters Agonistler, Kısmi Agonistler ve Allosterik Ligandlar

Agonistler, bir reseptöre bağlanan ve reseptörü biyolojik tepki üretecek şekilde aktive eden bileşiklerdir. Allosterik ligandlar (modülatörler) ise agonist etkinin artırılması ya da azaltılması için çeşitli yollar kullanan bileşiklerdir.

Agonist aktivasyonunu tanımlamak için kullanılan ve yaygın bir şekilde kabul gören model, reseptör/G proteini/agonist arasındaki üçlü kompleks ilişkidir. Üçlü kompleks modeli; tam, kısmi, ters agonistlerin ve nötr antagonistlerin reseptördeki sinyal iletimi üzerine etkilerini de açıklamaktadır.

Model, reseptörün işlevsel olarak farklı iki durumdan oluşan bir denge içinde olduğunu önermektedir. Bunlar, aktif durum (R^*) ve aktif olmayan (dinlenme) durumudur (R). Agonist yokluğunda bazal reseptör aktivitesi R ve R^* arasındaki denge ile sağlanmaktadır [40][41][42][43][44]. Ligandların etkinliğinde, bu iki durum arasındaki dengeyi değiştirme kabiliyetlerinin bir yansıması olduğu düşünülmektedir.

Bu model, birçok reseptörün ligand yokluğunda G proteinlerini aktive edebildiklerini ve reseptörde yer alan farklı mutasyonların, agonistten bağımsız bir şekilde aktiviteyi arttırabildiklerini göstermektedir [41][42]. Örneğin, C-terminal bölgede üçüncü hücre içi halka içerisinde meydana gelen Ala293'ün herhangi bir amino asit ile yer değiştirmesi sonucu oluşan mutasyon, daha yüksek yapısal aktivite ile sonuçlanmakta ve agonist bağımsız reseptör aktivitesinin dramatik olarak artışına neden olmaktadır. Bu nedenle reseptör, tercihen önemli konformasyonel sınırlamaların muhafaza edildiği, hücre içi moleküler ağ yapısı ile mutasyonlar sonucu G protein aktivasyonunu sağlayan anahtar yapıların etkileşiminden koruyan, inaktif konformasyonda stabilize edilmek ister.

Kullanılan agonist stratejiler, mutasyon sonucu oluşan istenmeyen reseptör aktivitesini inhibe etmek üzere mutant proteine bağlanırlar ve bu şekilde mutant reseptörü inaktif formda tutarlar. Reseptör ligandı ile karşılaştığında agonist-ligand yerdeğişimi gerçekleşerek protein aktivasyonu yeniden sağlanmaktadır. Bu şekilde agonist

uygulaması ile reseptörün aktif ve inaktif formu arasındaki denge sağlanmaktadır.

Yapılan GPCR'lerin biyofiziksel ve mutajenez çalışmalarında, rodopsin ve bir dizi ligandla aktive edilmiş GPCR'lerin R* durumunun oluşmasında Transmembran (TM) 3 ve TM6 domeynlerinin hareketlerini kapsadığı bildirilmiştir [45]. Rodopsinin aktivasyonu ile sağlanan konformasyonel değişikliklerin, ligandları ile aktive edilmiş GPCR'lerin konformasyonel değişikliklerine benzer olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte GPCR agonistleri (küçük moleküller, peptidler ve proteinler) ortak bir agonist bağlanma bölgesi içermemektedir. Farklı reseptörler için farklı aktive edici ve konformasyonel değişiklikleri indükleyen mekanizmalar oldukça farklılık göstermektedir. Sadece rodopsin GPCR'ler arasında benzersizdir. Çünkü ligandı bir ters agonist olarak reseptörlere kovalent olarak bağlanır ve foton absorpsiyonu gerçekleşir. Çok hızlı bir şekilde gerçekleşen foton absorpsiyonu ile ters agonist, tam agoniste dönüşür. Rodopsin ara formlardan geçerek metarodopsin II'ye dönüşür. Böylece bağlayıcı cebin üzerindeki agonist emilimi sağlanır. Metarodopsin II'nin oluşumu ile ilişkili yapısal değişiklikler, rodopsin R* formu oluşturmaktadır. Bu nedenle, ligand bağlanma işlemi aktivasyon sürecinin bir parçası değildir [46].

Ters agonistler dışında, katekolaminler, peptidler ve glikoproteinler gibi diffüz edilebilir agonistlerin bağlanması ile de, R* formu oluşturulmaktadır.

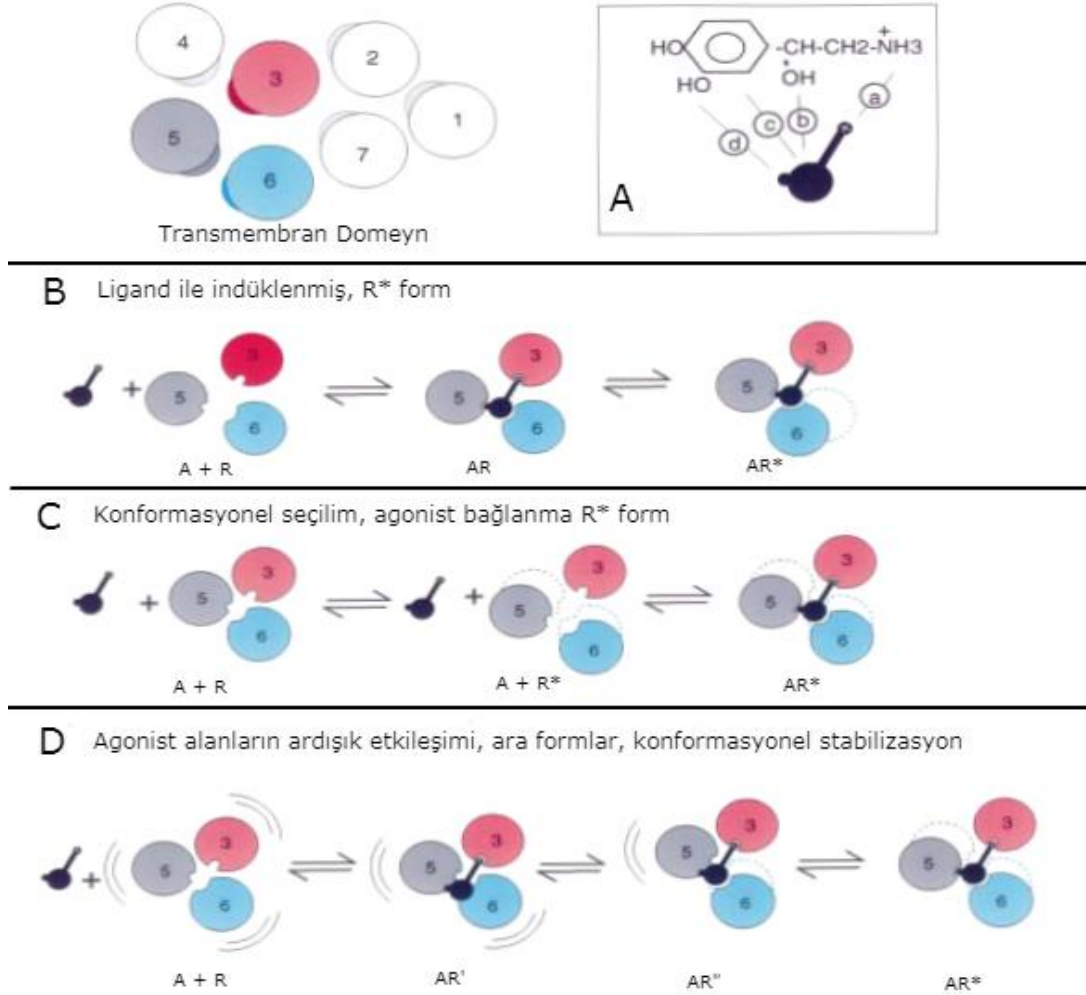
Ters agonistler tercihen R formuna bağlanır ve dolayısıyla R* formundaki reseptör popülasyonu azalır. Bu model, GPCR'lerin agonist yokluğunda bazal aktivitesini, ters agonist mekanizması ile açıklayabilir [41]. Agonistler ise tercihen R* formunda bağlanır ve dengeyi kaydırarak R* durumunda bulunan reseptör oranını artırır.

Bunların yanı sıra, tam agonistin R'ye bağlanma afinitesi agonist bağlanma birleşme oranı hızlıdır. Ancak, G protein yokluğunda agonistin uyardığı konformasyonel değişimin kinetiğinden yavaştır. Ters agonist bağlanma modeli için ilişki oranı R'den R*'ye geçişi ile sınırlıdır, çünkü agonistin sadece R*'ye bağlanabileceği tahmin edilmektedir.

$\beta 2$ adrejenik reseptör çalışmalarında, hem agonistlerin hem de ters agonistlerin, termal denatürasyona ve proteolizize karşı reseptörü koruyamadıkları gözlenmiştir [46][47].

Üçüncü model ise, şekil 2.2'de gösterilmektedir ve ligandlanmamış reseptörün oluşumu ile ortaya çıkmaktadır. R formu bu modelde iki başka duruma R* ve R₀'a geçiş yapabilmektedir. R₀ durumu ters agonistler tarafından stabilize edilmekte ve R*, agonistler tarafından stabilize edilmektedir. Mekanistik olarak bu intramoleküler etkileşimlerin liganlanmamış reseptörü sınırlamadığı ve bu nedenle termal denatürasyona ve proteolizize karşı daha duyarlı olduğu önerilerek açıklanmaktadır. Sözü edilen modelde agonist alanların bağlanması ardışık olarak gerçekleşmekte ve R ve R* arasında R' ve R'' ara ürünleri oluşturan bir dizi konformasyonel durum ile sonuçlanmaktadır. $\beta 2$ reseptör agonistleri ile yapılan çalışma sonucunda, agonistlerin, reseptör ile işlevsel olarak önemli birkaç etkileşim alanına sahip olduğu gösterilmiştir. Bağlanma, agonistin bir yapısal grubu ile reseptör arasında bir etkileşim başlatır. Ardından diğer yapısal grupların bağlanmasıyla TM etki alanlarının rastgele ve kendiliğinden hareketleri, fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimine izin vermektedir. Reseptör ve agonist arasındaki her etkileşim, reseptör aktif R* durumunda stabilize edilene kadar bir veya daha fazla TM alanını stabilize etmektedir. R₀ durumunun stabilizasyonu ile sonuçlanan ters agonistler için benzer bir model düşünüldüğünde, kısmi agonistler ara durumlardan birini (R' veya R'') stabilize edebilir ve böylece R*'ye spontan izomerizasyon veya G proteini için düşük

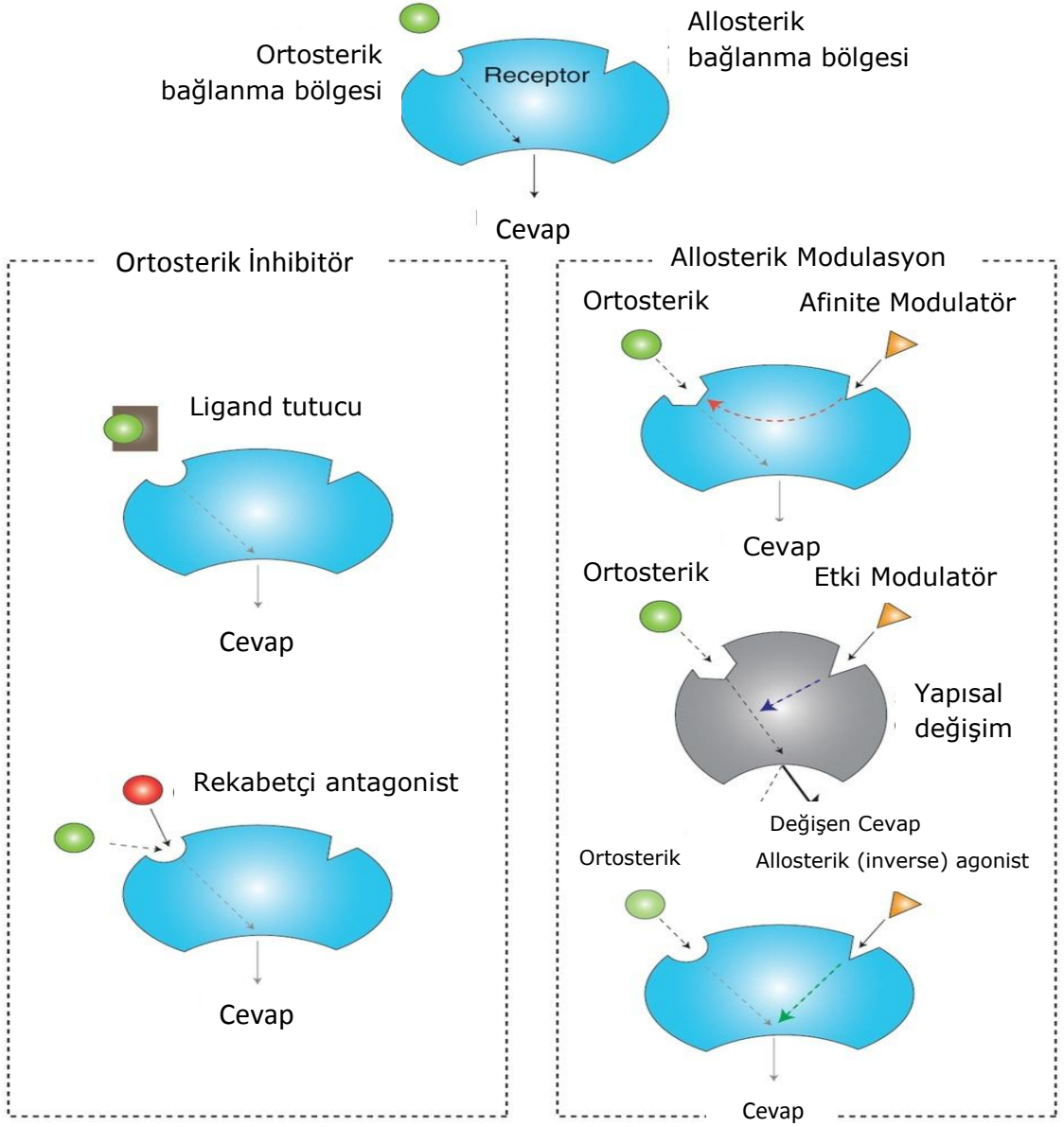
afiniteli konformasyon stabilize edilebilir. G proteini ara ürünlerden biriyle etkileşime girerek, hem agonist bağlanma afinitesini hem de konformasyonel değişimi etkiler [46].



Şekil 2.2. Agonist ve Reseptör TMD Etkileşimleri [48] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır. Agonistler ile reseptör arasındaki etkileşim, stabilizasyon ve konformasyonel değişimler gösterilmektedir. Katekolamin agonisti ile GPCR ailesi üyesi β_2 Adrejenik reseptör arasındaki etkileşim alanları (A) Agonistlerin amini veya antagonistler ile reseptör TM3 aspartat arasında kurulan tuz köprüsü (a), TM6'da Phe290 amino asidi ile aromatik katekol halkası (c) ve hidroksil arasındaki (b) etkileşim olduğu düşünülmektedir, TM5'de serin amino asidi ile katekol halkasının hidroksil grubu arasındaki etkileşim (d), Ligand ile uyarılmış konformasyonel değişim ve R* form oluşumu (B), Konformasyonel seçim ve agonist üzerindeki alanların ardışık sıra ile etkileşimi ve R* form oluşumu (C)

ve ardışık bağlanma sonucu oluşan ara ürünler ve kısmi agonistler tarafından stabilizasyonu, konformasyonel değişimler [46].

Şekil 2.3'de şematize edilen, allosterik ligandları uygun şekilde açıklamak için reseptörün nasıl bir yapıya sahip olduğunu anlamamız gerekmektedir. Reseptörler daha önceki bölümde anlatıldığı gibi anahtar kilit ilişkisi olarak tanımlanan tek bir bağlanma(kilit) bölgesine sahip değildir. Reseptörlerin üzerindeki bağlanma bölgeleri, ortosterik (rekabetçi) bölgeler ve allosterik bölgeler olarak sınıflandırılmaktadır. Ortosterik bölge, birincil bağlanma bölgesi ve allosterik bölge ise diğer (yardımcı) nesnelere için bağlanma bölgesidir. Hem ortosterik hem de allosterik bağlanma bölgelerinin kendi agonist ve antagonistleri bulunmaktadır. Bunlar bir bütün olarak reseptörün birincil mekanizmasını aktive etmektedirler. Allosterik antagonist, allosterik bağlanma bölgelerinin etkilerini aktive eder ki bu, pozitif bir allosterik bölge veya negatif bir allosterik bölge olmasına bağlı olarak, ortosterik (birincil etki) bölgenin etkisini artırır ya da azaltır. Temel olarak, pozitif allosterik ligandlar, reseptörün birincil aktivitesini arttırmak için çeşitli yollarla çalışır. Ancak kendi başlarına hiçbir etkileri yoktur. Bu durum, pozitif allosterik ligandın ortosterik agonist bağlanma ile arasındaki farkı göstermektedir [48].



Şekil 2.3. Ortosterik ve Allosterik Bağlanma [48] kaynağından yeniden düzenlenerek alınmıştır.

2.4. Farmakolojik Şaperonların Hedef Proteinler Üzerindeki Etkisi

2.4.1. Moleküler Yapıların Farmakolojik Şaperonlar ile Stabilizasyonu

Birçok hedef proteine yönelik farmakolojik şaperonların etkinliği detaylı olarak araştırılmaktadır. Genel anlamda farmakolojik şaperonların yapısal etkinliğini farklı hedef proteinler üzerinden örnekleyen, lizozomal enzimler, kistik fibrosiz TM regülatörler ve gonadotropin hormon reseptörler üzerinden çeşitli mekanizmalar tanımlanmaktadır.

Lizozomal depolama bozuklukları, sayısız lizozomal enzimde oluşan mutasyonlar sonucu oluşur. Asit- β -glukozidaz, α -galaktozidaz ve asit- α -glukozidaz enzimlerinde oluşan mutasyonlar çeşitli konformasyonel hastalıklara neden olmaktadır [49][50][51]. Farmakolojik şaperonlar, enzimlerin alt kümelerinde meydana gelen hatalar sonucu oluşan mutantlar ile yeni hidrojen bağları ve/veya Van der Waals etkileşimleri yaratarak aktif bölgelerine bağlanmakta ve yapıyı stabilize etmektedirler. Farmakolojik şaperonlar, enzimler için aktif bölge inhibitörleri (antagonistleri)dir [49][52][53]. Lizozomal enzimler genel olarak α ve β alt kümelerinde aktif bölgelere sahiptirler. Yabanıl tip α -galaktozidaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda, farmakolojik şaperonların, konformasyonel minimal değişimlere neden olduğu ve bunu da anahtar-kilit ilişkisi mekanizması ile yaptığı gözlemlenmiştir [52][54][55][56]. Bunun yanısıra, asit- β -glukozidaz, inhibitör antagonistine bağlandığında aktif bölgeye yakın halka 1 kalıntısının önemli ölçüde yeniden düzenlenmesine yol açarak, alfa helikal bir konformasyon oluşturduğunu belirtmektedirler. Bu konformasyonel yeniden düzenlemenin, indüklenmiş bir mekanizma ile enzimin aktif bölgesinde iki hidrofobik oluk ile oluşturulduğu bildirilmektedir [52][57]. Lizozomal enzimlerde farmakolojik şaperonun yapısal

mekanizmasındaki şaperonlama, enzimin ve mutantın yapısına bağı olarak, anahtar-kilit ilişkisi ya da indüklenmiş- tamir mekanizması ile gerçekleşmektedir.

Diğer taraftan oksidoredüktazlar, tirozin hidroksilazlar, triptofan hidroksilazlar, fenilalanin hidroksilazlar gibi enzimler de farmakolojik şaperonların hedeflerindedir [58][59]. Ancak, farmakolojik şaperonların belirtilen enzimler üzerindeki etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamıştır. Ancak, lizozomal enzimlerdekine benzer bir yapıya sahip oldukları bildirilmektedir. Fenilalanin hidroksilaz üzerinde yapılan çalışmada, zayıf bir inhibitör antagonist olarak mutant enzimin aktif bölgesine bağlandığı, burada hidrofobik etkileşimler yaratmak suretiyle yeni hidrojen bağlanma ağları oluşturduğu ve bu şekilde etki gösterdiği belirtilmiştir [60].

ATP bağlayıcı TM süper ailesi üyesi olan kistik fibröz TM regülatör (CFTR)'de yaklaşık %70 oranında mutasyon, proteinin karboksi-terminal bölgesinde meydana gelen yanlış katlanmalar sonucu meydana gelmektedir [61][62][63]. CFTR mutantları üzerinde etkili olduğu tespit edilen VX-809'ın klinik çalışmalarda iyileşme gösterdiği belirtilmekte ve in siliko çalışmalarda, proteinin sahip olduğu iki arayüz arasında hidrofobik bir alan oluşturarak iyileşme sağladığı tahmin edilmektedir [64][65][8] [66][67].

Gonadotropin hormon reseptöleri (GnHR), G protein bağı reseptördür. Sayısız yanlış katlanmış mutantın yol açtığı hipogonadotropik hipogonadizm konformasyonel hastalığına yol açmaktadır. TM alanları 4 ve 5 ("ölüm bölgesi") terminalinde meydana gelen yanlış katlanma kusurların oluşumuna neden olan bazı mutasyonların farmakolojik şaperonlar tarafından kurtarıldığı gösterilmiştir [68][69]. Bu mutasyonlar sistein köprüsü için önemli olan disülfid bağlarının farklı bağlanması ya da kazanılması/kaybedilmesi sonucu oluşmaktadır. Bu mutantların

kurtarılmasında, TM2 ve TM3 alanları arasındaki Asp98 ve Lys121 aminoasitleri arasında kurulan tuz köprüleri ile sağlandığı tespit edilmiştir. Bu vekil tuz köprüsü Glu90 ile Lys121 arasında doğal olarak oluşan köprü oluşumunu sağlar; böylece Asp90Lys mutasyonu elimine olmaktadır [70][71]. Başka bir mutasyon sonucu sistein kazanılması ile anormal disülfid bağı oluşumunda kısmi farmakolojik şaperon etkisi görülmüştür. GnHR mutantlarının doğru disülfid bağları ve tuz köprüleri oluşturmaları ve uygun katlanmaları için kinetik gereksinimlerine farmakolojik şaperonlar aracılık etmektedirler. G protein bağlı reseptör olan AVPR2 mutantları da TM domeynlerinde mutasyonlara sahip GnRH reseptör mutantlarına benzer şekilde TM domeynlerinin stabilizasyonu yoluyla kurtarılmaktadır [25][72][73].

Bunların dışında, farmakolojik şaperonlar multimerik reseptör proteinlerinin oligomerizasyonu sırasında oluşan hataların elimine edilmesinde de rol oynamaktadırlar. GPCR ve SLC (çözünen taşıyıcı), biyogenezin zorunlu bir adımı olarak yapısal homo ya da hetero dimerizasyon gerçekleştirmektedirler [74][75]. Oligomerizasyon kusurlu GPCR'ler ER'de tutuklu kalsa da, farmakolojik şaperon yardımı ile oligomerizasyon yeniden düzenlenerek gerçekleştirilmektedir. Örneğin, oligomerizasyon hatalı adrenerjik reseptör TM domeyni (TMD), $\alpha_{(1b)}$ -adrenerjik reseptör antagonisti tarafından stabilize edilerek, homo-oligomerizasyon yapmakta ve terminal olarak N-glukolizlenen olgunlaşmış adrejenik reseptör fonksiyonel olarak plazma membranında ifade olmaktadır [76]. Benzer bir şekilde dimerizasyon hatalı lipofilik α_1 adrejenik reseptörü, homo-dimerizasyon aşamasında ER'de takılı kalır ve farmakolojik şaperonlar bu proteinin monomerlerine bağanarak onu stabilize eder ve böylece dimerlerin olgunlaşmasına destek olurlar [77].

Oligomerizasyonla sınırlandırılmış reseptörlerin aksine birçok yanlış katlanmış mutant, oligomerizasyona karşı hassasiyetini devam ettirir ve yabancı tipteki proteinlerin üzerinde baskın negatif bir etki

yaratarak yabanıl ve mutant tiplerin ER'de tutuklanmasına neden olur. Mutant hemizigot alelden elde edilen gen ürününün, yabanıl tip gen ürünü üzerine uyguladığı baskın negatif etki, çok sayıda hastalığın altında yatan işlevsiz gen ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır [78][79][80]. Örneğin, gece körlüğü hastalığında rodopsin mutanti R23H'in hücre dışındaki baskın negatif etkileri farmakolojik şaperonlar gibi davranan retinoidler tarafından baskılanır [81]. Bunun dışında, insan opioid reseptör varyantı Cys27, Phe27 varyantı üzerinde baskın negatif etki yaratır ve bu da olgunlaşmayı bozarak degradasyona neden olur, fakat opioid reseptör antagonisti tarafından bu durumun üstesinden gelinebilmektedir [82]. Baskın negatif etkilerin neden olduğu hastalıklar ve farmakolojik şaperonların bu etkiyi hafifletme kabiliyetleri düşünüldüğünde, bu hastalıklar için uygun bir tedavi yöntemi olabileceği kanısına varılmaktadır.

Farmakolojik şaperonların kurtarma başarısı birçok farklı protein üzerinde saptanmıştır. Bu başarının artırılması için, moleküler şaperonların ve kalite kontrol sistemi proteinlerinin işlevini ve kullanılabilirliğini arttırmak gerekmektedir ki, bu rolü proteostaz düzenleyiciler (PR) üstlenmektedirler. PR'ler protein katlanmasını kolaylaştırmak, doğal olarak katlanamayan proteinlerin bozulmasını arttırarak, yanlış katlanmayı en aza indirerek protein homeostasını iyileştirmeyi hedeflerler [83]. Bu nedenle, proteostaz düzenleyiciler, farmakolojik şaperonlar ile iş birliği içinde kullanıldıklarında daha etkili sonuçlar elde edilmektedir.

2.5. Farmakolojik Şaperonlar ve Proteostaz Düzenleyicilerin Hedef Proteinler Üzerindeki İşbirliği

Proteostaz düzenleyicileri tanımlamak için ilk olarak protein katlanma sürecini yöneten proteostazı tanımlamamız gerekmektedir.

Proteostaz, ökaryotik protein homeostazıdır. Temel olarak protein sentezi, katlanması, trafiği ve degradasyonu hassas bir denge gerektirmektedir. Hücre bu dengeyi protein kalite kontrol sistemi ile sağlar ki bu sistemde, moleküler şaperonlar, ubikülin proteozom yolağı ve otofaji önemli bir role sahiptir [84]. Ökaryotik hücrelerde protein katlanmasından bir dizi hücresel bölge sorumludur. Bu bölgeler; mitokondri ve peroksizomlar, en büyük rol üstlenen endoplazmik retikulum (membran ve salgı proteinlerinin katlandığı bölge), sitozol ve çekirdektir. Protein katlanmasında oluşabilecek hata bölgesine bağlı olarak farklı stratejilerde hücre cevabı oluşturulmaktadır. Protein katlanmasındaki hata ER de meydana geldiğinde; katlanmamış protein cevabı (UPR: unfolded protein response), mitokondride meydana geldiyse; mitokondriyal UPR, çekirdek ve sitozolde meydana geldiyse; ısı-şok cevabı (HSR; heat-shock response) oluşur [22][85]. Bu cevaplar, protein homeostezindeki küçük karışıklıklar sonucu oluşur ve yanlış katlanmış proteinlerin tekrar doğru konformasyon kazanmaları için hayati bir öneme sahiptir [86].

Moleküler şaperonlar, protein kalite kontrol sistemlerinin (QCS) merkezi elemanlarıdır. Translasyondan sonra, gelişen polipeptid zinciri ile moleküler şaperonlar etkileşime girerler ve onlar doğal yapılarını almalarına yardım ederler [87]. Bir dizi korunmuş moleküler şaperon ailesi yanlış katlanmayı ve agregasyonu önlemek için sitozolik proteini yönlendirirler. Bunlar, stres proteinleri ya da ısı-şok proteinleri (Hsp) olarak adlandırılırlar ve konformasyonel stresin arttığı durumlarda büyük miktarlarda üretilirler. Bu büyük şaperon ailesi moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, and the small Hsp) [88]. HSR'nin koordinasyonunda ısı-şok faktör 1 (HSF1; heat-shock factor 1) anahtar rol oynar. Bu transkripsiyon faktörü, katlanamamış proteinin oluşturduğu hücresel

stres anında aktive edilir ve şaperonların ve katlanmayı düzenleyecek diğer moleküllerin transkripsiyonu indükler.

Yanlış katlanmış proteinler, sahip oldukları mutasyonlar sonucu doğru konfigürasyona erişemez, fonksiyonlarını kaybederler ve birçok genetik veya konformasyonel hastalığa neden olurlar [89][90][91]. Bu proteinler fonksiyonlarını, erken degradasyona uğramaları, hedef bölgelere ulaşamamaları, yapısal değişimler ve agregasyonlar nedeniyle kaybederler [70][24][92][83][93]. Yanlış katlanmış proteinler, yeniden katlanamadıklarında, ubiquitin-proteozom sistemi, otofaji ve ER-bağımlı degradasyon sistemi mekanizmaları ile degradasyona uğrar [94][95][96].

Proteostaz ağı ve protein kalite kontrol sisteminin çalışma prensibi, yanlış katlanmış protein hastalıklarına karşı yeni tedavi stratejisi yolu açmaktadır. Direkt olarak hedef proteinleri stabilize edebilecek proteostaz düzenleyicilerle ya farmakolojik şaperonlarla ya da ikisini birlikte kullanarak genetik ve konformasyonel hastalıkların tedavi edilebilmesi hedeflenmektedir [83], [96][23].

Proteostaz düzenleyiciler ve farmakolojik şaperonlar yanlış katlanmış protein hastalıklarını tedavi etmede, temelde aynı devrimsel yaklaşıma sahiptirler. Mutant proteinler üzerinde stabilizasyon etkisine sahiptirler ve bu sayede proteinler hedef bölgelere ulaşarak aktivite gösterebilirler. Elde edilen fonksiyonel düzeltme derecesi, kurtarılan proteinin mutlak miktarına, kendi iç aktivitesine ve uygun fonksiyonel lokasyondaki yeni stabilitesine bağlıdır.

Proteostaz düzenleyiciler, kalite kontrol sistemi içerisinde strese karşı oluşan cevapları aktive etmektedir. Çekirdek ve sitozolde oluşan hataları elimine etmek için, küçük moleküller, steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar [97], proteozom inhibitörleri [98][99][100], Hsp90 inhibitörleri ve insan ısı-şok faktör protein aktivatörü [101] gibi proteostaz düzenleyiciler kullanılmaktadır. ER'de oluşan strese karşı,

rapamisin [102], inozitol düşürücü bileşikler [103] gibi küçük moleküler proteostaz düzenleyicilerle otofaji ve ubikutin proteozom sistemi düzenlenerek denge sağlamaktadırlar. Bunların yanı sıra thapsigargin [104] ve curcumin [105] kullanımı ile kalsiyum sinyalini [106] düzenleyerek, proteostaz ağının kapasitesi artırılmaktadır.

Hücrede protein katlanmasının büyük bir bölümü endoplazmik retikulumun sitozolik yüzeyinde meydana gelmektedir. Çözülebilir proteinler, ko-translasyon yoluyla ER lümenine geçerler. Burada proteinin doğru ve etkili bir şekilde katlanması için sıkı bir düzenleme sistemi mevcuttur. Bu sistem Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol (ERQC) olarak tanımlanmaktadır [107].

2.6. Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol Sistemi

ERQC terimi ilk olarak Hurlley ve Helenius tarafından ifade edilmiştir. Sentezlenen moleküllerin konformasyonlarına bağlı olarak işlem süreçlerini tanımlamışlardır. Bu sistem polipeptid zincirinin stabilitesini sağlayan moleküler şaperonları, proteinlerin translasyonel sonrası değişimleri için gerekli olan enzimleri ve polipeptid zincirinin katlanmasını doğrudan destekleyen faktörleri içermektedir. ERQC sistemi fonksiyonel olarak;

- Protein olgunlaşmasına uygun ortam sağlamaktadır.
- Erken salgı yollarında homeostazı sağlamaktadır.
- Yanlış veya anormal katlanmış proteinleri degradasyona yönlendirerek agregasyonlarını önlemektedir.
- Doğru konformasyonda katlanan proteinleri hedef bölgeye taşımaktadır.

Protein katlanması ve ERQC sistemi üç alt bölüme ayrılarak şematize edilmiştir.

- Birincil Kalite Kontrol; ER-İlişkili Katlanma

- İkincil Kalite Kontrol; Taşıma Yolağı
- Üçüncül Kalite Kontrol; Hedef Hücreye Ulaşma

2.6.1. Birincil Kalite Kontrol; ER-İlişkili Katlanma

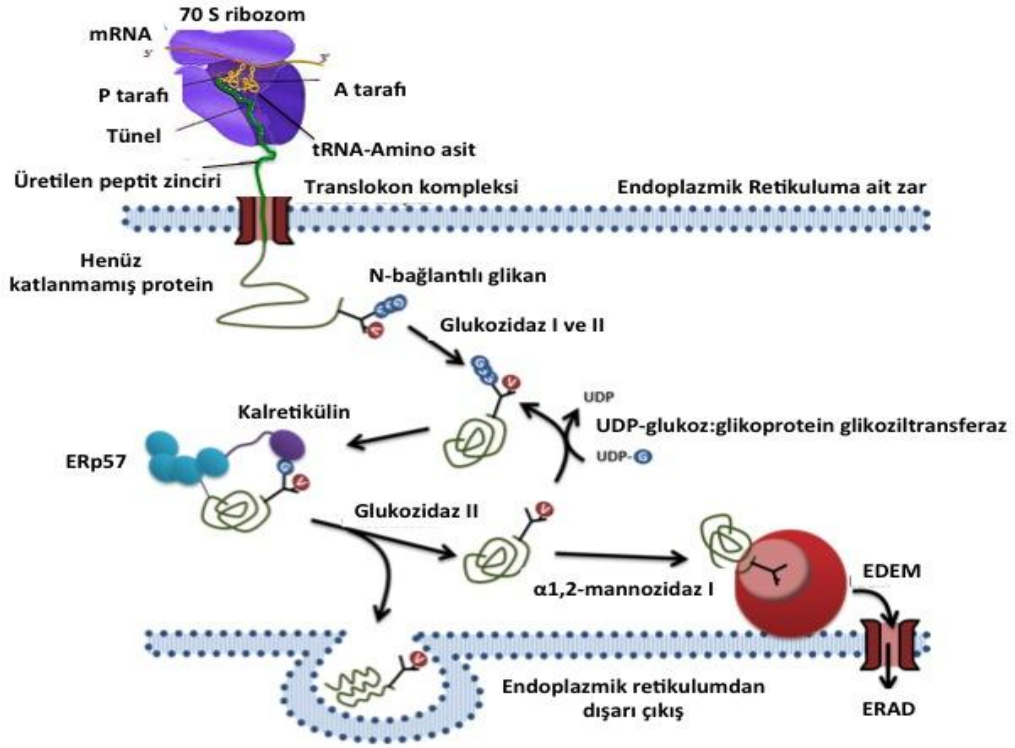
Translasyon sonrası ER lümenine geçiş yapan polipeptid zinciri stabilize edilir doğru konformasyon da katlanması sağlanır. Katlanma işleminde birçok yardımcı protein katalizör olarak işlev görmektedir. Bu proteinler moleküller şaperonlar olarak adlandırılır. ER-ilişkili moleküller şaperonlar, katlanmamış proteinleri, protein yapısı üzerinde açıkta kalan hidrofobik bölgeler, olgunlaşmamış glikanlar ve maruz kaldıkları reaktif tiyoller aracılığıyla tanımaktadırlar. Birincil kalite kontrol sistemi; ER, ısı şoku proteinleri Hsp60 ve Hsp70, kalneksin/kalretikülin sistemi (glikoproteinlerin katlanmasında), Hsp90 ve Hsp100 moleküller şaperonlarını içermektedirler.

Hsp70, ribozomdan ayrılan proteinlerin agregasyon oluşturmalarını önler [108]. Hsp70, genişleyen proteinleri poliglutaminlerle stabilize eder ve proteinlerin membrandan translokasyonunda görev alır. Bunun aksine Hsp60 ise protein katlandıktan sonra yanlış katlanan proteinlerin agregasyon oluşturmalarına engel olarak yeniden doğru katlanabilmesi için ortam oluşturur [109]. Bahsi geçen moleküller şaperonlar, ATP-bağımlı olarak proteinlere bağlanır ve serbest bırakırlar [110].

Hsp90, diğer şaperon ailelerine kıyasla daha bol miktarlarda bulunmaktadır. Kinaz ve steroid hormon reseptörlerinin olgunlaşmasında aktif rol oynamaktadır. Hsp100 ise agregasyona uğramış proteinlerin çözünürlüğünü korumaktadır.

Kalneksin ve kalretikülin, lektin benzeri şaperon proteinleridir. Glikoproteinlerin katlanmasında ve yanlış katlanmış glikoproteinlerin yeniden katlanma sürecinde rol oynamaktadırlar. Kalneksin, ER

membranına bağlı bir şaperon proteinidir. Kalretikülin ise çözünebilir ER yerleşik proteinidir. ERp57 (protein disülfid izomeraz), ER' de katlanmasını tamamlamamış proteinleri koruyarak, kalneksin ve kalretikülin ile işbirliği yapan bir başka şaperondur.



Şekil 2.4. ER-İlişkili Protein Katlanması

"<http://bilimvebilimadami.com>" internet sitesinden alınmıştır.

Şekil 2.4'de gösterilen, proteinlerin translokasyonları sırasında, asparajin amino asitinin amino grubuna, oligosakkarit zinciri transfer edilir. Bu olay N-bağlı glikolizasyondur ve oligosakkaril transferaz enzimi ile katalizlenmektedir. Eklenen oligosakkaritlerden iki glukoz, glukozidaz I ve II tarafından uzaklaştırılır. Oligosakkarit bağlanması protein katlanma durumunu işaretlemek için kullanılan bir etikettir. Kalneksin ve kalretikülin, tek glukoz ve mannoza sahip oligosakkaritleri tanır ve bağlanırlar, böylece proteini stabilize ederek

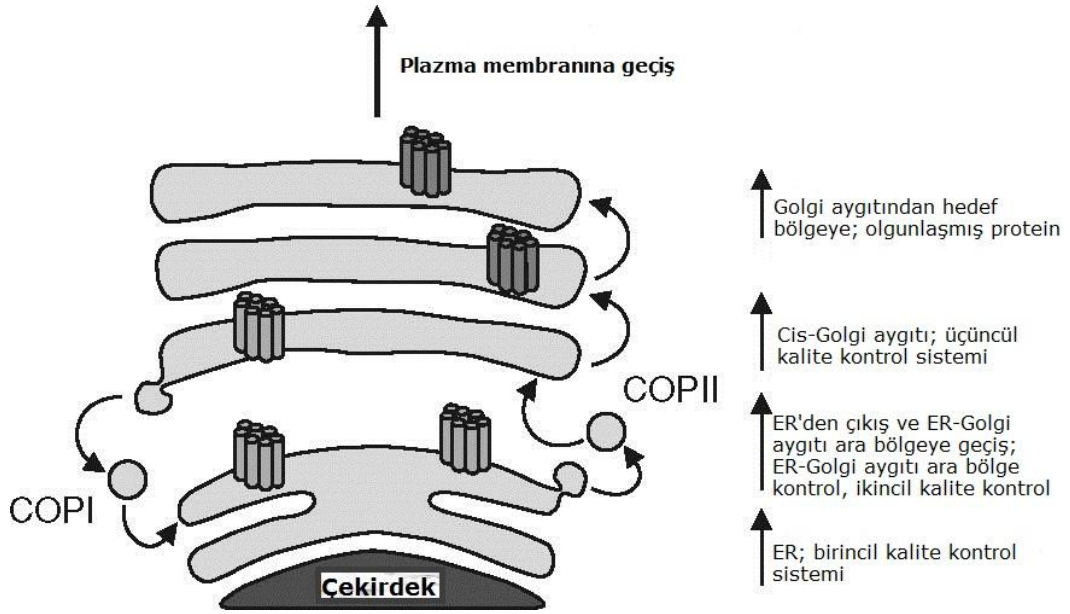
agregasyondan korurlar. Şaperonların bağlanması ERp57 bağlanmasını da teşvik eder bunun sonucunda proteinin doğal hareketi ve kendi içinde oluşturduğu etkileşimlerle doğru konfigürasyonuna ulaşması hedeflenmektedir. Üçüncü glukoz da glukozidaz II tarafından proteinden uzaklaştırıldığında, protein moleküler şaperonlarından ayrılır ve hedef bölgeye gitmek üzere ER'den çıkmaya hazırdır [111][112][113]. Şayet protein yanlış katlanmış ise glukozil transferaz bunu tanır ve bir glukoz ekleyerek, kalneksin ve kalretikülin şaperonlarının yeniden bağlanmasına izin verir. Böylece yanlış katlanmış proteinin ER'den ayrılmasını engeller. Yeniden katlanmasına izin verilen protein doğal konfigürasyonuna ulaşamazsa, 26S proteozomlarda degradasyona yönlendirilir.

2.6.2. İkincil Kalite Kontrol; Taşıma Yolağı

Doğru katlanmış proteinler ER'de de-glukozilasyona uğrar ve ER çıkış bölgelerine yönlendirilirler. Burada, vezikülleri oluşturmak için ER'yi sıkıştıran kaplama proteini COPII çukurlar meydana getirir [114]. Çukurlar vasıtasıyla oluşturulan veziküller, proteinin olgunlaşması için ER-Golgi aygıtı ara bölgesine hedeflenirler. ER-Golgi aygıtı ara kontrol (ERGIC) bölgesinde, olgunlaşan proteinin, lektin olan vesiküler integral membran proteini (VIP) ile etkileşimi sayesinde uygun katlanma tekrar değerlendirilir [115] ve ER-Golgi aygıtı ara bölmesi boyunca taşınırlar. ERGIC'in katlanma kriterini karşılayamayan proteinler, COPI vezikülleri ile ER'ye geri taşınacaktır. Şekil 2.5'de gösterilmektedir.

2.6.3. Üçüncül Kalite Kontrol; Hedef Bölgeye Ulaşma

ER Kalite kontrol sisteminin son aşaması Golgi aygıtında gerçekleşir. İkincil kontrolün yapıldığı cis-Golgi bölgesindeki, VIP ile etkileşen proteinlerin geçişine izin verilmesine benzer olarak, golgi de yer alan ve yüksek-mannoz ile glukozile edilmiş proteinler, üçüncül kalite kontrol sisteminden geçişine izin verilmektedir [116][117]. Bu bölgede, yanlış katlanmış proteinler, COPI kaplı vesküller aracılığıyla geriye doğru giden taşıma yoluyla ER'ye geri yönlendirilebilir, buna karşın doğru şekilde modifiye edilen proteinler Golgi-aygıtını geçerek olgunlaşır, daha sonra hücrede nihai hedeflerine yönlendirilir. Şekil 2.5'de gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Sentezlene Proteinlerin Modifiye Edildiği ER ve Golgi-aygıtı QC Sistemleri [118] kaynağından yeniden düzenlenerek alınmıştır.

Yukarıda ayrıntılı olarak anlatılan kalite kontrol sisteminde oluşan bir bozukluk ya da proteinlerin hatalı katlanması veya tam olarak olgunlaşmaması sonucu ilgili proteinler, QC sistemine takılı kalmakta ve işlev göreceği alana ulaşmadan degrade olmaktadır.

Bu tez çalışmasında, yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu konformasyonel hastalıklardan biri olan NDI hastalarında önceden fonksiyonel kayba uğradığı tespit edilen AVPR2 mutant proteinleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

NDI hastalığı, böbreklerde arjinin vazopressin hormonu (AVP) ile düzenlenen, suyun geri emilimi sisteminin bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda günlük idrar oluşumu 10-20 litreyi geçmektedir. Hastalığın %10'u akuaporin2 su kanalı (AQP2) geninde oluşan mutasyonlar sonucu oluşur ve konjenital NDI olarak tanımlanır. Hastalığın geriye kalan %90'lık kısmı, AVPR2 genindeki mutasyonlar sonucu oluştuğu bilinmektedir ve kalıtsal X'e bağlı NDI olarak tanımlanamaktadır.

2.7. NDI Hastalığına Neden Olan ve Endoplazmik Retikulum Kalite Kontrol Sistemine Takılı Kalan AVPR2 Mutantları

AVPR2, böbrek tübül hücrelerinin bazolateral membranında yer alan G proteinine bağlı bir reseptördür. Ligandı olan AVP, kan dolaşımı yoluyla böbreklere gelip reseptörlere bağlandığında G proteini aktive olur. Aktive olan G protein adenilat siklazı aktive eder ve ikinci haberci cAMP oluşur. Protein kinaz A, oluşan cAMP tarafından stimüle edilir ve böylece hücre içerisinde bulunan AQP2 proteinlerini fosforilleyerek, onların tetramer halinde apikal membrana yerleşmelerini sağlar. Böylece suyun geri emilimi sağlanır. Fakat AVPR2'de oluşan mutasyonlar bu mekanizmanın işlemlerini engellemektedir. Mutasyonlar yer aldıkları bölgelere göre daha ayrıntılı bir şekilde açıklanmaktadır.

2.7.1. Transmembran Domeyn Mutasyonları

AVPR2 reseptörlerinin yedi TM domeyni, ligand bağlanmasında, sinyal iletiminde ve reseptörün yapısında önemli role sahiptir [119]. AVPR2'de tanımlanan 200'den fazla mutasyonun, yaklaşık %50'sinin TM domeynlerinin birinde tanımlanmış olması şaşırtıcı değildir. Tanımlanan bu mutasyonlar, TM domeynlerinin yanlış katlanmalarına ve bunun sonucunda hidrofilik ve sitozolik bölgede hidrofobik reziduların açığa çıkmasına neden olabilmektedir. Bu şekilde, ya TM domeynlerinin α -sarmal yapısı ya da diğer TM domeynleri arasındaki etkileşim bozulabilir. Özellikle iyi korunmuş TM domeyn rezidülerinde meydana gelen mutasyonlar ciddi bir şekilde AVPR2'nin katlanmasını etkilemektedir. Bu nedenle bu tip mutant proteinler kalite kontrol sisteminin ilk basamağına takılmaktadırlar [120].

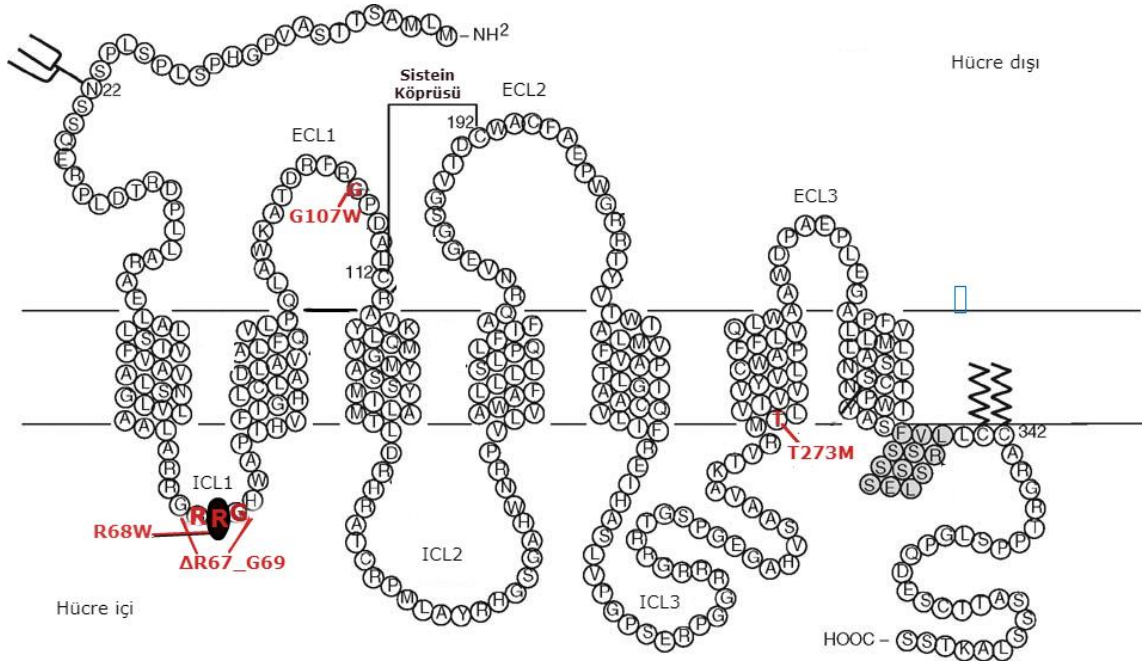
2.7.2. Sistein Mutasyonları

AVPR2'nin tahmin edilen hücre dışı halkalarında (ECL-extracellular loops) yanlış anlamlı mutasyonların yaklaşık yarısı, bir sistein rezidüsünün ortaya çıkmasına yol açmaktadır. AVPR2'de doğal olarak bulunan iki sistein rezidüsü (ECL1'de C112 ve ECL2'de C192) oluşturulur ki bunun uygun reseptör katlanmasına ve stabilitesine katkıda bulunan disülfid köprülerini meydana getirdiği tahmin edilmektedir [121]. Başlangıçta, bir mutasyon tarafından tanımlanan sisteinin, bir disülfid köprüsü oluşturmak için C112 veya C192 ile rekabet edeceği ve böylece uygun reseptör katlanmasına müdahale ettiği varsayılmıştır. Fakat daha sonra, AVPR2'deki G185C ve R202C mutasyonlarının, doğal disülfid bağı bozmaktan ziyade daha az korunan doğal olarak oluşan bir rezidü (C195) ile ikinci bir disülfid bağının oluşumunu indüklediği gösterilmiştir [122]. Bu ikinci disülfid bağının oluşumu neredeyse tamamen ligand bağlanmasını engeller, ancak AVPR2'nin genel yapısını etkilemez çünkü her iki mutant da

plazma membranında ifade olmaktadır. Diğer taraftan Y205C mutasyonu, disülfid bağ oluşumuna girmez, fakat büyük ihtimalle AVP bağlayıcı yapısını bozar ve dolayısıyla bu mutant plazma membran ifadesini ve AVP bağlanmasını etkiler [115]. Bu sistein mutantlarının tümünde korunmuş disülfid bağının oluşumu, ER'deki protein disülfid izomerazın (PDI), disülfid bağı oluşturmak üzere, korunmuş olan sistein rezidularını ve spesifik reseptör veya mutant reziduları arasındaki ayrımı yapabildiğini göstermektedir.

2.6.2.3. Hücre İçi Halka ve C-Ucu Mutasyonları

AVPR2'nin katlanmasında, C-ucunun (karboksil) proksimal bölgesinin önemi yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [115]. Proksimal C-ucunun, TM7 domeynin sitoplazmik uç kısmı ile C341 ve C342 reziduları arasındaki amfipatik heliks formu olduğu tahmin edilmektedir. Thielen ve arkadaşları, bu amfipatik heliks formunun, hücre içi halka (ICL) 1 ve 2 reziduları ile etkileşime girebileceği ve böylece reseptörün konformasyonunu stabilize edebileceğini öne sürmüştür. Bu durum da ICL1 içinde yer alan çoğu AVPR2 mutantların ER'deki tutulumunu stabilizasyonun doğru bir şekilde gerçekleşmemesi sonucu olduğu yönünde açıklanabilir. Diğer bir taraftan AVPR2'nin ICL3 bölgesi RRRGRR aminoasit dizisini içermektedir. Burada meydana gelen bir mutasyon sonucu iki tane RXR motifi oluşabilir. Bunun sonucunda sitozolik fonksiyon olarak ER'den taşınma sinyali oluşturulur ve COPII ile etkileşime girerek taşıma vezikülü oluşturmasına neden olur. Sonuçta, katlanma sürecini tamamlayamamış mutant protein ER'den ayrılıp ER-Golgi aygıtı ara bölgesine taşınır ve buradaki ikincil kalite kontrol sisteminden geçemeyerek, COPI vasıtasıyla ER'ye geri gönderilir [123].



Şekil 2.6. Tez Kapsamındaki Mutantların AVPR2 Üzerindeki Gösterimi
 AVPR2 proteini üzerindeki korunmuş sistein köprüsü, hücre içi ve hücre dışı halkalar ve tez çalışması kapsamındaki mutant amino asitler gösterilmektedir.

Tez kapsamındaki mutantlardan biri R68W'dur. R68W mutanlığı ICL1 bölgesinde oluşan yanlış anlamalı mutasyondur. Arjininin triptofana dönüşmesi sonucu normal şartlarda bazik olan rezidü, hidrofobik bir rezidü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda ER birincil kalite kontrol sisteminin, mutant proteinleri üzerinde oluşan hidrofobik bölgelerden tanıdığı bildirilmektedir [109]. R68W mutanlığında oluşan hidrofobik rezidü ile yanlış katlanmış protein olarak tanımlanmakta ve ER'de tutulu kalmaktadır. Bir diğer taraftan, Thielen ve arkadaşları, TM7 domeynin sitoplazmik uç kısmı ile C341 ve C342 rezidüleri arasındaki amfipatik heliks formunun, hücre içi halka (ICL) 1 ve 2 rezidüleri ile etkileşime girebileceği ve böylece reseptörün konformasyonunu stabilize edebileceğini öne sürmüşlerdir. Bu durum da ICL1 içinde yer alan R68W AVPR2 mutanlığının stabilizasyonu doğru bir şekilde gerçekleşmemesi ER'deki tutuklanmasını açıklayabilmektedir.

Çalışılan bir diğer mutant $\Delta R67_G69/ G107W$ compound hemizigottur ve ICL1 ve ECL1 halkaları içerisinde yer almaktadır. Bu compound hemizigot mutant 9 bazlık bir delesyona sahiptir ve bu delesyon bölgesi en sık mutasyona uğradığı belirtilen arjinin aminosidini kodlamaktadır. Erdem ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada, compound hemizigot mutantının fonksiyonel olarak AVP'ye bağlanabildiğini ancak hücre yüzeyindeki ifadelerinin yabancı tipe göre yarı yarıya bir düşüş sergilediğini ortaya koymuşlardır.

Compound hemizigot mutantını oluşturan mutasyonlardan biri ICL1 bölgesindeki 9 baz çiftlik delesyon $\Delta R67_G69$ 'dir. Bu mutantta compound hemizigot gibi AVP uyarımına cevap oluşturmakta ancak hücre yüzeyine ifade olamamaktadır. ICL1 bölgesinde oluşturduğu delesyon ile hücre içi halkayı kısaltmakta ve böylece AVPR2 proteinin stabilizasyonuna engel olmaktadır ki bu durum ER kalite kontrol sistemi tarafından alıkonulmasına neden olmaktadır.

G107W'de compound hemizigotu oluşturan bir diğer mutantıdır. Bu mutant ECL1 bölgesinde yer almaktadır. Küçük bir amino asit olan glisin, geniş yan zincirlere sahip triptofana dönüşmesi sonucu, hem aminoasit özellikleri hem de boyut bakımından ciddi değişikliğe neden olmaktadır. Fakat bu değişim mutant proteinin hücre yüzeyine ulaşmasını çok az etkilediği, yabancı tipe göre daha fazla AVP ile muamelesi sonucu mutasyonun elimine edildiği Erdem ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları çalışmada belirtilmektedir [34].

Bir diğeri ise transmembrn domeyni 6'da yer alan T273M mutantıdır. Polar yan zincire sahip treionin amino asidinin nonpolar yan zincire sahip metiyonin amino asidine dönüşmesi sonucu meydana gelmektedir. T273M mutantı da diğer mutantlar gibi ER kalite kontrol sistemine takılı kalarak hücre yüzey ifadesinde yabancı tipe oranla ciddi bir düşüş olduğu belirtilmiştir [34].

Şekil 2.6 üzerinde gösterilen R68W, Δ R67_G69/G107W ve T273M mutantları yukarıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır. QC sisteminde takılı kalarak fonksiyon kaybına uğrayan bu mutantların oluşturulması ve daha önceki bölümlerde ayrıntılı olarak tanıtılan farmakolojik şaperonlar ile muamelelerini içeren deneysel çalışmalar bir sonraki bölümde detaylıca anlatılmaktadır. Compound hemizigot Δ 67R_69G/G107W mutantını oluşturan iki mutasyon ayrı ayrı oluşturularak her birinin etkisi de deney düzeneği içerisinde araştırılmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Nadir bir hastalık olarak bilinen NDI'ye neden olan, endoplazmik retikulum ve Golgi organellerinde tutuklu kaldığı düşünülerek hastalığın oluşumunda etkili olan AVPR2 genindeki R68W, T273M ve ΔR67_G69/G107W (Compound hemizigot) mutasyonları, grubumuz tarafından daha önceki yapılan çalışmalarda fonksiyon kaybına uğradıkları tespit edilmiştir [124]. Ayrıca compound hemizigot mutantını oluşturan ΔR67_G69 ve G107W mutantlarının da, deney düzeneği içerisinde ayrı olarak farmakolojik şaperon uygulamasına verdikleri cevaplar araştırılmıştır. Yapılan tez çalışmasının amacı; NDI hastalığı üzerindeki etkisi literatüre kazandırılmış olan bu mutant proteinlere farmakolojik şaperon terapisi uygulayarak, belirtilen mutant proteinler üzerindeki etkilerini belirlemektir. OPC41061, OPC31260 ve OPC21268 farmakolojik şaperonları uygulanarak, mutant proteinler üzerindeki kurtarabilme kapasitelerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması hedeflenmektedir. Tezin amacına ve kapsamına uygun olarak yapılan deneysel yöntemler aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

1. Fonksiyonel analizleri sırasında, bölgeye uygun (site-directed) mutagenез yöntemi ile hazırlanmış olan mutant ve yabancı tip AVPR2 dizilerini içeren vektörlerin *E.coli* (DH5α) hücrelerine transforme edilmesi
2. Mutant ve yabancı tip AVPR2 dizilerini içeren memeli ifade vektörlerinin çoğaltılması
3. Mutant ve yabancı tip AVPR2 dizilerini içeren memeli ifade vektörlerinin COS-7 hücrelerine transfeksiyonu
4. Farmakolojik şaperon uygulanması
5. Mutant ve yabancı tip AVPR2 proteinlerinin hücre içi ve yüzeyindeki ifadelerinin belirlenmesi;
 - Hücre Yüzey ELISA

- Total ELISA
6. Farmakolojik şaperon uygulama sonrası COS-7 hücrelerinde ifade olan, ERQC sisteminden kurtarılan ve kurtarılamayan mutant AVPR2 proteinlerinin hücre içerisindeki lokasyonlarının floresan yöntemlerle belirlenmesi.
 7. Tez kapsamında kullanılan üç farklı farmakolojik şaperonun, mutant protein miktarları üzerinde anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığını tespit etmek ve kullanılan farmakolojik şaperonların etki sıralarını belirlemek amacıyla Tekrarlı Ölçümler Varyans Analizi (Tekrarlı Ölçümler ANOVA) yapılmıştır.

3.1. Mutant ve Yabanıl Tip AVPR2 Dizilerini İçeren Memeli İfade Vektörlerinin *E.coli* (DH5 α) Hücrelerine Transformasyonu

Grubumuz tarafından side-directed mutagenesis ile oluşturulmuş ve doğruluğu; DNA dizi analizi ile kontrol edilmiş mutant ve yabanıl tip AVPR2 dizilerini içeren plazmitler çoğaltılmıştır. Plazmitler, kompetan *E.coli*'ye transforme edilerek inkübe edilmiştir. Transformasyon işlemindeki basamaklar aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Plazmid DNA'sından 1 μ l (1 μ g/ μ l) alınıp 100 μ l kompetan hücre üzerine koyularak iyice pipetaj yapıldı.
2. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. 42°C'de 45 saniye inkübe edildi.
4. Tekrar buz üzerine alınan örnekler 1-2 dakika inkübe edildi.
5. 250 μ l SOC medium içerisine tüm örnek alınarak 1 saat boyunca 37°C'de çalkamalı etüvde inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda ampisilinli LB agar plağına ekim yapılarak 37°C de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Vektör pLV2R, ampisiline direnç genine sahip olduğu için, vektör çoğaltma işleminde ampisilinli LB agar tercih edilmiştir.

3.2. Mutant ve Yabancıl Tip AVPR2 Dizilerini İçeren Memeli İfade Vektörlerinin Çoğaltılması

Gece boyu inkübasyonda üreyen bakterilerden tek bir koloni seçilip, alındı ve 150 ml'lik ampisilinli LB broth besiyerinde 37°C'de çalkamalı etüvde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden Promega Wizard Plus SV Midipreps DNA Purification System kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı.

Promega Wizard Plus SV Midipreps DNA Purification System kit protokolü;

1. 150 ml'lik gecelik bakteri kültürü 10 dakika boyunca 7000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü.
2. Besiyeri uzaklaştırıldı ve bakteri peleti 6 ml Hücre Resüspanسیون Çözeltisi ile resüspanse edildi.
3. 6 ml Hücre Lizis Çözeltisi eklendi ve tüpler 3-5 defa ters düz edilerek karıştırıldı.
4. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. 10 ml Nötralizasyon Çözeltisi eklendi ve tüpler 5-10 defa alt üst edilerek karıştırıldı.
6. Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüj edildi.
7. İki filtre kolonu üst üste eklenerek vakum manifolduna yerleştirildi.
8. Santrifügasyon sonrası elde edilen saydam lizat (süpernatant) kolonlara aktarıldı, vakumlama işlemi ile alttaki kolon filtresine DNA'nın bağlanması sağlandı.
9. Üstte kalan kolon çıkartıldı ve altta DNA'nın bağlandığı kolon yeniden vakum manifolduna yerleştirildi.
10. 5 ml Endotoksin Uzaklaştırma Çözeltisi (etanol eklenmiş) eklendi. Çözelti tamamen uzaklaşmaya kadar vakum uygulandı.

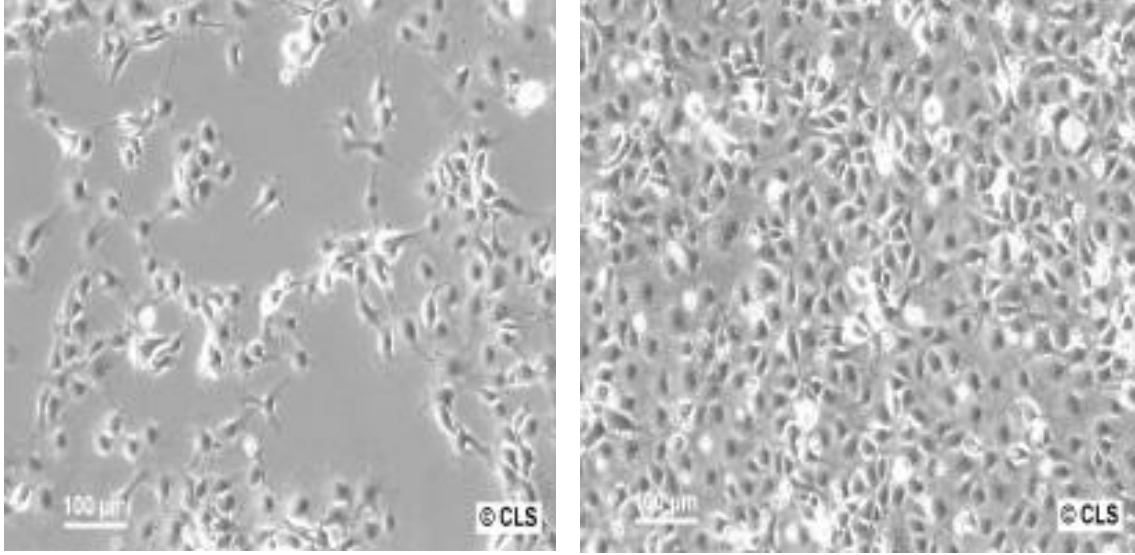
11. 20 ml Kolon Yıkama Çözeltisi ekleyip yeniden vakum uygulandı.
12. 30-60 saniye daha vakum uygulanarak, alkolün iyice uzaklaşması sağlandı.
13. Vakum Elüsyon aparatının içerisine 1,5 ml ependorf tüp yerleştirildi ve aparatla birlikte vakum manifoldunun üstüne takıldı.
14. İçerisinde ependorf tüpü olan aparatın üstüne de kolon yerleştirildi.
15. 50 ml nükleaz içermeyen H₂O kolonun üzerini tam olarak kaplayacak şekilde konuldu ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
16. Vakumlama işlemi ile kolon filtresine bağlı DNA nükleaz içermeyen H₂O ile çözülerek 1,5 ml ependorf tüpünde toplandı.

Yabani ve mutant tip DNA'lar ilerleyen çalışmalar için fazla miktarlarda elde edildi.

3.3. COS-7 Hücrelerinin Üretilmesi ve Hazırlanması

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde COS-7 hücreleri kullanılmıştır. COS-7 hücreleri Afrika güney maymunun (*Cercopithecusaethiops*) böbrek dokusundan türetilmiş, fibroblast benzeri hücre hattıdır. COS-7 hücre primer hücre değildir. İlk olarak 1980'lerin başında CV-1 hattından geliştirilmiştir. CV-1 hattı, Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) transformasyon edilmiştir. SV40 virüsü T antijenine sahiptir. Sahip olduğu bu T antijeni sayesinde önemli replikasyon özelliğine sahiptir. Hızlı ürerler ve yüksek oranda transfekte olma özelliğine sahiptirler. Transient olarak transfekte edildikten sonra fazla miktarda protein ifadesi oluşturabilecek şekilde geliştirilmiştir. Maymun böbrek dokusundan elde edilen bu hücre içerisinde maymuna ait *AVPR2* geni bulunmaktadır. Maymun *AVPR2*

geni, 253 amino asit uzunluğunda bir reseptör, insan *AVPR2* geni ile %96.8 oranında homoloji göstermektedir. Normal şartlarda ki COS-7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü Şekil 3.1’de verilmektedir.



Şekil 3.1. COS-7 Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri “Cells Line Services” internet sayfasından alınmıştır.

COS-7 hücrelerinin hazırlanması maddeler halinde verilmektedir.

- COS-7 hücreler, 25 cm² hücre kültürü kaplarında, %10 fetal bovine serum, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM besiyerinde 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 2-3 gün boyunca inkübe edilerek çoğaltıldı.
- Hücrelerin, kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayıp kaplamadığı (konfluent olmak) ışık mikroskobu aracılığıyla belirlendi.
- Konfluent olduğu tespit edilen hücrelerin çoğaltılması amacıyla, pasaj yapıldı. Pasaj için konfluent olan hücreleri yüzeyden kaldırmak için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. Bu aşamada hücrelerin zarar görmemesine özen gösterildi.
- Hücreler, 25 cm² kültür kabı için 3-5 ml, 75 cm² kültür kabı için 8-10 ml 1X DPBS kullanılarak bir kere yıkandı. Hücrelerin yıkama esnasında yüzeyden kalkmaması için, 1X DPBS ’in yüzeye direk bırakılmamasına dikkat edildi.

- 1X DPBS ortamdan uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin yüzeyden kalkması için; 25 cm² kültür kabı için 0.5 ml, 75 cm² kültür kabı için 1 ml %0.25 Tripsin-EDTA kullanıldı.
- %0.25 Tripsin-EDTA'nın kültür kabının tüm yüzeyini kaplaması sağlanarak, 37°C'de 2-3 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. İnkübasyon aşamasının süresi önemlidir, çünkü kısa süreli inkübasyon hücrelerin kalkması için yeterli olmaz. İnkübasyon süresi uzadığında ise hücreler Tripsin-EDTA'dan zarar görürler.
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra Tripsin-EDTA 'nin etkisini nötralize etmek için ortama DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) besiyeri; 25 cm² kültür kabı için 5 ml, 75 cm² kültür kabı için 15 ml olacak şekilde eklendi.
- Hücreler pipetleme işlemi ile homojen hale getirildi.
- 1 ml besiyerindeki hücre miktarı Thoma camı kullanılarak hesaplandı.

3.4. Yabancı ve Mutant DNA Dizilerini İçeren Memeli İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonu

Transfeksiyon ajanı olarak Lipofectamine® Reagent, (Thermo Fisher Scientific) ve TurboFect Transfection Reagent, (Thermo Fisher Scientific) tercih edilmiştir. Yapılan farklı deneysel çalışmalarda transfeksiyon başarıları göz önünde tutularak iki farklı transfeksiyon ajanı ayrı ayrı deneylerde kullanılmıştır.

Tüm deney sistemi içerisinde kullanılan transfeksiyon ajan miktarları, hücre sayıları ve hücre kültür kapları yapılacak olan işleme göre Çizelge 3.1'de belirtildiği şekilde kullanıldı.

Çizelge 3.1. Transfeksiyon Yöntemleri ve Kullanılan Malzeme Miktarları

Deney	Kullanılan hücre kültür kabı	Ekilen Hücre Sayısı (hücre/kuyu)	DNA miktarı	Transfeksiyon ajanı	Besiyeri
Hücre Yüzey ELISA	48 well plate	40.000	700 ng	1 μ l TurboFect	70 μ l
Total ELISA	6 well plate	400.000	250 ng	0,8 μ l Lipofectamine + 12,5 μ l Besiyeri (serumsuz)	12,5 μ l (serumsuz)
Hücre Görüntüleme	48 well plate	40.000	250 ng	0,8 μ l Lipofectamine + 12,5 μ l Besiyeri (serumsuz)	12,5 μ l (serumsuz)

Mutant AVPR2'leri ifade eden hücrelere uygulanacak farmakolojik şaperon konsantrasyonlarının belirlenmesi için Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) testi yapıldı. MTT testinin amacı; farklı konsantrasyonlarda farmakolojik şaperonlar uygulanarak toksik etkiyi en aza indirecek ve hücre canlılığını optimum seviye de tutacak konsantrasyonu belirlemektir.

3.5. AVPR2 Mutantlarına, Farmakolojik Şaperon Uygulaması için Konsantrasyon Belirlenmesi; MTT Testi

MTT testi, metiltiazol difenil tetrazolyum tuzlarının substrat olarak kullanıldığı metabolik aktivite ölçümünü hedefleyen hücre çoğalma testidir. Temel olarak, çoğalan hücrede artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu oluşan renk değişim absorbansı ELISA okuyucular

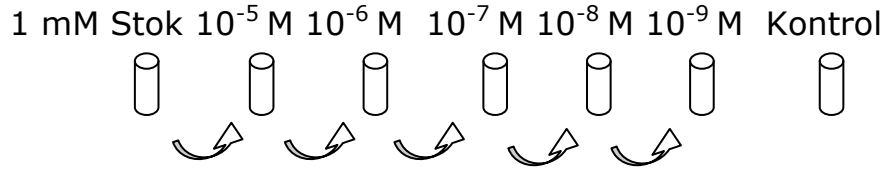
tarafından belirlenen bir yöntemdir. Yapılan MTT testi protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.

- MTT; canlılık testi için uygulanacak konsantrasyonlar literatür taraması sonucu tespit edildi. [65][76][77][117]
- 96 well plate için; 15.000 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler ekildi.
- Ertesi gün transfeksiyon işlemi;
 - 1 well için; 200 ng DNA
 - 20 µl DMEM
 - 0,4 µl Turbofect olacak şekilde yapıldı.

DNA ile transfeksiyon ajanının en iyi biçimde etkileşime girmesi için birçok kez pipetleme yapıldı. 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyon ajanı ile DNA'nın etkileşimi için belirtilen inkübasyon süresinin 20 dakikadan az veya çok olmamasına özen gösterildi.

- AVPR2 yabancı tip ve mutant DNA'larının COS-7 hücrelerinde ifade edilebilmesi için transfeksiyondan sonra hücreler 72 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Transfeksiyon işleminin kontrolünü yapabilmek için yeşil floresan proteinini ifade eden plazmid (pEGFP) kullanarak transfeksiyon eş zamanlı olarak kontrol edildi.
- Farmakolojik şaperon uygulaması için literatür taraması sonucu tespit edilen konsantrasyonlar hazırlandı. Bu amaçla ilk olarak, her bir farmakolojik şaperon 1 mM (DMSO içerisinde) stok konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok, alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır. Literatürden elde edilen bilgilere göre seyreltme işlemi için DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) kullanıldı.

1 mM stok farmakolojik şaperondan seyreltilen konsantrasyonlar aşağıda temsili olarak gösterilen şekilde hazırlandı.



- Transfeksiyondan 48 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve her kuyu için 100 μ l olarak farmakolojik şaperon uygulaması yapıldı.
- 16 ve 18 saat 37° C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, PBS içerisinde 10^{-2} M hazırlanan stok kullanıldı.
- MTT, 10:90 = MTT:DMEM (%10 FBS, 100 U/ml Penisilin ve 100 μ g/ml Streptomisin içeren) olacak şekilde hazırlandı.
- Her kuyuya 100 μ l MTT/DMEM karışımı uygulandı ve 37° C'de 4 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda MTT uzaklaştırıldı.
- %100'lük 100 μ l izopropanol eklenerek reaksiyon durduruldu ve 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3.6. Farmakolojik Şaperon Uygulaması Yapılmış Yabanıl Tip ve Mutant AVPR2'lerin Hücre İçi ve Hücre Yüzeyindeki İfadelerinin Belirlenmesi

Üç farklı farmakolojik şaperon uygulaması yapılmış yabanıl tip ve mutant AVPR2'lerin hücre içi ve hücre yüzeyindeki ifadelerinin belirlenmesi için

- Hücre yüzey ELISA
- Total ELISA
- Floresan görüntüleme yöntemleri kullanılmıştır.

N ucunda hemaglutinasyon (HA), C ucunda ise FLAG işareti taşıyan reseptörlerin farmakolojik şaperon uygulanması sonucu hücre yüzeyindeki ifadeleri ve hücre içerisindeki toplam ifadelerini belirlemek amacıyla sırasıyla, hücre yüzey ELISA ve Total ELISA

deneyleri gerçekleştirilmiştir. Farmakolojik şaperon uygulaması ile kurtarılan ya da kurtarılamayan mutant proteinlerin nerede tutuklandığı ya da ifade olarak hedefe ulaşabildiklerini gösterebilmek adına floresan görüntüleme gerçekleştirildi.

3.6.1. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi İçin COS-7 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Transfeksiyonu

- Yüzey ELISA deneyi için COS-7 hücreleri; 48 well plate'e 40.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmek üzere DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) içerisinde hazırlandı.
- Hücreler ertesi gün kontrol edilerek transfeksiyon için kullanıldı.
- Transfeksiyon basamağından önce;
Hücrelerin kuyu içerisinde homojen dağılmış olmasına,
Morfolojik olarak sağlıklı görünmelerine,
Kuyu içerisinde %70-90 oranında konfluent olmalarına dikkat edilerek işleme başlanmıştır.
- Transfeksiyon işlemi 48-well plate için Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.
- Yabani tip ve mutant AVPR2'lerin COS-7 hücrelerinde ifade edilebilmesi için transfeksiyondan sonra 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Transfeksiyonun etkinliğini gözlemleyebilmek için pEGFP ile eş zamanlı transfeksiyon gerçekleştirildi.

Transfeksiyon işlemi başarılı olduğu belirlendikten sonra hücrelere farmakolojik şaperonlar uygulandı.

3.6.2. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi İçin Farmakolojik Şaperon Uygulaması

- Uygulanan farmakolojik şaperonlar;
OPC41061 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
OPC31260 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
OPC21268 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
- MTT testi sonucuna göre her bir farmakolojik şaperon için seçilen 10^{-5} M konsantrasyon, 1 mM stok çözeltilerden uygun miktarda alınarak, DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) içerisinde seyreltilerek hazırlandı.
- Transfeksiyondan 48 saat sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp, her kuyuya yukardaki ilgili konsantrasyondaki farmakolojik şaperon eklenip, 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir farmakolojik şaperon için ayrı ayrı deneme gerçekleştirildi.

3.6.3. Yüzey ELISA Yöntemi

- 16 saatlik inkübasyon sonrası 48-well plate'deki besiyeri uzaklaştırıldı ve COS-7 hücreleri 3 defa nazikçe 200 µl 1X PBS (Phosphate bufferer saline) ile yıkandı.
- COS-7 hücreleri, hücre membranına zarar verilmeden oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %4 formaldehit içeren 250 µl 1X PBS ile fikse edildi.
- Hücreler 200 µl 1X PBS ile 3 defa nazikçe yıkandı.
- Hücreler 500 µl Blocking solution (%10 FBS ve antibiyotik içeren DMEM) eklendi ve 1 saat 37°C'de hafif çalkalanarak inkübe edildi.
- Hücreler 200 µl 1X PBS ile 3 defa nazikçe yıkandı.
- COS-7 hücreleri 2 saat boyunca 37°C'de 100 µl peroksidaz işaretli monoklonal anti-HA antikör (3F10; Roche Applied Science, Mannheim, Germany; %10 fetal siğır serum içeren DMEM

içerisinde 1:1000 konsantrasyonda olacak şekilde) ile inkübe edildi.

- Bağlanmamış olan antikoru uzaklaştırmak için hücreler 3 defa nazikçe 1X PBS ile yıkandı ve substrat reaksiyonu H₂O₂ ve o-fenilendiamin (0.1 mol/L fosfat/sitrat tamponu, pH 5.0 içerisinde her birinden 2.5 mmol/L olacak şekilde) ile gerçekleştirildi.
- 15-25 dakika sonra enzim reaksiyonu 1 mol/L HCl eklenerek durduruldu ve renk oluşumu biokromatik olarak 492 nm'de ELISA okuyucuda ölçüldü.
- Elde edilen sonuçlar, GraphPad Prism 7 programı ile grafiklendirilmiştir.

Hücre yüzey ELISA deneyi tüm aşamalarını kapsayacak şekilde üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Total ELISA Yöntemi İçin COS-7 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Transfeksiyonu

- Total ELISA deneyi için COS-7 hücreleri; 6 well plate'e 400.000 hücre/kuyu olacak şekilde DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) içerisinde hazırlandı.
- Hücreler ertesi gün transfeksiyon için kullanıldı.
- Transfeksiyon basamağından önce;
Hücrelerin kuyu içerisinde homojen dağılmış olmasına,
Morfolojik olarak sağlıklı görünmelerine,
Kuyu içerisinde %70-90 oranında konfluent olmalarına dikkat edilerek işleme başlanmıştır.

Transfeksiyon ajanı; Lipofectamine 2000 Reagent serumsuz besiyeri ile uygulama yapılmaktadır. Bu nedenle transfeksiyon işleminden önce hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri serumsuz besiyeri (DMEM) ile değiştirilmiştir.

- Transfeksiyon işlemi 6-well plate için Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Serumsuz besiyeri ile yapılan transfeksiyon işleminden sonra hücreler 5 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri uzaklaştırılarak, serumlu besiyeri DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) ile değiştirilmiştir.

- Yabani ve mutant tip AVPR2'lerin COS-7 hücrelerinde ifade edilebilmesi için transfeksiyondan sonra 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Transfeksiyonun etkinliğini gözlemleyebilmek için PEGFP ile eş zamanlı ayrı bir kuyucuğa transfeksiyonu işlemi gerçekleştirildi.

Transfeksiyon işlemi başarılı olduğu belirlendikten sonra hücrelere farmakolojik şaperonlar uygulandı.

3.6.5. Total ELISA Yöntemi İçin Farmakolojik Şaperon Uygulaması

- Uygulanan farmakolojik şaperonlar;
OPC41061 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
OPC31260 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
OPC21268 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
- Her bir farmakolojik şaperon için 10⁻⁵ M konsantrasyon, 1 mM stok çözeltilerden uygun miktarlar alınarak DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) içerisinde seyreltilerek hazırlandı.
- Transfeksiyondan 48 saat sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp, her kuyuya yukardaki ilgili konsantrasyondaki farmakolojik şaperonlar ilave edilip, 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir farmakolojik şaperon için ayrı ayrı deneme gerçekleştirildi.

3.6.6. Total ELISA Yöntemi

- 16 saatlik inkübasyon sonrası 6-well plate'deki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml 1X PBS ile nazikçe yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml saf su eklenerek hücreler yüzeyden kazınmak suretiyle kaldırıldı ve 13.000 rpm'de santrifügasyon ile su ortamdan uzaklaştırıldı.
- Yüzeyden kaldırılmış hücre peletleri 150 µl lizis tamponu (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, %1 Na-desoxycholate, %1 PMSF, 0.2 mM NP-40, 10 g/L aprotinin) içinde resüspanse edildi ve gece boyu 4°C'de rotasyon aletinde döndürülerek inkübe edildi.
- Maxisorb 96-well plateler 0.15 M borat tamponu (pH 8.0) içinde bulunan 100 µl poliklonal anti-FLAG antikör ile (M2; Sigma-Aldrich) kaplandı ve 4°C'de gece boyu inkübe edildi.
- Ertesi gün, hücre kalıntıları santrifügasyon ile uzaklaştırıldı, süpernatantlar sandviç ELISA için kullanıldı.
- Ertesi gün, plate içeriği boşaltılarak 1X PBS-T (%0.05 Tween-20 içeren 1X PBS) ile 3 defa yıkandı.
- Plateler 1X PBS-T ile yıkandıktan sonra %10 FBS içeren DMEM ile muamele edildi ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra plateler 1X PBS-T ile 3 defa yıkandı ve önceden hazırlanan hücre peletleri 300 µl 1X PBS T içerisinde çözülerek her bir kuyuya 100 µl olacak şekilde eklendi.
Deney düzeneği her bir örnek için 3 tekrarlı olacak şekilde düzenlendi.
- Plate 2 saat boyunca 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası hücreler 1X PBS-T ile 3 defa nazikçe yıkandı.
- Hücreler 2 saat boyunca 37°C'de 100 µl peroksidaz işaretli monoklonal anti-HA antikör (3F10; Roche Applied Science, Mannheim, Germany; %10 fetal siğir serum içeren DMEM

içerisinde 1:1000 konsantrasyonda olacak şekilde) ile inkübe edildi.

- Bağlanmamış olan antikoru uzaklaştırmak için hücreler 3 defa nazikçe 1X PBS ile yıkandı ve substrat reaksiyonu H₂O₂ ve o-fenilendiamin (0.1 mol/L fosfat/sitrat tamponu, pH 5.0 içerisinde her birinden 2.5 mmol/L olacak şekilde) ile gerçekleştirildi.
- 15-25 dakika sonra enzim reaksiyonu 1 mol/L HCl eklenerek durduruldu ve renk oluşumu biokromatik olarak 492 nm'de ELISA okuyucuda ölçüldü.
- Elde edilen sonuçlar, GraphPad Prism 7 Programı ile grafiklendirildi.

Total ELISA deneyleri tüm aşamalarını kapsayacak şekilde üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. Floresan Görüntüleme Çalışmaları

3.7.1. Floresan Görüntüleme Çalışmaları İçin COS-7 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Transfeksiyonu

Floresan görüntüleme deneyi; farmakolojik şaperon uygulaması sonucu ER'de veya Golgi aygıtında tutuklu kalan mutant proteinlerin ya da kurtarılan proteinlerin görsel olarak belirlenmesi yöntemidir.

- Görüntüleme çalışmaları için COS-7 hücreleri; 48-well plate'e 40.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmek üzere DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) içerisinde seyreltilerek hazırlandı. Herbir farmakolojik şaperon ER boyaması ve Golgi aygıtı boyaması için ekim yapıldı.
- Hücreler ertesi gün kontrol edilerek, transfeksiyon için kullanıldı.
- Transfeksiyon işlemi 48 well plate için Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

- Yabancıl ve mutant tip AVPR2'lerin COS-7 hücrelerinde ifade edilebilmesi için transfeksiyondan sonra 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Transfeksiyonun etkinliğini gözlemleyebilmek için pEGFP transfeksiyonu eş zamanlı olarak ayrı bir kuyucukta kontrol edildi.

Transfeksiyon işlemi başarılı olduğu belirlendikten sonra hücrelere farmakolojik şaperonlar uygulandı.

3.7.2. Floresan Görüntüleme İçin Farmakolojik Şaperon Uygulaması

- Uygulanan farmakolojik şaperonlar;
OPC41061 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
OPC31260 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
OPC21268 (stok konsantrasyonu; 1 mM)
- Her bir farmakolojik şaperon için seçilen 10^{-5} M konsantrasyon, 1 mM stok çözüldüden uygun miktarda alınarak DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) içerisinde seyreltilerek hazırlandı.
- Transfeksiyondan 48 saat sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp, her kuyuya yukarıdaki ilgili konsantrasyondaki farmakolojik şaperon eklenip, 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir farmakolojik şaperon için ayrı ayrı deneme gerçekleştirildi.

3.7.3. Floresan Görüntüleme Yöntemi

16 saatlik inkübasyondan sonra görüntüleme için hazırlanan hücreler ER-izleyici ve Golgi aygıtı-izleyici ile boyandı.

3.7.3.1. Hücrelerin ER-İzleyici ile Boyanması

- Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra 30 dakika boyunca %4 formaldehit içeren 250 µl 1X PBS ile fikse edildi.
- Fiksasyondan sonra tekrar 1X PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı ve hücrelere 250 µl 1X PBS içerisinde 1 µM ER-Tracker™Red (BODIPY® TR Glibenclamide) (Thermo Fisher Scientific) içeren boya eklendi.
- 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası boya uzaklaştırıldı ve 250 µl 1X PBST (%0.05 Tween-20 içeren 1X PBS) eklenip hücreler buz üzerinde 10 dakika boyunca inkübe edilerek permeabilize edildi.
- Hücreler 1X PBS ile yıkandı ve 1 µM DAPI (Sigma) ile 5 dakika boyunca inkübe edilerek boyandı.
- 1X PBS ile 1 defa yıkayıp, 2. defa 1X PBS eklenen hücreler EVOS Floid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) ile görüntülendi.

3.7.3.2. COS-7 Hücrelerinin Golgi Aygıtı-İzleyici ile Boyama

- Hücreler 1X PBS ile yıkandı.
- 30 dakika boyunca %4 formaldehit içeren 250 µl 1X PBS ile fikse edildi.
- Fiksasyondan sonra tekrar 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı.
- Hücrelere 250 µl 1X PBS içerisinde 5 µM Golgi-Tracker™Red (BODIPY® TR Glibenclamide) (Thermo Fisher Scientific) içeren boya eklendi.
- +4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası boya uzaklaştırıldı.
- Hücreler besiyeri ile yıkandı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

- Besiyeri uzaklaştırıldı. 250 µl 1X PBST (%0.05 Tween-20 içeren 1X PBS) eklenip hücreler buz üzerinde 10 dakika boyunca inkübe edilerek permeabilize edildi.
- Hücreler 1X PBS ile yıkandı ve DAPI (Sigma) ile 5 dakika boyunca inkübe edilerek boyandı.
- 1X PBS ile 1 defa yıkayıp, 2. defa 1X PBS eklenen hücreler EVOS Flouid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) ile görüntülendi.

3.8. Farmakolojik Şaperonların Etkilerinin Tespiti İçin Yapılan Tekrarlı Ölçümler Varyans Analizi (Tekrarlı Ölçümler ANOVA)

Bir araştırmada/denemede bir ya da daha fazla faktöre bağlı olarak çok tekrarlı yapılmış ölçümler arasında farklılıkların tespiti için "Tekrarlı ölçümler varyans analizi" kullanılmaktadır. Tez kapsamında üç tekrarlı yapılan çalışmalarda, üç farklı farmakolojik şaperonun NDI hastalığına neden olduğu tespit edilmiş beş farklı mutasyon üzerinde hücre yüzey ELISA ve total ELISA protokolleri kullanılarak, absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler SPSS 23 programı kullanılarak Tekrarlı Ölçümler ANOVA analizi yapılmıştır. Böylece kullanılan farmakolojik şaperonların, mutant proteinler üzerindeki kurtarma başarıları tespit edilmiştir.

3.9. İstatistiksel Testler

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışma sonuçlarının anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar SPSS 23 programıyla yapılmıştır. SPSS 23 programı içerisinde paket programlar kullanılmıştır. Tez kapsamındaki farmakolojik şaperonların etkilerinin tespiti için yapılan hücre yüzey ELISA ve total ELISA deneyleri için Tekrarlı Ölçümler ANOVA testi yapılmıştır. Üç farklı

farmakolojik arasında farkı gözlemek için Tekralı Ölçümler ANOVA testi kıyaslama yapılabilmesi için tercih edilmiştir. DMSO kimyasal şaperonun $\Delta R67_G69/G107W$ mutasyonu üzerinde gözlenen farklılığın anlamlılığını test edebilmek için Tek-örnek T testi uygulanmıştır. "<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest2>" web uygulaması kullanılarak Tek-örnek T testi yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Mutant proteinler üzerinde üç farklı antagonist farmakolojik şaperon uygulaması yapılmıştır. Beril ERDEM'in tez çalışması kapsamındaki R68W, Δ R67_G69/G107W, Δ R67_G69, G107W ve T273M mutant proteinlerin fonksiyon analiz çalışma sonuçları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak; Erdem ve arkadaşlarının yapmış olduğu cAMP deney sonuçlarına göre fonksiyon kaybına uğrayan mutant proteinler kullanılmıştır ve cAMP birikim testine ait sonuçlar Çizelge 4.1'de belirtilmektedir[124].

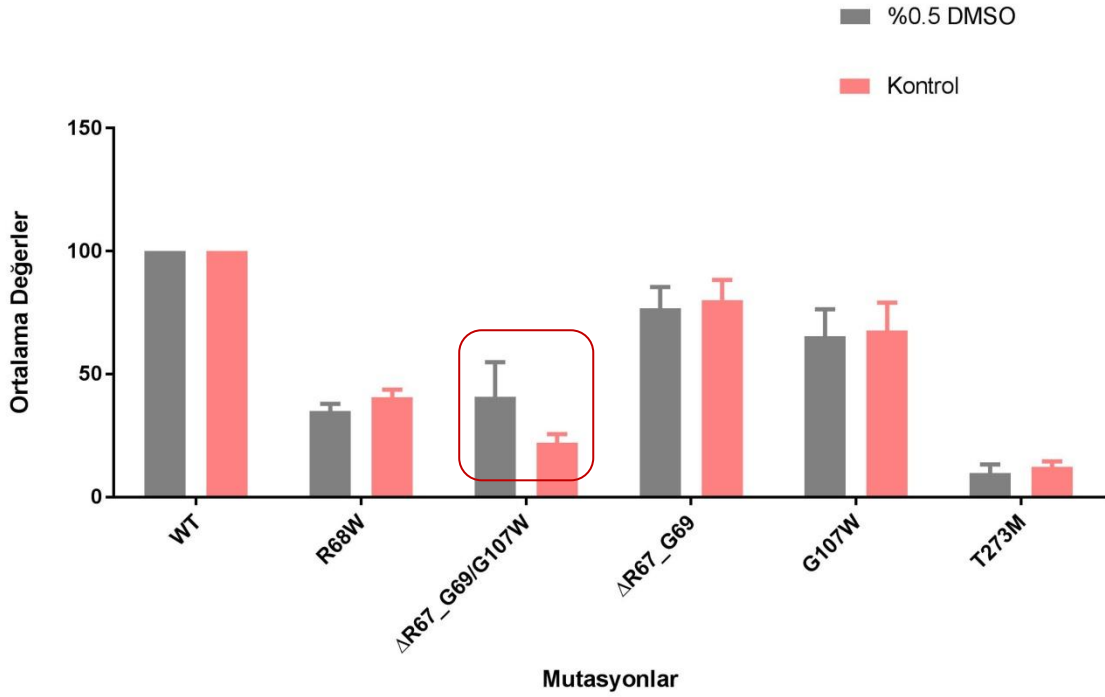
Çizelge 4.1. Yabanıl ve Mutant Tip AVPR2 cAMP Sonuçları [124]Kaynağından alınıp yeniden düzenlenmiştir.

	E_{max} (%WT)			EC₅₀ (nM)		
	Ortalama	STD	SEM	Ortalama	STD	SEM
WT	100 (9)			0.4 (9)	0,29	0,01
R68W	51.2 (9)	16,5	5,5	0.28 (9)	0,15	0,05
Δ R67_G69/G107W	62.7 (8)	29,7	10,5	44 (6)	18	7,4
Δ R67_G69	92.3 (9)	54,2	18,0	0.39 (8)	0,23	0,08
G107W	77.4 (9)	36,4	12,1	0.28 (9)	30	10
T273M	49.7 (3)	14,3	8,2	31 (3)	30	18

Kontrol grubu ile farklı farmakolojik şaperon uygulanma sonuçları karşılaştırılarak, farmakolojik şaperonların mutant proteinler üzerindeki kurtarma başarısı elde edilen sonuçlar ile gösterilmeye çalışılmıştır.

Ancak kullanılan farmakolojik şaperonlar DMSO içerisinde hazırlanmıştır. DMSO, protein ve mutasyonlara özgül olmayan kimyasal bir şaperondur. Farmakolojik şaperon uygulamasın da DMSO'nun şaperon olarak uygulama içerisinde etkisinin olup olmadığını tartışabilmek için daha önceden ekibimiz tarafından yabanıl

ve mutant proteinler üzerine sadece DMSO (%0,5) uygulaması yapılmıştır.



Şekil 4.1. %0,5 DMSO'nun Mutant Proteinler Üzerindeki Etkisi. Kırmızı halka içerisinde belirtilen $\Delta R67_G69/G107W$ mutanıtı üzerinde gözlemlenen farklılığın anlamlı olup olmadığı tek örnek T testi ile belirlenmiştir.

Mutant proteinler ve kontrol grubu üzerinde %0,5 DMSO uygulaması sonucu Çizelge 4.1'de belirtilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre %0,5 DMSO uygulamasının dikkate değer bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle farmakolojik şaperonların DMSO içerisinde hazırlanması ve uygulanması nedeniyle, uygulamanın başarısını etkileyeceği düşünülmemektedir. %0,5 DMSO'nun $\Delta R67_G69/G107W$ mutasyonu üzerinde gözlenen farklılığının anlamlılığını test etmek için Tek örnek T testi yapılmıştır. Çizelge 4.2'de Tek örnek T testi sonucuna göre %95 güven aralığında $P=0,6544$ olarak

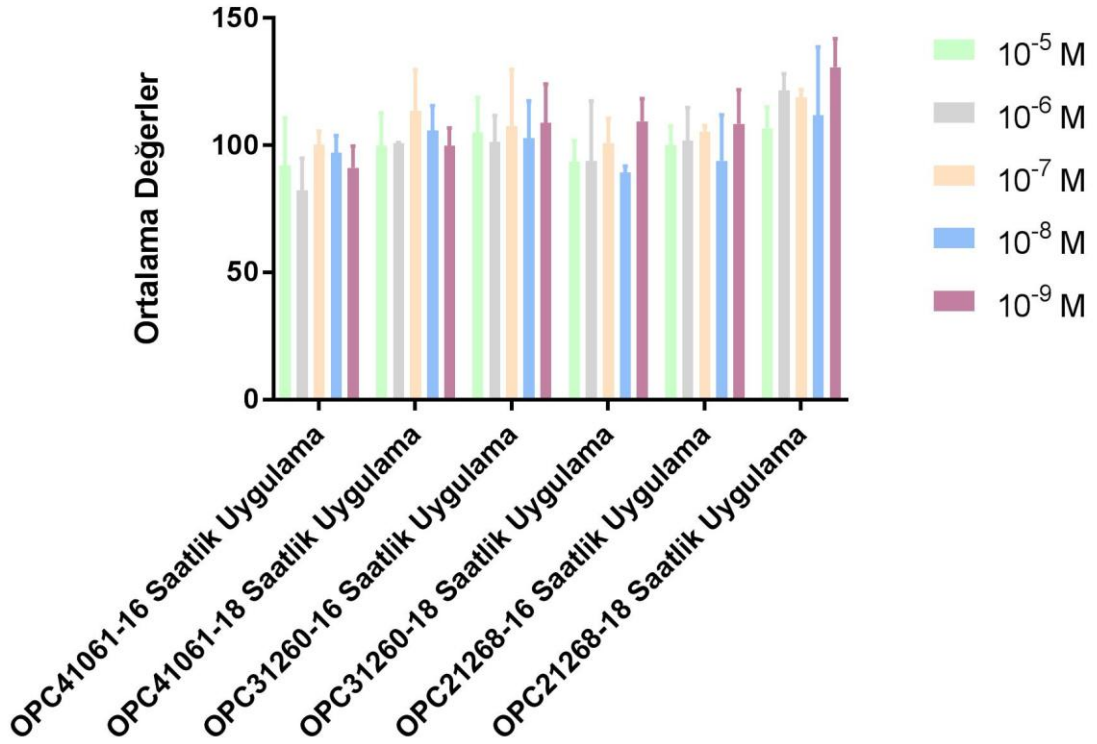
hesaplanmıştır. Bu sonuç %0,5 DMSO'nun $\Delta R67_G69/G107W$ üzerinde de anlamlı bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 2. %0,5 DMSO için Tek Örnek T Testi Sonucu

Grup	Kontrol	% 0,5 DMSO
Ortalama	16,22300	21,55200
SD	11,40382	15,33904
SEM	6,58400	8,85600
N	3	3
Ortalama değerler kullanılarak hesaplananlar: $t = 0.4829$, $df = 4$		

Farmakolojik şaperon uygulaması öncesi MTT testi kullanılarak uygun konsantrasyon ve inkübasyon süresi belirlenmiştir. 10^{-5} M- 10^{-9} M aralığında konsantrasyonlar, 16 ve 18 saat boyunca ayrı ayrı inkübe edilerek denenmiştir. Şekil 4.2'de belirtildiği gibi tüm farmakolojik şaperonlar göz önüne alınarak, MTT testi sonucunda 10^{-5} M konsantrasyon ve 16 saat inkübasyon süresinin uygun olduğu tespit edilmiştir.

MTT Testi - 16 ve 18 Saatlik Dozaj Çalışma Sonuçları



Şekil 4.2. MTT testine ait grafik. 16 ve 18 Saatlik Dozaj Uygulama Sonuçları

Hücre yüzey ELISA ve Total ELISA sonuçları üzerinden istatistiksel test yapılmıştır. Yapılan Tekrarlı Ölçümler ANOVA Testi sonucu elde edilen verilere göre kullanılan üç farklı antagonistin, mutant proteinler üzerinde farklı pozitif etkilere sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Tekrarlı Ölçümler ANOVA Testi Mutant Proteinlerin Uygulama Sonrası Ortalama Değerler

İstatistiksel Tanımlama				
	Mutasyonlar	Ortalama	Std. Sapma	N
WT	OPC41061	100.0000	.00000	3
	OPC31260	100.0000	.00000	3
	OPC21268	100.0000	.00000	3
	Total	100.0000	.00000	9
ΔR67_G69	OPC41061	86.9900	7.06946	3
	OPC31260	81.5467	3.08276	3
	OPC21268	77.7233	6.80449	3
	Total	82.0867	6.53531	9
R68W	OPC41061	80.3867	5.36754	3
	OPC31260	74.1633	4.84319	3
	OPC21268	55.8267	7.88458	3
	Total	70.1256	12.28324	9
G107W	OPC41061	85.9100	2.09616	3
	OPC31260	82.0067	3.49453	3
	OPC21268	73.0867	14.80072	3
	Total	80.3344	9.55624	9
T273M	OPC41061	74.3800	8.22467	3
	OPC31260	27.7900	4.17518	3
	OPC21268	11.8833	5.70754	3
	Total	38.0178	28.64610	9
ΔR67_G69/G107W	OPC41061	48.5200	9.31496	3
	OPC31260	58.0967	47.65273	3
	OPC21268	49.2433	33.95613	3
	Total	51.9533	29.98282	9

Çizelge 4.4. Tekrarlı Ölçüm ANOVA Testi Yabanıl ve Mutant Tip Proteinler Üzerindeki Üç Farklı Farmakolojik Şaperon Ortalamaları

Ortalamalar				
Mutasyonlar	Ortalama	Std. Hata	%95 Güven Aralığı	
			En Düşük Bağlanma	En Yüksek Bağlanma
OPC41061	79.364	2.659	72.858	85.871
OPC31260	70.601	2.659	64.094	77.107
OPC21268	61.294	2.659	54.787	67.801

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de farmakolojik şaperon uygulama sonra mutant proteinler miktar ortalamaları ve farmakolojik şaperon başarı sıralamaları yapılan istatistiksel test ile belirlenmiştir. Çizelgelerde belirtildiği gibi OPC41061 en başarılı olan farmakolojik şaperondur. Onu takiben sırasıyla OPC31260 ve OPC21268 antagonistlerinin etkili olduğu belirlenmiştir

Çizelge 4.5. Çoklu Varyasyon Testleri ile Antagonistler Arasındaki Farklar

Çoklu Varyasyon Testleri						
Etki		Değer	F	Hipotez df	Hata df	Sig. (P)
Farmakolojik Şaperonlar	Pillai's Trace	.997	145.896 ^b	5.000	2.000	.007
	Wilks' Lambda	.003	145.896 ^b	5.000	2.000	.007
	Hotelling's Trace	364.740	145.896 ^b	5.000	2.000	.007
	Roy's Largest Root	364.740	145.896 ^b	5.000	2.000	.007
Farmakolojik Şaperonlar* ve Mutasyonlar	Pillai's Trace	1.607	2.457	10.000	6.000	.142
	Wilks' Lambda	.006	4.933 ^b	10.000	4.000	.069
	Hotelling's Trace	67.779	6.778	10.000	2.000	.135
	Roy's Largest Root	66.131	39.678 ^c	5.000	3.000	.006

Uygulanan antagonistler arasındaki farkı belirlemek için yapılan testler Çizelge 4.5'de gösterilmektedir. SPSS programı tarafından yapılan üç farklı istatistiksel testler sonucu aynı Sig.(P) değeri elde edilmiştir. P=0,007 değeri, mutant protein miktarları üzerinde kullanılan antagonistler arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Farmakolojik şaperonlar ve mutant protein miktarları arasında değişen farklılıklar gözlenmektedir. Uygulanan Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace, Roy's Largest Root testlerinde elde edilen P değerleri arasında farklı sonuçlar hesaplanmıştır. Pillai's Trace ve Hotelling's Trace testlerinde sırasıyla P=0,142 ve P=0,135

değerleri göstermektedir ki mutant protein miktarları ile farmakolojik şaperonlar arasında anlamlı bir fark oluşmamaktadır. Ancak, Wilks' Lambda testinde $P=0,069$ ve Roy's Largest Root testinde $P=0,006$ 'dır. Bu da farmakolojik şaperonların mutant proteinler miktarları üzerinde ciddi bir etkiye sahip olduklarını göstermektedir.

Antagonistlerin oluşturdukları farklar karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.6'de belirtilmektedir.

Çizelge 4.6. Farmakolojik Şaperonların Karşılaştırma Değerleri

Farmakolojik Şaperonların Karşılaştırılması						
(I) Mutasyonlar	(J) Mutasyonlar	Ortalama Farklılıklar (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	Farklılıklardaki ^b %95 Güven Aralığı	
					Lower Bound	Upper Bound
OPC41061	OPC31260	8.764	3.761	.176	-3.599	21.127
	OPC21268	18.071*	3.761	.009	5.707	30.434
OPC31260	OPC41061	-8.764	3.761	.176	-21.127	3.599
	OPC21268	9.307	3.761	.144	-3.056	21.670
OPC21268	OPC41061	-18.071*	3.761	.009	-30.434	-5.707
	OPC31260	-9.307	3.761	.144	-21.670	3.056
Tahmini orijinal ortalamalara göre düzenlenmiştir.						
*. Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır.						
b. Çoklu Karşılaştırma için: Bonferroni Testi.						

Antagonistler arasında yapılan karşılaştırılma testi sonucu OPC41061 ve OPC21268 arasında $P=0,009$ değerinde açık bir fark oluşturduğu gösterilmektedir. Ancak OPC31260, OPC41061 antagonistleri arasında $P=0,176$ olarak belirlemiş bu da anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Buna ek olarak, OPC31260 ile OPC21268 antagonistleri arasında elde edilen $P=0,144$ değeri bu iki antagonist arasında da anlamlı bir fark oluşturmadığını saptamaktadır. Bu durum kullanılan antagonistlerin etki sıralaması ile açıklanabilmektedir. Mutant proteinlerin üzerindeki kurtarma başarısını sıraladığımızda ilk

sırayı OPC41061'de almakta, onu takiben OPC31260 ve en son sıra da OPC21268 bulunmaktadır. Bu sıralama da OPC41061 ile OPC21268 arasındaki etki farkı daha büyük olduğu gözlenmektedir. Ancak OPC31260 her iki antagonistte yakın değerler vermekte ve kıyaslandığında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır.

En başta belirtmek gerekir ki uygulamalar direk olarak hücreye uygulandığından sonuçlar fazlasıyla iyimser görülebilmektedir. Ancak daha ileriki deneysel çalışmalara geçildiğinde örneğin, model hayvanlar ve klinikte bireyler üzerinde yapılan denemelerde aynı etkilerin görülüp görülemeyeceği günümüzde araştırılmaya devam edilmektedir. Buna ek olarak hücre içerisindeki toplam protein miktarı ile hücre yüzeyine ulaşan protein miktarı arasında farklar olduğu görülmektedir. Çünkü total ELISA deneylerinde antikolar hücre içerisindeki tüm proteinlere bağlanmakta ve bağlanma sonucu oluşan absorbans değeri yabancı tip ile aynı olabilmektedir. Hücre içerisindeki toplam protein miktarı içerisinde degradasyona giden ya da katlanması için ikinci bir şans daha verilecek olan proteinlerde mevcuttur. Ancak bu proteinlerin bir kısmı direk bir kısmı ise doğru katlanması için ikinci bir şansa verildikten sonra gene başarısız olan proteinler degradasyona gönderilmektedir. Bu nedenle total ELISA deneyi ile tespit edilen proteinlerin bir kısmı degradasyon ile elimine edilmekte ve böylece hücre yüzey ELISA deneylerinde elde edilen sonuçlarında da görüldüğü gibi hücre içerisinde tespit edilen tüm mutant proteinler hücre yüzeyine ulaşamamaktadırlar.

Hücre Yüzey ELISA sonuçlarına göre kullanılan bu üç farmakolojik şaperonun mutant proteinlerin hücre yüzeyinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. En yüksek etkiyi OPC41061 göstermektedir ve onu sırayla OPC31260 ve OPC21268 takip etmektedir.

Genel olarak hücre yüzey ELISA sonuçlarına bakıldığında; OPC41061, T273M ve R68W mutant proteinlerinin hücre yüzeyindeki miktarını yaklaşık üç kat arttırmıştır. Δ R67_G69 mutantının hücre yüzey miktarını %27,71 oranında pozitif yönde arttırırken, G107W mutant proteinin hücre yüzey miktarını ise yaklaşık %8,3 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

OPC31260, en fazla kurtarmayı R68W mutanti üzerinde göstermiş, 2,62 kat hücre yüzey miktarını arttırmıştır. G107W mutanti üzerinde %4,4'lük ve Δ R67_G69 üzerinde %22,2'lik kurtarma sağlamıştır. En az etkiyi T273M üzerinde göstermiştir ki, uygulama yapılmaksızın hücre yüzey miktarı %27,3 iken, uygulama sonrası sadece %27,8 oranında elde edebilmiştir.

OPC21268, R68W, Δ R67_G69 üzerinde pozitif bir etki sağlamış olup Δ R67_G69/G107W, G107W ve T273M mutantları üzerinde negatif etki göstermiştir.

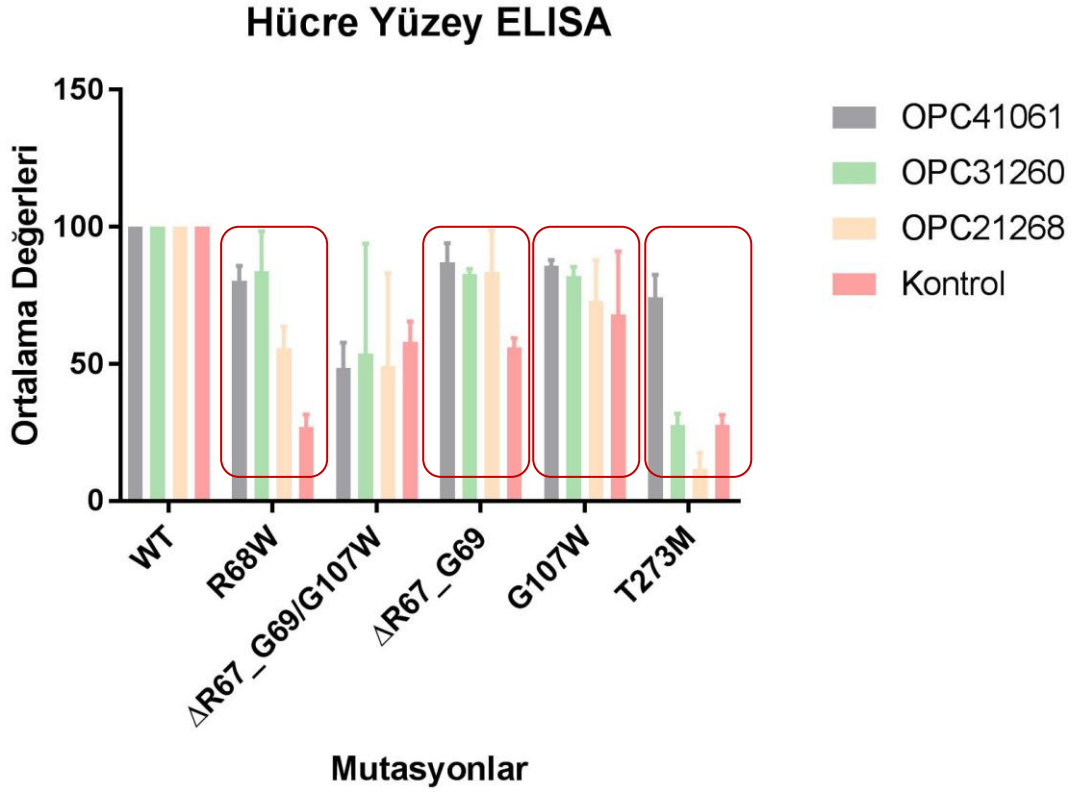
Bunlarla birlikte, her üç farmakolojik şaperonda, compound hemizigot mutant proteini üzerinde negatif etkiye sahiptir. Farmakolojik şaperon uygulaması olmaksızın %68 oranında hücre yüzeyine ulaşabilirken, uygulama sonrası yaklaşık olarak %10-20 aralığında yüzeye ulaşan protein miktarında azalma gözlemlenmiştir.

Tüm mutant proteinlerin üç tekrar olarak gerçekleştirilen hücre yüzey ELISA sonuçları, WT %100 kabul edilerek diğer mutantların kurtarılmadaki yüzdelik oranları hesaplanarak Çizelge 4.7 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kontrol ve Farmakolojik Şaperon Uygulama Hücre Yüzey ELISA Sonuçları

	OPC41061		OPC31260		OPC21268		Kontrol
	Ortalama	STD	Ortalama	STD	Ortalama	STD	Ortalama
WT	100	0	100	0	100	0	100
R68W	80,4	5,4	74,2	4,8	55,8	7,9	28,3
ΔR67_G69 /G107W	48,5	9,3	58,1	4,7	49,3	34	68
ΔR67_G69	87,01	7,1	81,5	3,1	77,7	6,9	59,3
G107W	85,9	2,1	82	3,5	73	14, 8	77,6
T273M	74,3	8,2	27,8	4,2	11,9	5,7	27,3

Farmakolojik şaperon uygulaması sonrası, hücre yüzey ELISA üç tekrarlı sonuçların ortalaması alınarak mutant proteinler üzerindeki yüzdelerdeki ifadeleri ve kontrol amaçlı PC uygulaması olmaksızın mutant proteinlerin yüzdelerdeki hücre yüzey miktarları gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Hücre Yüzey ELISA Sonuç Grafiği. Hücre yüzey ELISA sonuçları üzerinden; farmakolojik şaperon uygulaması sonrası ve uygulama yapılmadan mutant proteinlerin hücre yüzeyindeki miktarları grafik üzerinde karşılaştırılmalı gösterilmiştir. Kırmızı kare içine alınlar Tekrarlı Ölçümler ANOVA testine göre anlamlı sonuç vermektedir.

Total ELISA sonuçlarına göre genel anlamda farmakolojik şaperonların başarı sırası, hücre yüzey ELISA sonuçlarından farklıdır ve en etkiliden başlayarak OPC31260, OPC21268 ve OPC41061 şeklinde sıralanmaktadır. OPC41061, OPC31260 ve OPC21268 farmakolojik şaperonlarının, R68W ve ΔR67_G69 mutant proteinlerinin hücre içi toplam miktarını arttırdığı gözlenmiştir. Aynı şekilde compound hemizigot mutanti üzerinde de üç farmakolojik şaperon küçük çapta da olsa hücre içi toplam miktarını arttırmaktadır. Bunların aksine üç farmakolojik şaperon da genel olarak, G107W mutanti ve T273M mutanti üzerinde negatif etki göstermektedir.

OPC41061 farmakolojik şaperonu, R68W mutantının hücre içi toplam miktarını %85,6'dan %100'e, Δ R67_G69 mutantının toplam miktarını %82'den %100'e, compound hemizigot mutanın hücre içi toplam miktarını ise %91,6'dan %95,6'ya çıkartmıştır. Ancak G107W mutantının hücre içi toplam miktarını %90,4'den %83,9'e ve T273M mutant proteinin hücre içi toplam miktarının %94'den %86,3'e düşmesine neden olmuştur.

OPC31260 farmakolojik şaperonu R68W mutantının hücre içerisindeki toplam miktarını %14,4 oranında arttırmıştır ve bu nedenle R68W mutantı için, üç farmakolojik şaperon arasından mutant proteinin hücre içi toplam miktarını arttırmak açısından en başarılı farmakolojik şaperon olarak belirlenmiştir. Δ R67_G69 mutantının hücre içerisinde %18 daha fazla miktarda elde edebilmesini sağlamıştır. Compound hemizigot ve G107W mutantları üzerinde ise sırasıyla %4,6 ve %3,3 oranında hücre içi toplam miktarlarını arttırmıştır. OPC31260, belirtilen bu pozitif etkilerinin yanı sıra sadece T273M mutant proteini üzerinde %4'lük hücre içi toplam miktarını azaltmıştır.

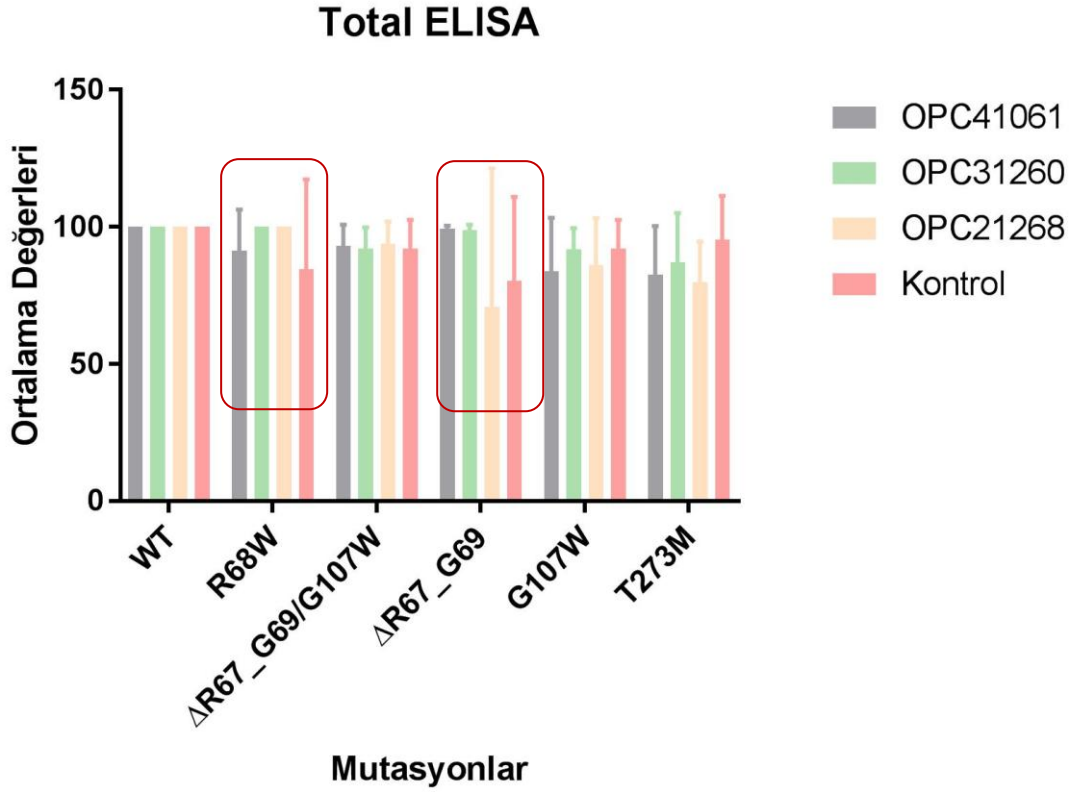
OPC21268, R68W ve Δ R67_G69 mutant proteinleri üzerinde sırasıyla %14,4 ve %18 hücre içi toplam miktarı arttırmıştır. Compound hemizigot üzerinde ise %91,6'lık ifadesini %94,3'e çıkartmıştır. Ancak aynı OPC41061 gibi G107W ve T273M mutantları üzerinde sırasıyla %4,4'lük ve %14,2'lik hücre içi toplam miktarlarının azalmasına neden olmuştur.

Tüm mutant proteinlerin üç tekrar olarak gerçekleştirilen Total ELISA sonuçları, WT %100 kabul edilerek diğer mutantların kurtarılmadaki yüzdelik oranları hesaplanarak Çizelge 4.8 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kontrol ve Farmakolojik Şaperon Uygulama Total ELISA Sonuçları

	OPC41061		OPC31260		OPC21268		Kontrol
	Ortalama	STD	Ortalama	STD	Ortalama	STD	Ortalama
WT	100	0	100	0	100	0	100
R68W	100	25	100	23	100	2,1	85,6
ΔR67_G69 /G107W	95,6	11	96,2	14	94,3	8,4	91,6
ΔR67_G69	100	18	100	4,7	100	14	82
G107W	83,9	19	93,7	11	86	17	90,4
T273M	86,3	23	90	21	79,8	15	94

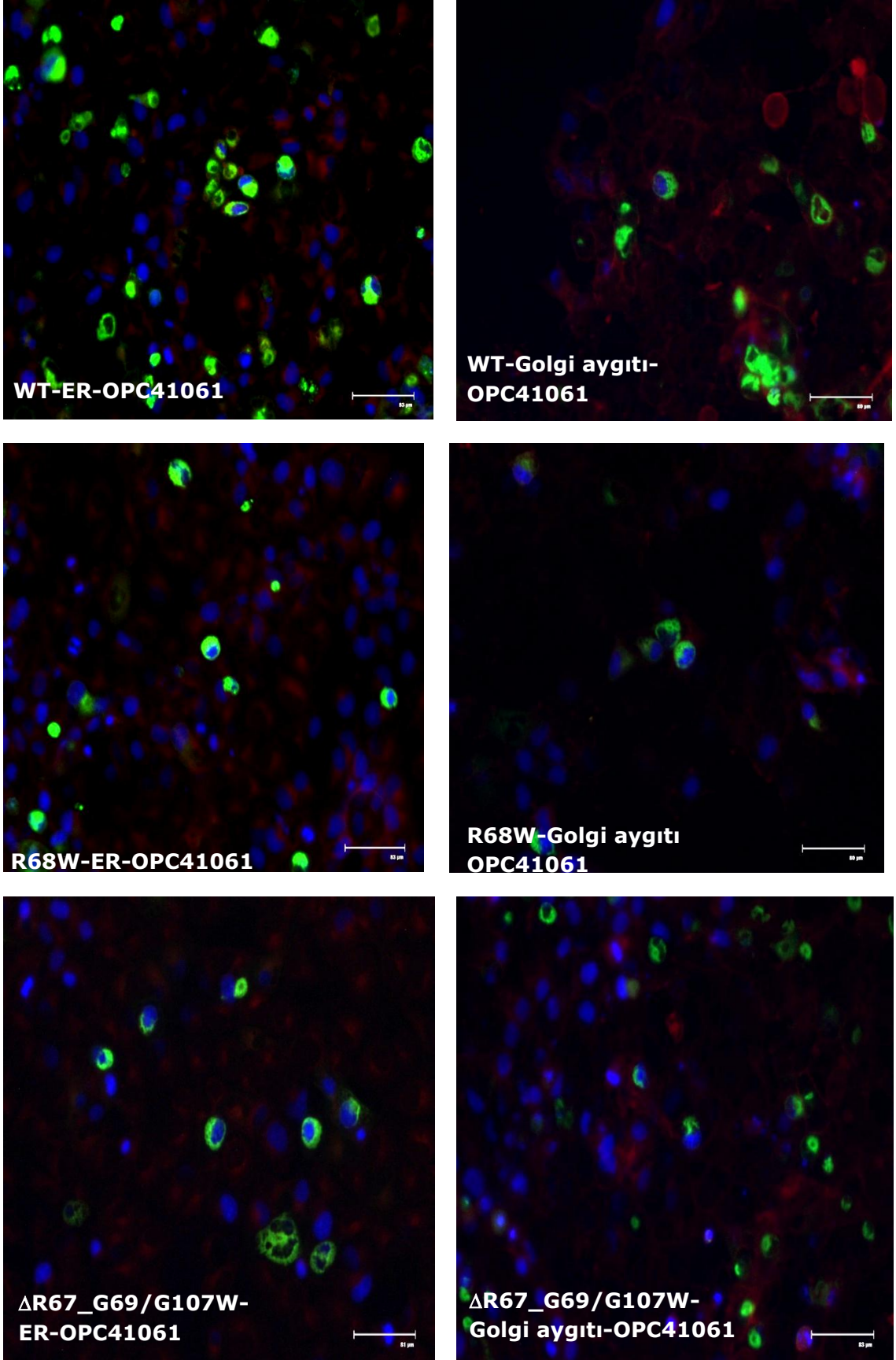
Üçlü tekrarlı yapılan total ELISA deney sonuçları WT %100 kabul edilerek ortalamaları hesaplanmıştır. Kontrol olarak belirtilen grup, farmakolojik şaperon uygulaması olmaksızın mutant proteinlerin hücre içi total miktarları gösterilmektedir. Hücre içerisindeki toplam miktarları %100'ün üstüne çıkan değerler 100 olarak sabitlenmiştir.



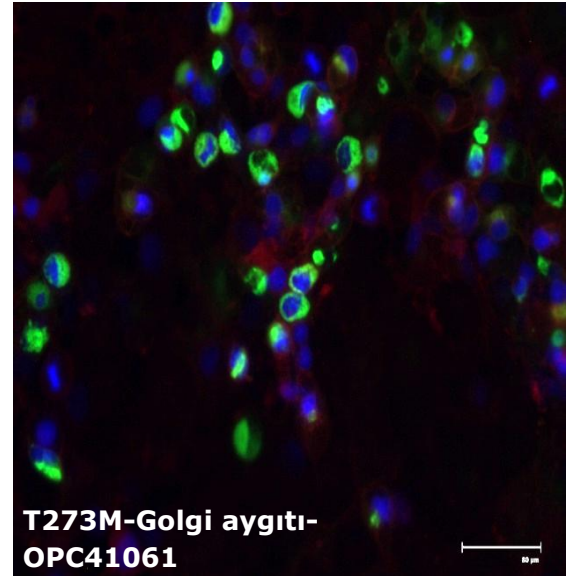
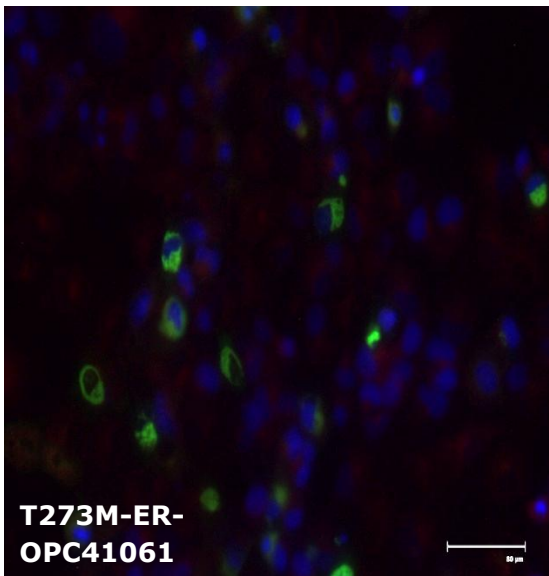
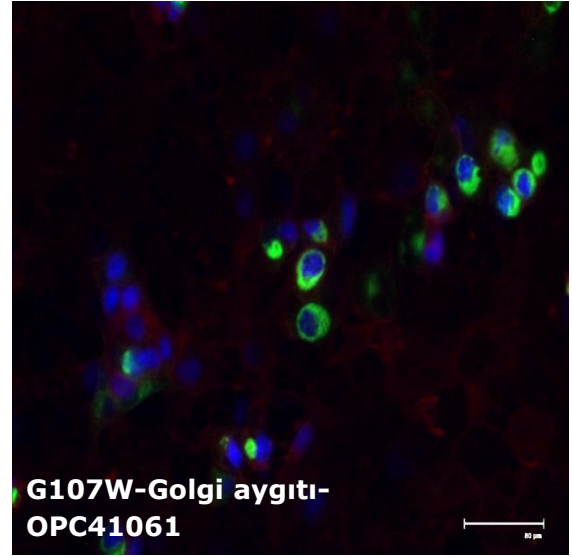
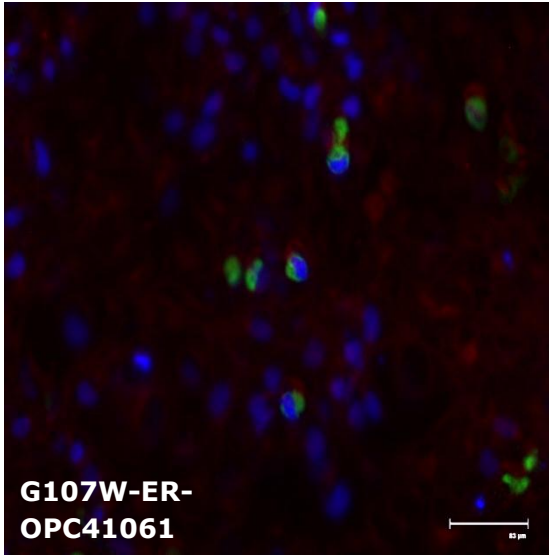
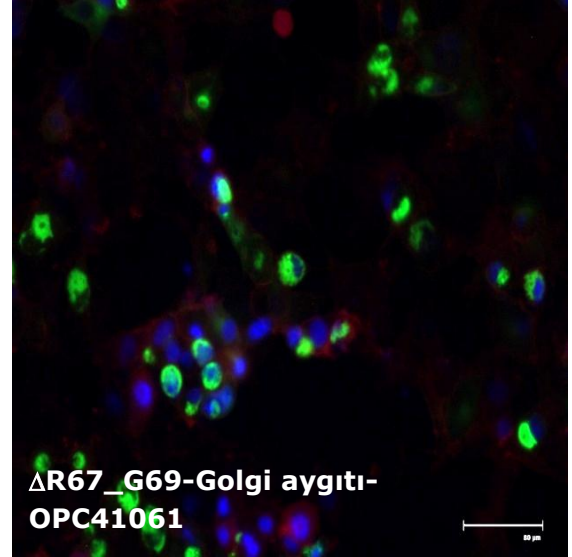
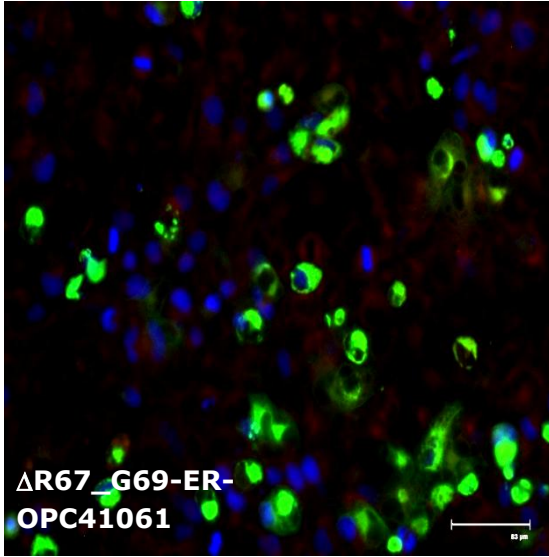
Şekil 4.4. Total ELISA Sonuç Grafiği. Total ELISA sonuçları üzerinden; Farmakolojik şaperon uygulaması sonrası ve uygulama yapılmadan mutant proteinlerin hücre içerisindeki toplam miktarları grafik üzerinde karşılaştırılmalı gösterilmiştir. Kırmızı kare içine alınan değerler Tekrarlı Ölçüm ANOVA testinde anlamlı sonuçlar vermektedir.

OPC41061, OPC31260 ve OPC21268 farmakolojik şaperonlarının, mutant proteinler üzerinde yapılan kurtarma çalışmalarının sonucunda, hücre içerisindeki konumlarını tespit edebilmek ve ELISA sonuçlarını doğrulamak adına görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Hücrelerin mikroskop altında görüntülenebilmesi için pEGFP ile işaretlenmiş mutantlar kullanılmıştır. Böylece hücreler yeşil renkte gözlenmiştir. Sırayla ER-izleyici, çekirdek ve Golgi-aygıtı-izleyici, çekirdek boyaması yapılmıştır. Bu şekilde hücrelerdeki ER ve Golgi-aygıtı kırmızı renkte boyanmıştır. DAPI boyasıyla da çekirdekler mavi boyanmıştır. Mutant proteinlerin görüntüleri, farmakolojik şaperon uygulaması yapılmamış kontrol grupları ile uygulama yapılmış mutant proteinler karşılaştırmalı floresans mikroskop görüntüleri Şekil 4.5

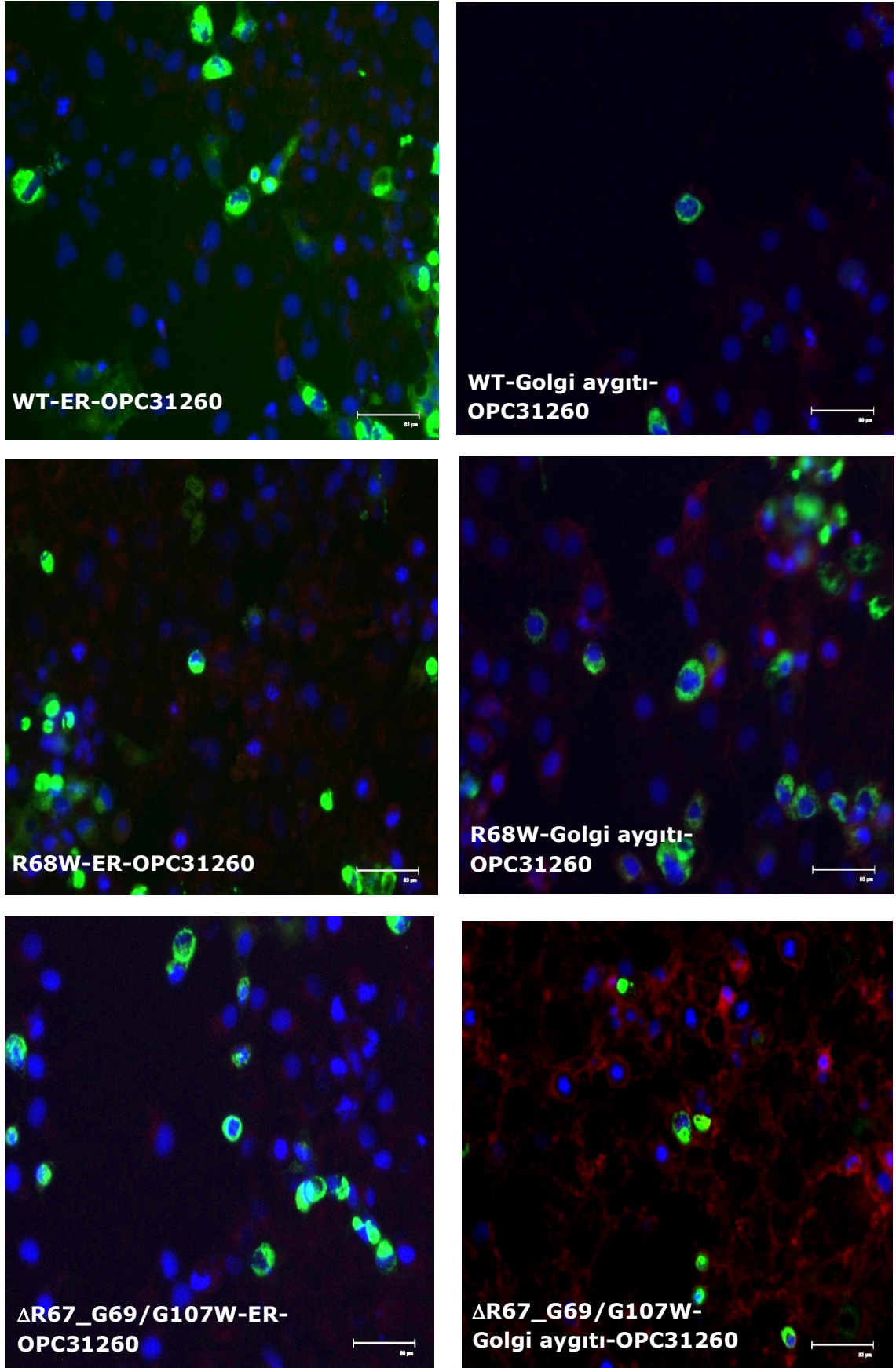
Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmektedir.



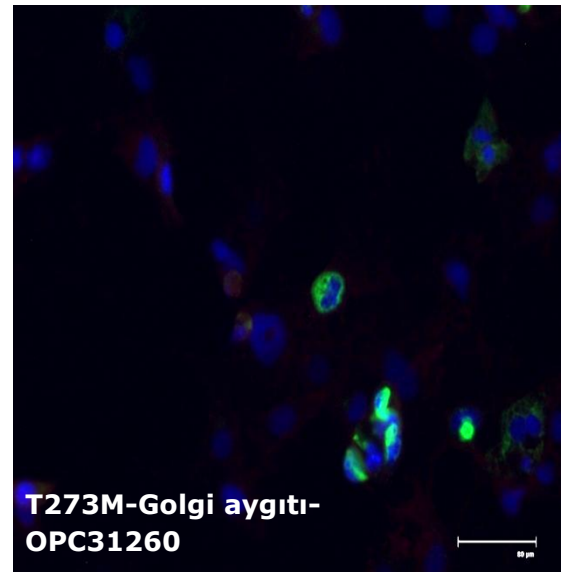
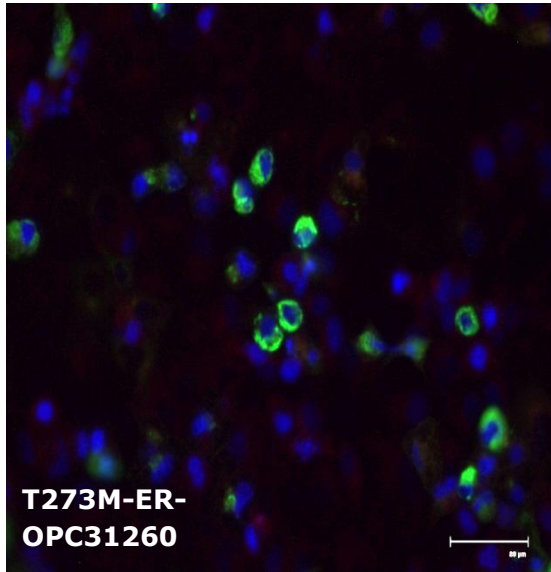
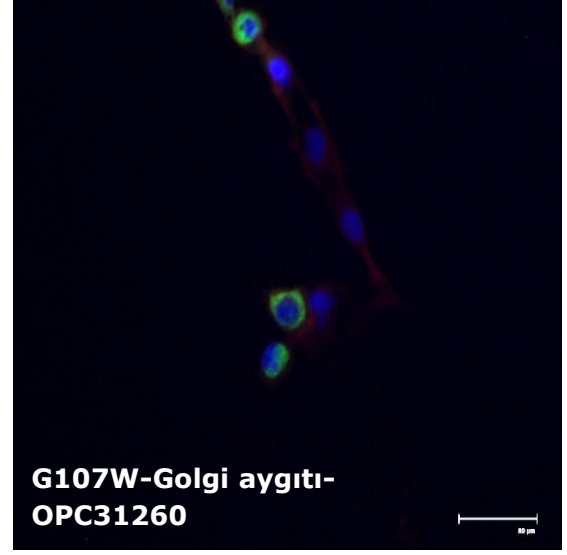
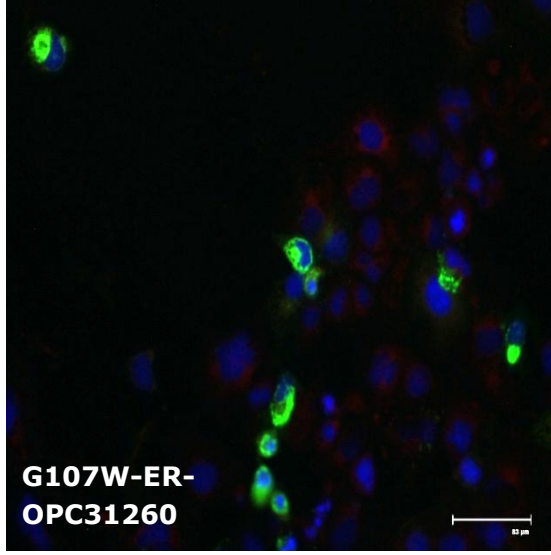
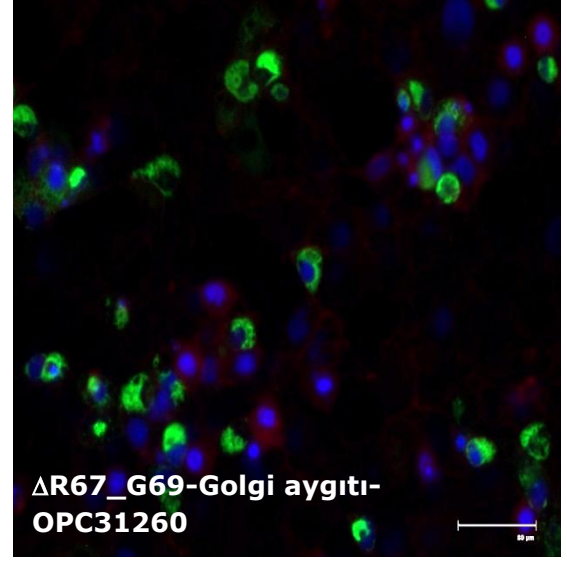
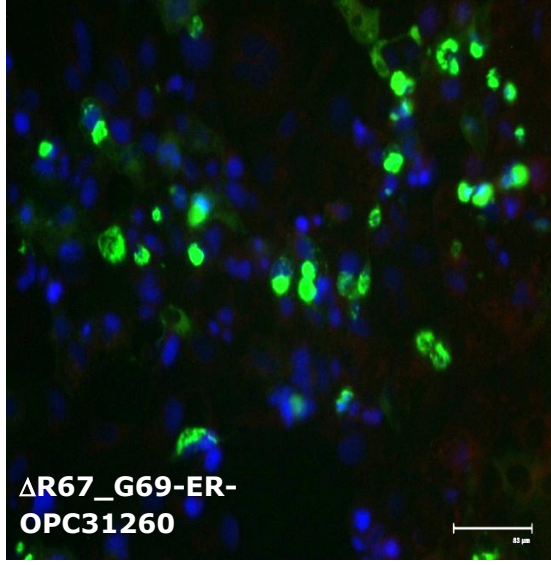
Şekil 4.5. OPC41061 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü.



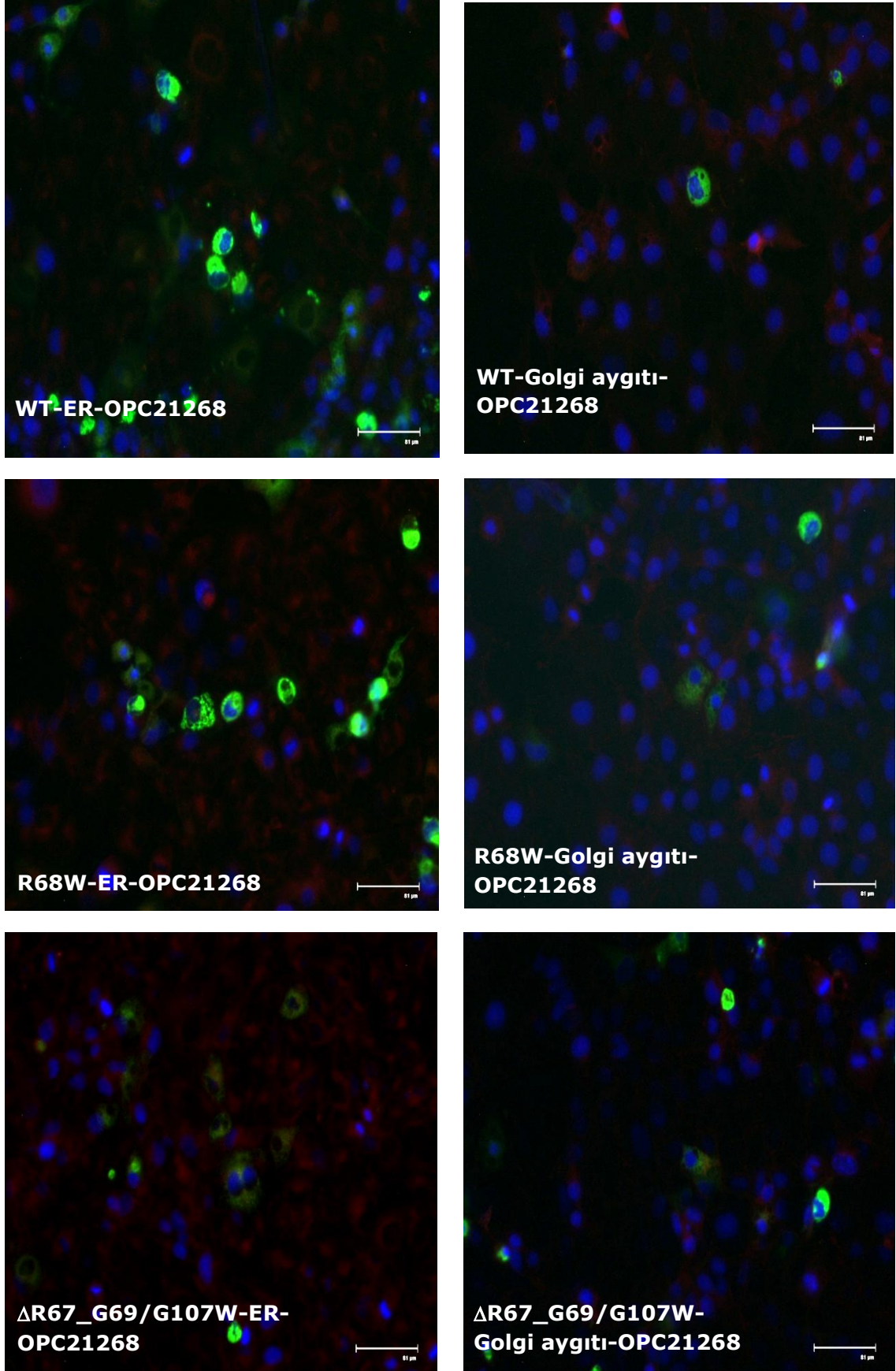
Şekil 4.6 (devamı). OPC41061 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü



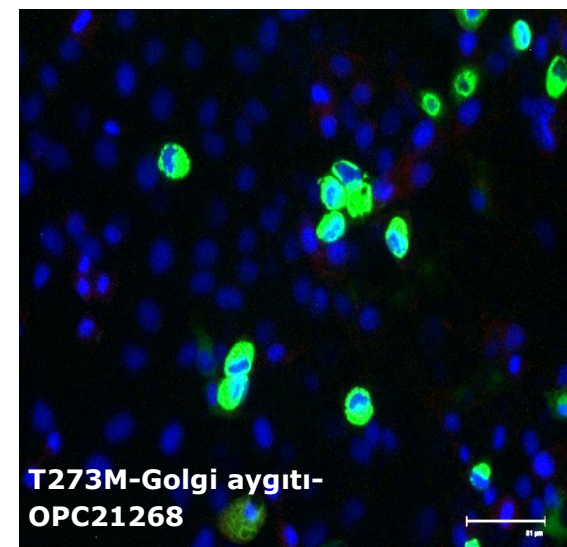
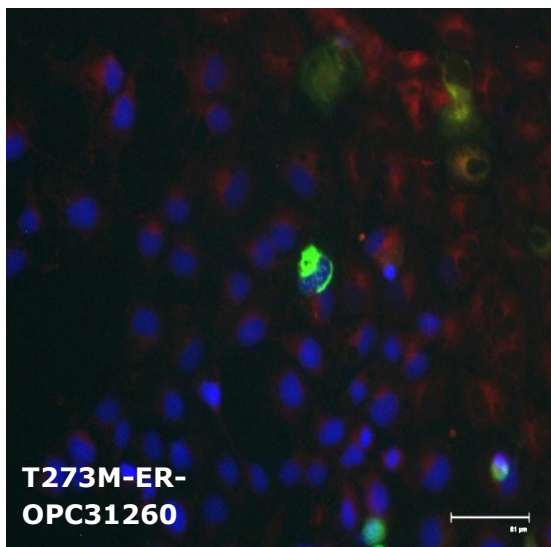
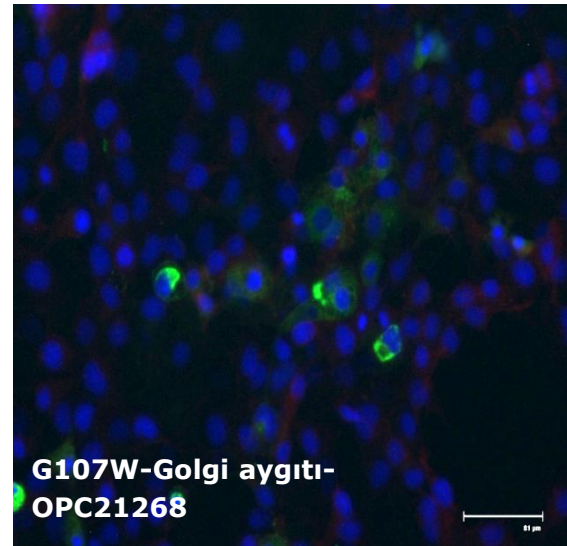
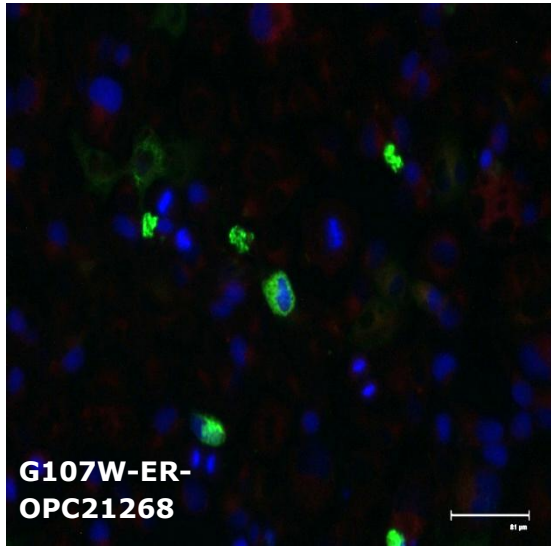
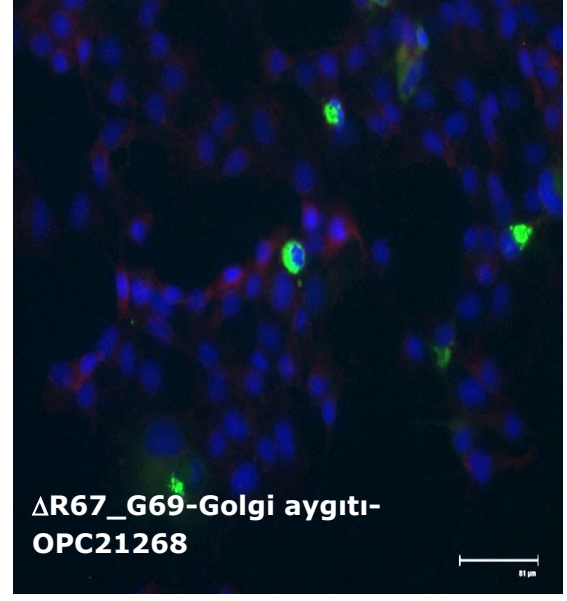
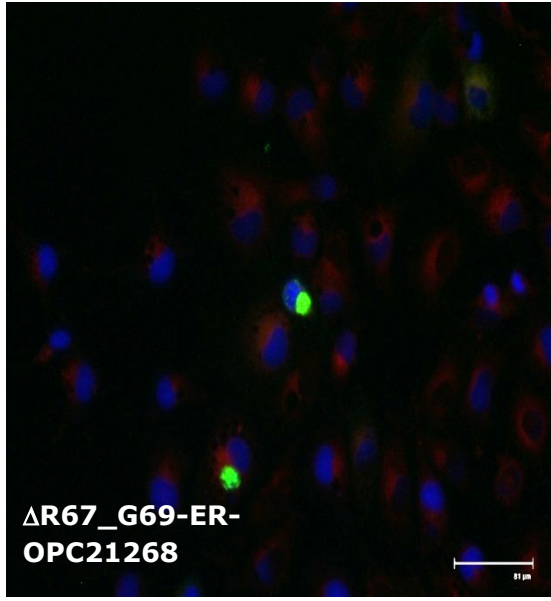
Şekil 4.7. OPC31260 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü



Şekil 4.8. (devamı).OPC31260 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü



Şekil 4.9. OPC21268 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü



Şekil 4.10. (devamı). OPC21268 Uygulanmış Mutant Proteinlerin Floresan Mikroskop Görüntüsü

4.1. R68W Mutasyonu Sonuçları

R68W mutant proteini hücre yüzeyinde sadece %28,3 ve hücre içerisinde toplam %85,6 miktarlarında elde edilebilmektedir. OPC41061 farmakolojik şaperonu uygulaması sonucunda hücre yüzeyindeki miktarı %80,4'e ve hücre içi toplam miktarı %100'e çıkmıştır. Böylece OPC41061'in R68W mutantı üzerinde ciddi kurtarma sağladığı gösterilmiştir. OPC31260 ile muamele edildiğinde ise R68W mutantının hücre yüzey miktarı %74,2'ye ve hücre içerisindeki toplam miktarı %100'ye çıkmıştır.

Yapılan çalışmalarda OPC41061'in ve OPC31260'ın vazopressin 2 (V₂) reseptörüne bağlanma afiniteleri çok yüksek olduğu, hatta OPC41061'in bağlanma afinitesinin doğal ligandı AVP'nin bağlanma afinitesinden çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir [125]. Her iki farmakolojik şaperon da mutant proteinlere doğal ligand bağlanma bölgesinden bağlanarak stabilize etmektedir. AVPR2 ligand bağlanma bölgesi, korunmuş ECL1 ve ECL2 halkaları arasındaki sistein köprüsünü de kapsayan bir bölgedir. Mutant proteinlere bu bölgeden bağlanan farmakolojik şaperonlar, yan zincirlerinin yardımı ile doğru katlanmayı sağlayabilmek için, mutasyonun neden olduğu ve ER kalite kontrol sistemi tarafından tanınan hidrofobik reziduların, eşlenmemiş ya da yanlış eşlenmiş sistein köprülerinin ve de olgunlaşmamış glikanları ortadan kaldırabilecek uygun etkileşimlerin oluşmasına olanak sağlar. Kullanılan farmakolojik şaperonların sahip olduğu AVPR2'ye bağlanma afiniteleri ve yan zincirlerinin, R68W mutant proteinin ICL1 bölgesinde oluşturduğu hidrofobik reziduyu elimine edecek konformasyonda katlanmasına izin verecek etkileşimleri sağladığı düşünülmektedir.

Farmakolojik şaperonların şaperonlama başarısı sadece mutant proteini stabilize ederek kalite kontrol sisteminden kurtarabilmesi

değildir. Aynı zamanda mutant proteinin hedef bölgeye ulaştığındaki doğal ligandı ile yer değiştirebilme kabiliyeti olduğu daha önceki bölümlerde kapsamlı olarak anlatılmıştır. Hücre yüzey ELISA sonuçlarına göre, OPC41061'in, OPC31260'dan, hatta doğal ligandı AVP'den bile daha yüksek AVPR2'ye bağlanma afinitesi ile mutant proteinlerin hücre yüzeyine ulaşabilmelerini artırmıştır. OPC41061 kullanılan diğer farmakolojik şaperonlara kıyasla, mutant proteinleri ER degradasyonundan kurtararak hücre yüzeyine ulaştırmada en yüksek verimi elde etmiştir. Ancak, total ELISA sonuçlarına bakıldığında OPC31260 kullanılan diğer farmakolojik şaperonlardan daha etkilidir. Nitekim yapılan çalışmalara göre, OPC31260, AVPR2'ye daha düşük bağlanma afinitesi göstermekte ve böylece bağlandığı mutant proteinden hücre yüzeyine ulaştıktan sonra düşük bağlanma afinitesi ile ligandının bağlanmasına izin vermektedir. Bunun aksine OPC41061, doğal ligandından bile daha yüksek bağlanma afinitesi ile ligand bağlanmasına engel olabildiği ve bu nedenle hücre içi toplam miktarının azaldığı düşünülmektedir.

R68W mutantı üzerindeki OPC21268'in hücre yüzeyi miktarındaki başarısı, OPC41061 ve OPC31260'dan daha az olmasına rağmen, hücre içi toplam miktarı OPC41061'den çok daha etkilidir. AVPR2 mutantları üzerinde OPC21268 ile yapılan dokking çalışmasında, OPC21268'in V reseptörünün TM7 ve TM6 domeyni ile etkileşime girerek orada konformasyonel değişime neden olduğu bildirilmektedir [126]. Buna ek olarak TM7 domeynin uç kısmındaki amfipatik halka yapısı, ICL1 bölgesi ile etkileşime girmekte ve AVPR2'yi stabilize edilebilmektedir. Bu şekilde OPC21268 TM7 domeyni üzerinde konformasyonel değişime neden olabilecek ve ICL1 bölgesindeki R68W mutantının oluşturduğu hidrofobik reziduyu ortadan kaldıracak bir katlanmayı teşvik edebilecektir. Ancak, OPC21268 vazopressin 1 reseptör antagonistidir ve bu nedenle etkileşime girdiği mutant proteinin doğru konformasyonda katlanmasını

sağlayamayabilir. Bunun sonucunda, AVPR2'nin hücre yüzeyindeki lokasyonuna uygun bir şekilde yerleşim sağlayamayacağı için, OPC21268 ile kurtarılan mutant proteinler hücre yüzeyine ulaşamayacaktır. Konfokal mikroskop görüntüleri de ELISA sonuçlarını destekler sonuçlar göstermektedir. Bunların yanı sıra yapılan çalışmalarda V_1 antagonisti olan OPC21268'in V_1 reseptörüne bağlanarak AVP ligandının V_1 reseptörüne bağlanmasını inhibe etmekte olduğunu ve bunun sonucunda V_2 reseptörü için ortamdaki ligand miktarının arttırdığını bildirmişlerdir [126]. Böylece mutasyon sonucu miktarı azalan proteinlerin işlevselliğini artırmayı hedefleyen başka bir terapötik yol da gösterilmektedir. Ancak R68W mutasyonu ER'de takılı kalarak hücre yüzeyine ulaşamadığı için OPC21268 ile belirtildiği gibi bir kurtarma sağlanamamıştır.

4.2. $\Delta R67_G69/G107W$, $\Delta R67_G69$ ve $G107W$ Mutasyonu Sonuçları

Compound hemizigot mutanti AVPR2 proteinin iki farklı bölgesinde meydana gelmiştir. ICL1 bölgesinde meydana gelen $\Delta R67_G69$ mutasyonu dokuz bazlık delesyon bölgesini içermekte ve hücre içi halkanın yapısında ciddi bir kısalma meydana getirmektedir. Halkada meydana gelen kısalma, Thilien ve arkadaşlarının önerdiği, TM7 domeynin uç kısmındaki amfipatik halka yapısıyla ICL1 yapısı etkileşime giremeyerek AVPR2'yi stabilize edebilme olasılığını azaltabilmektedir. Aynı zamanda korunmuş ECL1, aktif bağlanma bölgesinde oluşan $G107W$ mutasyonunun protein katlanmasında olmasa da ligandın bağlanmasına engel olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu durum ligand gibi davranan antagonist bağlanmasını da zorlaştırabilecektir. Söz edilen bu iki durum, total ve yüzey ELISA sonuçlarına bakıldığında da OPC41061, OPC31260 ve OPC21268'in, mutant proteinler üzerinde negatif etkiye sahip olması

ile desteklenmektedir. Farmakolojik şaperon uygulaması yapılmaksızın mutant protein hücre yüzeyindeki miktarı %68 oranında olurken, uygulama sonrasında bu oran çok daha aşağılara çekilmiştir. Compound hemizigot mutantın hücre içi toplam miktarına bakıldığında ise yabancı tipe yakın bir sonuçla karşılaşılmaktadır ve farmakolojik şaperonların uygulanması ile hücre içi toplam miktarlarını %3-4 oranında arttırdıkları görülmüştür. Bu durum mutant proteinlerin yabancı tip AVPR2 proteinleri üzerinde oluşabilecek baskın negatif etkisi ile açıklanabilir. Baskın negatif etki, mutant proteinlerin yabancı tip ile fiziksel sabit bir etkileşime girerek, yabancı tipin ligandına bağlanmasını ve ligandla aktive edilmiş ikinci habercinin oluşmasını inhibe edici bir durumdur. Böylece ortamda işlevsiz bir sürü protein oluşmaktadır [80][81][127]. Compound hemizigot mutantında $\Delta R67_G69$ delesyon bölgesi TM7 domeyinin amfipatik uç kısmı ile etkileşime giremediği için proteinin stabilizasyonu engellenebilmektedir. Bunun yanında ligand bağlanma bölgesinde meydana gelen G107W mutasyonunda, farmakolojik şaperon bağlanmasını zorlaştıracakı düşünülmektedir. Bu şekilde iki farklı yoldan da stabilizasyonu engelenen mutant protein, doğru olarak katlanan AVPR2 proteinleri üzerinde baskın negatif etki oluşturabilecektir. Sonuçta, doğru katlanan proteinler hücre içerisinde bulunabilseler bile membrana ulaşamayabileceklerdir. Bu durum hücre içerisinde bir miktar protein artışına rağmen membranındaki protein miktarındaki düşüşü açıklayabilir.

Compound hemizigotu oluşturan mutasyonların etkilerine ayrı ayrı bakıldığında, $\Delta R67_G69$ mutasyonu aynı R68W mutasyonu gibi farmakolojik şaperonlara cevap vermektedir ve kurtarıma oranları yüksektir. Fakat G107W'nun, hücre yüzeyindeki miktarı OPC41061 ve OPC31260 muamelesi sonucu sırasıyla %8,3 ve %4,4 oranında artırıldığı gözlemlenmiştir ki bu artış bahsi geçen farmakolojik şaperonların AVPR2'ye bağlanma afinitelerinin yüksek olması

nedeniyle sağlandığı düşünölmektedir. Bunların aksine, OPC21268 vazopressin 1 antagonistidir ve diğer farmakolojik şaperonlara göre çok daha az AVPR2 bağlanma afinitesine sahiptir. G107W mutasyonunun ligand bağlanma bölgesinde bulunması OPC21268'in bağlanma afinitesini daha da düşürebilecektir ya da etkili bir şekilde bağlanamayarak, diğer katlanan proteinler üzerinde negatif baskın etki yaratabilecektir. AVPR2 proteinlerinin bu negatiflikler sonucu hücre yüzeyine ulaşamayacağı tahmin edilmektedir. Kullanılan üç farmakolojik şaperon uygulama sonuçlarından, compound hemizigotu oluşturan ΔR67_G69 mutantının kurtarılmaya daha uygun olduğunu ve G107W mutantının ise kurtarmayı engellediğini söyleyebiliriz. Bu nedenlerle OPC41061, OPC31260 ve OPC21268'in compound hemizigot mutanti üzerindeki başarısızlıklarını açıklayabiliriz.

4.3. T273M Mutasyonu Sonuçları

Protein katlanmasında büyük öneme sahip olan TM domeynlerinde meydana gelen mutasyonlar ciddi ölçüde yanlış katlanmalara neden olmaktadır. Bunun sonucunda da yanlış katlanan proteinler kalite kontrol sisteminin birinci basamağına takılı kalmaktadırlar. T273M mutasyonu TM6 domeyninde meydana gelmektedir. TM6 domeyninin 273. pozisyonunda meydana gelen bu mutasyon normal şartlarda polar olan yan grubun, nonpolar gruba dönüşmesine neden olmaktadır. Stabilitayı yan zincirlerinin etkileşimi ile yapan OPC21268 farmakolojik şaperonun etki mekanizmasını engelleyebilmekte ve proteinlerin hem hücre yüzey miktarında hem de hücre içerisindeki toplam miktarlarında negatif etki göstermesine neden olmaktadır. OPC41061 ise T273M mutantına bağlanarak bu bölgeki mutasyonu ekarde edebilecek konformasyonda mutant proteinin katlanmasına izin verebildiği düşünölmektedir. Böylece hücre yüzey miktarında yaklaşık %50 oranında iyileşme sağlamaktadır. Fakat OPC31061 aynı etkiyi gösterememekte ve uygulama öncesi hücre yüzey miktarından

sadece %0,5'lik bir iyileşme gösterebilmektedir. Bunların yanı sıra kullanılan üç farmakolojik şaperon da T273M mutant proteinin hücre içi toplam miktarını azaltmaktadır.

Bu çalışmada mutasyonun protein içerisinde hangi lokasyonda bulunduğu, farmakolojik şaperonun stabilizasyon için etkileşim kurduğu bölgelerde mutasyonun olup olmamasına, farmakolojik şaperonun bağlanma afinitesine, etkin bir şekilde bağlanıp bağlanmamasına bağlı olarak farmakolojik şaperon kurtarma başarısının değişebileceği hücre yüzey ELISA, total ELISA ve floresan mikroskop görüntülerinin birbirlerini destekleyici sonuçları ile gösterilmektedir.

Farmakolojik şaperonların mutant proteinler üzerindeki kurtarma başarısını genellemek zordur. Fakat yine de bağlanma afinitesi ile doğru orantılı olarak kurtarmanın arttırıldığı gözlemlenmiştir. Fonksiyonel protein oluşumunda yüksek bağlanma afinitesi de çoğu zaman dezavantaj oluşturmaktadır ki birçok çalışma grubu bu durumun kullanılan farmakolojik şaperon uygulama dozaj ayarlaması ile üstesinden gelinebildiğini belirtmektedir. Bu nedenle günümüzde pek çok farmakolojik şaperon üzerinde dozaj çalışması yapılmaktadır.

Hücre kültürü çalışmalarında elde edilen başarılı sonuçların yanı sıra model organizmalar üzerinde yapılan dozaj çalışmaları da farmakolojik şaperonların klinikteki birçok konformasyonel hastalık üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. 2006 yılında Bernier ve arkadaşları, NDI hastalığına sahip beş erkek yetişkin üzerinde oral yolla antagonist denemesi yapmışlardır ve hastaların idrar miktarında azalma gözlenmiştir. Bu yapılan çalışma ile peptid olmayan V2R antagonistlerinin NDI hastalarında ilaç olarak kullanabileceği yönünde bir adım atılmış ve bu durum, klinik çalışmalar için ümit verici sonuçlar oluşturmuştur [4].

Bunun yanı sıra farmakolojik şaperon mekanizmasının aydınlatılması için, doking çalışmaları arttırılmalıdır. Bu yöntem ile farmakolojik şaperonların biyokimyasal bağlanma bölgeleri tespit edilmelidir. Böylece mutasyona uygun doğru farmakolojik şaperon uygulamaları yapılabileceği düşünülmektedir.

Farmakolojik şaperonlar üzerine yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar konformasyonel hastalıklardan muzdarip bireylerin yaşam kalitelerini artırabilmek açısından umut verici olduğu düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] C. M. Dobson, A. Sali, ve M. Karplus, "Protein folding: A perspective from theory and experiment", *Angew. Chemie - Int. Ed.*, c. 37, sayı 7, ss. 868–893, 1998.
- [2] F. U. Hartl ve M. Hayer-Hartl, "Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein", *Science*, c. 295, sayı 5561. ss. 1852–1858, 2002.
- [3] R. L. Redler, J. Das, J. R. Diaz, ve N. V. Dokholyan, "Protein Destabilization as a Common Factor in Diverse Inherited Disorders", *Journal of Molecular Evolution*, c. 82, sayı 1. ss. 11–16, 2016.
- [4] V. Bernier, M. Lagacé, D. G. Bichet, ve M. Bouvier, "Pharmacological chaperones: Potential treatment for conformational diseases", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, c. 15, sayı 5. ss. 222–228, 2004.
- [5] C. Soto, "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases", *Nat. Rev. Neurosci.*, c. 4, sayı 1, ss. 49–60, 2003.
- [6] T. Arakawa, D. Ejima, Y. Kita, ve K. Tsumoto, "Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs", *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, c. 1764, sayı 11. ss. 1677–1687, 2006.
- [7] Y.-X. Tao ve P. Conn, "Chaperoning G Protein-Coupled Receptors: From Cell Biology to Therapeutics.", *Endocr Rev*, c. 35, sayı 4. ss. 602–647, 2014.
- [8] T. Loo ve D. Clarke, "Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents.", *Expert Rev. Mol. Med.*, c. 9, sayı 16, ss. 1–18, 2007.
- [9] J. Q. Fan, "A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: Inhibitors enhance mutant enzyme activity", *Trends*

- in Pharmacological Sciences*, c. 24, sayı 7. ss. 355–360, 2003.
- [10] F. E. Cohen ve J. W. Kelly, "Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases", *Nature*, c. 426, sayı 6968. ss. 905–909, 2003.
- [11] D. Ringe ve G. A. Petsko, "What are pharmacological chaperones and why are they interesting?", *Journal of Biology*, c. 8, sayı 9. 2009.
- [12] J. Aymami, X. Barril, L. Rodríguez-Pascau, ve M. Martinell, "Pharmacological chaperones for enzyme enhancement therapy in genetic diseases", *Pharm. Pat. Anal.*, c. 2, sayı 1, ss. 109–124, 2013.
- [13] H. Huang ve Y. X. Tao, "A small molecule agonist THIQ as a novel pharmacoperone for intracellularly retained melanocortin-4 receptor mutants", *Int. J. Biol. Sci.*, c. 10, sayı 8, ss. 817–824, 2014.
- [14] M. B. Tropak, J. E. Blanchard, S. G. Withers, E. D. Brown, ve D. Mahuran, "High-Throughput Screening for Human Lysosomal β -N-Acetyl Hexosaminidase Inhibitors Acting as Pharmacological Chaperones", *Chem. Biol.*, c. 14, sayı 2, ss. 153–164, 2007.
- [15] A. Jorge-Finnigan *vd.*, "Pharmacological chaperones as a potential therapeutic option in methylmalonic aciduria cblB type", *Hum. Mol. Genet.*, c. 22, sayı 18, ss. 3680–3689, 2013.
- [16] C. Porto *vd.*, "Pharmacological enhancement of α -glucosidase by the allosteric chaperone n-acetylcysteine", *Mol. Ther.*, c. 20, sayı 12, ss. 2201–2211, 2012.
- [17] L. Matalonga, L. Gort, ve A. Ribes, "Small molecules as therapeutic agents for inborn errors of metabolism", *J Inherit Metab Dis*, c. 40, sayı 2, ss. 177–193, 2017.
- [18] A. L. Pey *vd.*, "Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations", *Hum. Mutat.*, c. 24, sayı 5, ss. 388–399, 2004.
- [19] Y. Suzuki, "Emerging novel concept of chaperone therapies for

- protein misfolding diseases.”, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, c. 90, sayı 5, ss. 145–62, 2014.
- [20] P. M. Conn ve J. A. Janovick, “Drug development and the cellular quality control system”, *Trends Pharmacol Sci*, c. 30, sayı 5, ss. 228–233, 2009.
- [21] S. L. Lindquist ve J. W. Kelly, “Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases-progress and prognosis”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, c. 3, sayı 12, 2011.
- [22] Y. J. Wang, X. J. Di, ve T. W. Mu, “Using pharmacological chaperones to restore proteostasis”, *Pharmacological Research*, c. 83. ss. 3–9, 2014.
- [23] T. W. Mu *vd.*, “Chemical and Biological Approaches Synergize to Ameliorate Protein-Folding Diseases”, *Cell*, c. 134, sayı 5, ss. 769–781, 2008.
- [24] N. Gregersen, P. Bross, M. M. Jørgensen, T. J. Corydon, ve B. S. Andresen, “Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, c. 23, sayı 5. ss. 441–447, 2000.
- [25] S. Wüller *vd.*, “Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2receptors”, *J. Biol. Chem.*, c. 279, sayı 45, ss. 47254–47263, 2004.
- [26] U. E. Pet??j??-Repo, M. Hogue, S. Bhalla, A. Laperr??re, J. P. Morello, ve M. Bouvier, “Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of?? opioid receptor maturation”, *EMBO J.*, c. 21, sayı 7, ss. 1628–1637, 2002.
- [27] J. A. Janovick, M. Goulet, E. Bush, J. Greer, D. G. Wettlaufer, ve P. M. Conn, “Structure-activity relations of successful pharmacologic chaperones for rescue of naturally occurring and manufactured mutants of the gonadotropin-releasing hormone

- receptor.", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, c. 305, sayı 2, ss. 608–614, 2003.
- [28] J. Sallette *vd.*, "Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation", *Neuron*, c. 46, sayı 4, ss. 595–607, 2005.
- [29] K. Araki ve K. Nagata, "Protein folding and quality control in the ER", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, c. 3, sayı 11, 2011.
- [30] M. S. Celej, G. G. Montich, ve G. D. Fidelio, "Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility", *Protein Sci.*, c. 12, sayı 7, ss. 1496–1506, 2003.
- [31] S. R. Hawtin, "Pharmacological chaperone activity of SR49059 to functionally recover misfolded mutations of the vasopressin V1a receptor", *J. Biol. Chem.*, c. 281, sayı 21, ss. 14604–14614, 2006.
- [32] J. Q. Fan ve S. Ishii, "Pharmacological chaperone therapy for fabry disease", içinde *Fabry Disease*, 2010, ss. 455–468.
- [33] V. Bernier, "Pharmacologic Chaperones as a Potential Treatment for X-Linked Nephrogenic Diabetes Insipidus", *J. Am. Soc. Nephrol.*, c. 17, sayı 1, ss. 232–243, 2005.
- [34] J. H. Robben, M. Sze, N. V. a M. Knoers, ve P. M. T. Deen, "Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus.", *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, c. 292, sayı 1, ss. F253-60, 2007.
- [35] J. L. Smith *vd.*, "Pharmacological correction of long QT-linked mutations in KCNH2 (hERG) increases the trafficking of Kv11.1 channels stored in the transitional endoplasmic reticulum", *AJP Cell Physiol.*, c. 305, sayı 9, ss. C919–C930, 2013.
- [36] N. Pedemonte *vd.*, "Small-molecule correctors of defective $\Delta F508$ -CFTR cellular processing identified by high-throughput screening", *J. Clin. Invest.*, c. 115, sayı 9, ss. 2564–2571, 2005.
- [37] E. R. Benjamin *vd.*, "The pharmacological chaperone 1-

- deoxygalactonojirimycin increases α -galactosidase A levels in Fabry patient cell lines", içinde *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2009, c. 32, sayı 3, ss. 424–440.
- [38] G. H.-F. Yam, N. Bosshard, C. Zuber, B. Steinmann, ve J. Roth, "Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants", *Am. J. Physiol. Physiol.*, c. 290, sayı 4, ss. C1076–C1082, 2006.
- [39] M. B. Tropak ve D. Mahuran, "Lending a helping hand, screening chemical libraries for compounds that enhance ??-hexosaminidase A activity in GM2 gangliosidosis cells", *FEBS Journal*, c. 274, sayı 19. ss. 4951–4961, 2007.
- [40] a De Lean, J. M. Stadel, ve R. J. Lefkowitz, "A ternary complex model explains the agonist specific binding properties of the adenylate cyclase coupled beta- adrenergic receptor", *J Biol Chem*, c. 255, sayı 15, ss. 7108–7117, 1980.
- [41] P. Samama, S. Cotecchia, T. Costa, ve R. J. Lefkowitz, "A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model", *J. Biol. Chem.*, c. 268, sayı 7, ss. 4625–4636, 1993.
- [42] P. Chidiac, T. E. Hebert, M. Valiquette, M. Dennis, ve M. Bouvier, "Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists", *Mol Pharmacol*, c. 45, sayı 3, ss. 490–499, 1994.
- [43] T. Kenakin, "Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry", *Trends in Pharmacological Sciences*, c. 18, sayı 12. ss. 456–464, 1997.
- [44] T. Kenakin, "Agonist-receptor efficacy II: agonist trafficking of receptor signals", *Trends Pharmacol. Sci.*, c. 16, sayı 7, ss. 232–238, 1995.
- [45] D. L. Farrens, C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell, ve H. G. Khorana, "Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin", *Science (80-.)*, c.

- 274, sayı 5288, ss. 768–770, 1996.
- [46] U. Gether ve B. K. Kobilka, "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation.", *J. Biol. Chem.*, c. 273, sayı 29, ss. 17979–17982, 1998.
- [47] Kobilka, "G protein coupled receptor structure and activation", *Biochim. Biophys. Acta*, c. 1768, sayı 4, ss. 794–807, 2007.
- [48] F. De Smet, A. Christopoulos, ve P. Carmeliet, "Allosteric targeting of receptor tyrosine kinases", *Nature Biotechnology*, c. 32, sayı 11. ss. 1113–1120, 2014.
- [49] R. E. Boyd *vd.*, "Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases", *Journal of Medicinal Chemistry*, c. 56, sayı 7. ss. 2705–2725, 2013.
- [50] S. C. Garman ve D. N. Garboczi, "The molecular defect leading to fabry disease: Structure of human α -galactosidase", *J. Mol. Biol.*, c. 337, sayı 2, ss. 319–335, 2004.
- [51] A. I. Guce, N. E. Clark, J. J. Rogich, ve S. C. Garman, "The molecular basis of pharmacological chaperoning in human α -galactosidase", *Chem. Biol.*, c. 18, sayı 12, ss. 1521–1526, 2011.
- [52] R. L. Lieberman, J. A. D'Aquino, D. Ringe, ve G. A. Petsko, "Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability", *Biochemistry*, c. 48, sayı 22, ss. 4816–4827, 2009.
- [53] Y. Tajima, S. Saito, K. Ohno, T. Tsukimura, S. Tsujino, ve H. Sakuraba, "Biochemical and structural study on a S529V mutant acid α -glucosidase responsive to pharmacological chaperones", *J. Hum. Genet.*, c. 56, sayı 6, ss. 440–446, 2011.
- [54] G. Parenti, "Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: From concept to clinics", *EMBO Molecular Medicine*, c. 1, sayı 5. ss. 268–279, 2009.
- [55] P. Durand, P. Lehn, I. Callebaut, S. Fabrega, B. Henrissat, ve J. P. Mornon, "Active-site motifs of lysosomal acid hydrolases:

- Invariant features of clan GH-A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis", *Glycobiology*, c. 7, sayı 2, ss. 277–284, 1997.
- [56] P. Durand, S. Fabrega, B. Henrissat, J. P. Mornon, ve P. Lehn, "Structural features of normal and mutant human lysosomal glycoside hydrolases deduced from bioinformatics analysis.", *Hum. Mol. Genet.*, c. 9, sayı 6, ss. 967–77, 2000.
- [57] R. L. Lieberman *vd.*, "Structure of acid β -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease", *Nat. Chem. Biol.*, c. 3, sayı 2, ss. 101–107, 2007.
- [58] J. Underhaug, O. Aubi, ve A. Martinez, "Phenylalanine Hydroxylase Misfolding and Pharmacological Chaperones", *Curr. Top. Med. Chem.*, c. 12, sayı 22, ss. 2534–2545, 2013.
- [59] A. C. Calvo *vd.*, "Effect of pharmacological chaperones on brain tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase 2", *J. Neurochem.*, c. 114, sayı 3, ss. 853–863, 2010.
- [60] R. Torreblanca, E. Lira-Navarrete, J. Sancho, ve R. Hurtado-Guerrero, "Structural and Mechanistic Basis of the Interaction between a Pharmacological Chaperone and Human Phenylalanine Hydroxylase", *ChemBioChem*, c. 13, sayı 9, ss. 1266–1269, 2012.
- [61] J. W. Hanrahan, H. M. Sampson, ve D. Y. Thomas, "Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis", *Trends in Pharmacological Sciences*, c. 34, sayı 2. ss. 119–125, 2013.
- [62] P. H. Thibodeau *vd.*, "The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis.", *J. Biol. Chem.*, c. 285, sayı 46, ss. 35825–35, 2010.
- [63] W. M. Rabeh *vd.*, "Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore Δ f508 CFTR folding and function", *Cell*, c. 148, sayı 1–2, ss. 150–163, 2012.
- [64] L. Wellhauser, P. Kim Chiaw, S. Pasyk, C. Li, M. Ramjeesingh,

- ve C. E. Bear, "A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability.", *Mol. Pharmacol.*, c. 75, sayı 6, ss. 1430–1438, 2009.
- [65] F. Van Goor *vd.*, "Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, c. 108, sayı 46, ss. 18843–18848, 2011.
- [66] L. He *vd.*, "Correctors of F508 CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein", *FASEB J.*, c. 27, sayı 2, ss. 536–545, 2013.
- [67] T. Okiyonedo *vd.*, "Mechanism-based corrector combination restores Δ F508-CFTR folding and function", *Nat. Chem. Biol.*, c. 9, sayı 7, ss. 444–454, 2013.
- [68] P. M. Conn, "Protein Origami: Therapeutic Rescue of Misfolded Gene Products", *Mol. Interv.*, c. 2, sayı 5, ss. 308–316, 2002.
- [69] P. M. Conn ve J. A. Janovick, "Drug development and the cellular quality control system", *Trends in Pharmacological Sciences*, c. 30, sayı 5, ss. 228–233, 2009.
- [70] A. Ulloa-Aguirre, J. Janovick, S. Brothers, ve P. Conn, "Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease.", *Traffic*, c. 5, sayı 11, ss. 821–837, 2004.
- [71] P. M. Conn ve J. A. Janovick, "Trafficking and quality control of the gonadotropin releasing hormone receptor in health and disease", *Molecular and Cellular Endocrinology*, c. 299, sayı 2, ss. 137–145, 2009.
- [72] A. Thielen *vd.*, "The hydrophobic amino acid residues in the membrane-proximal C tail of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor are necessary for transport-competent receptor folding", *FEBS Lett.*, c. 579, sayı 23, ss. 5227–5235, 2005.
- [73] D. Yasuda *vd.*, "Helix 8 of leukotriene B4 type-2 receptor is required for the folding to pass the quality control in the

- endoplasmic reticulum", *FASEB J.*, c. 23, sayı 5, ss. 1470–1481, 2009.
- [74] A. Pagano *vd.*, "C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(B) receptors.", *J. Neurosci.*, c. 21, sayı 4, ss. 1189–202, 2001.
- [75] D. Benke, "Mechanisms of GABAB receptor exocytosis, endocytosis, and degradation", *Adv. Pharmacol.*, c. 58, sayı C, ss. 93–111, 2010.
- [76] M. Canals, J. F. Lopez-Gimenez, ve G. Milligan, "Cell surface delivery and structural re-organization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective α_{1b} -adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers", *Biochem. J.*, c. 417, sayı 1, ss. 161–172, 2009.
- [77] H. Kobayashi, K. Ogawa, R. Yao, O. Lichtarge, ve M. Bouvier, "Functional rescue of α_1 -adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones", *Traffic*, c. 10, sayı 8, ss. 1019–1033, 2009.
- [78] A. O. Wilkie, "The molecular basis of genetic dominance.", *J. Med. Genet.*, c. 31, sayı 2, ss. 89–98, 1994.
- [79] C. A. Hubner, "Ion channel diseases", *Hum. Mol. Genet.*, c. 11, sayı 20, ss. 2435–2445, 2002.
- [80] R. A. Veitia, "Dominant negative factors in health and disease.", *J. Pathol.*, c. 218, sayı 4, ss. 409–18, 2009.
- [81] H. F. Mendes ve M. E. Cheetham, "Pharmacological manipulation of gain-of-function and dominant-negative mechanisms in rhodopsin retinitis pigmentosa", *Hum. Mol. Genet.*, c. 17, sayı 19, ss. 3043–3054, 2008.
- [82] T. T. Leskel?, J. J. Lackman, M. M. Vierimaa, H. Kobayashi, M. Bouvier, ve U. E. Pet?j?-Repo, "Cys-27 variant of human ??-opioid receptor modulates maturation and cell surface delivery of Phe-27 variant via heteromerization", *J. Biol. Chem.*, c. 287, sayı 7, ss. 5008–5020, 2012.

- [83] A. C. Muntau, J. Leandro, M. Staudigl, F. Mayer, ve S. W. Gersting, "Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: Pharmacological chaperones and proteostasis regulators", içinde *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2014, c. 37, sayı 4, ss. 505–523.
- [84] W. E. Balch, R. I. Morimoto, A. Dillin, ve J. W. Kelly, "Adapting proteostasis for disease intervention", *Science*, c. 319, sayı 5865. ss. 916–919, 2008.
- [85] J. E. Chambers ve S. J. Marciniak, "Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress", *Am J Physiol Cell Physiol*, c. 307, sayı 8, ss. C657-70, 2014.
- [86] F. U. Hartl, A. Bracher, ve M. Hayer-Hartl, "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis", *Nature*, c. 475, sayı 7356. ss. 324–332, 2011.
- [87] F. U. Hartl, "Molecular chaperones in cellular protein folding.", *Nature*, c. 381, sayı 6583. ss. 571–579, 1996.
- [88] D. Balchin, M. Hayer-Hartl, ve F. U. Hartl, "In vivo aspects of protein folding and quality control", *Science*, c. 353, sayı 6294. 2016.
- [89] A. Martinez, A. C. Calvo, K. Teigen, ve A. L. Pey, "Chapter 3 Rescuing Proteins of Low Kinetic Stability by Chaperones and Natural Ligands. Phenylketonuria, a Case Study", *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, c. 83, sayı C. ss. 89–134, 2008.
- [90] R. W. Carrell ve D. A. Lomas, "Conformational disease", *Lancet*, c. 350, sayı 9071. ss. 134–138, 1997.
- [91] M. Beissinger ve J. Buchner, "How chaperones fold proteins.", *Biol. Chem.*, c. 379, sayı 3, ss. 245–59, 1998.
- [92] N. Gregersen, "Protein misfolding disorders: Pathogenesis and intervention", *J. Inherit. Metab. Dis.*, c. 29, sayı 2–3, ss. 456–470, 2006.

- [93] A. Jorge-Finnigan *vd.*, "Functional and structural analysis of five mutations identified in methylmalonic aciduria cblB type", *Hum. Mutat.*, c. 31, sayı 9. ss. 1033–1042, 2010.
- [94] M. H. Smith, H. L. Ploegh, ve J. S. Weissman, "Road to ruin: Targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum", *Science*, c. 334, sayı 6059. ss. 1086–1090, 2011.
- [95] A. Varshavsky, "The Ubiquitin System, an Immense Realm", *Annu. Rev. Biochem.*, c. 81, sayı 1, ss. 167–176, 2012.
- [96] E. K. Fredrickson ve R. G. Gardner, "Selective destruction of abnormal proteins by ubiquitin-mediated protein quality control degradation", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, c. 23, sayı 5. ss. 530–537, 2012.
- [97] B. S. Lee, J. Chen, C. Angelidis, D. a Jurivich, ve R. I. Morimoto, "Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflammatory drugs results in protection against stress-induced cellular damage.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, c. 92, sayı 16. ss. 7207–11, 1995.
- [98] S. D. Westerheide ve R. I. Morimoto, "Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation", *Journal of Biological Chemistry*, c. 280, sayı 39. ss. 33097–33100, 2005.
- [99] D. W. Neef, A. M. Jaeger, ve D. J. Thiele, "Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases", *Nat Rev Drug Discov*, c. 10, sayı 12, ss. 930–944, 2011.
- [100] L. R. Dick ve P. E. Fleming, "Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy", *Drug Discovery Today*, c. 15, sayı 5–6. ss. 243–249, 2010.
- [101] D. W. Neef, M. L. Turski, ve D. J. Thiele, "Modulation of heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target for small molecule intervention in neurodegenerative disease", *PLoS Biol.*,

- c. 8, sayı 1, 2010.
- [102] S. Sarkar *vd.*, "Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models", *Nat. Chem. Biol.*, c. 3, sayı 6, ss. 331–338, 2007.
- [103] S. Sarkar ve D. C. Rubinsztein, "Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases", *Mol. Biosyst.*, c. 4, sayı 9, s. 895, 2008.
- [104] M. E. Egan *vd.*, "Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of $\Delta F508$ -CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells", *Nat. Med.*, c. 8, sayı 5, ss. 485–492, 2002.
- [105] M. E. Egan *vd.*, "Curcumin, a Major Constituent of Turmeric, Corrects Cystic Fibrosis Defects", *Science (80-.)*, c. 304, sayı 5670, ss. 600–602, 2004.
- [106] J. Krebs, L. B. Agellon, ve M. Michalak, "Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling", *Biochem Biophys Res Commun*, c. 460, sayı 1, ss. 114–121, 2015.
- [107] L. Ellgaard ve A. Helenius, "Quality control in the endoplasmic reticulum", *Nat Rev Mol Cell Biol*, c. 4, sayı 3, ss. 181–191, 2003.
- [108] S. I. Nishikawa, S. W. Fewell, Y. Kato, J. L. Brodsky, ve T. Endo, "Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation", *J. Cell Biol.*, c. 153, sayı 5, ss. 1061–1069, 2001.
- [109] "How Cells Read the Genome : From DNA to Protein", *Mol. Biol. Cell*, ss. 329–410, 2008.
- [110] B. Bukau ve A. L. Horwich, "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines", *Cell*, c. 92, sayı 3, ss. 351–366, 1998.
- [111] S. C. Taylor, A. D. Ferguson, J. J. M. Bergeron, ve D. Y. Thomas, "The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation", *Nat. Struct. Mol.*

- Biol.*, c. 11, sayı 2, ss. 128–134, 2004.
- [112] J. J. Caramelo, O. A. Castro, L. G. Alonso, G. de Prat-Gay, ve A. J. Parodi, "UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, c. 100, sayı 1, ss. 86–91, 2003.
- [113] C. Ritter, K. Quirin, M. Kowarik, ve A. Helenius, "Minor folding defects trigger local modification of glycoproteins by the ER folding sensor GT", *EMBO J.*, c. 24, sayı 9, ss. 1730–1738, 2005.
- [114] J. D. Mancias ve J. Goldberg, "Exiting the endoplasmic reticulum", *Traffic*, c. 6, sayı 4, ss. 278–285, 2005.
- [115] K. Sangkuhl, H. Römpler, W. Busch, B. Karges, ve T. Schöneberg, "Nephrogenic diabetes insipidus caused by mutation of Tyr205: a key residue of V2 vasopressin receptor function.", *Hum. Mutat.*, c. 25, sayı 5, s. 505, 2005.
- [116] J. Füllekrug, P. Scheiffele, ve K. Simons, "VIP36 localisation to the early secretory pathway.", *J. Cell Sci.*, c. 112 (Pt 1, ss. 2813–21, 1999.
- [117] S. Hara-Kuge, T. Ohkura, H. Ideo, O. Shimada, S. Atsumi, ve K. Yamashita, "Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized madin-darby canine kidney (MDCK) cells", *J. Biol. Chem.*, c. 277, sayı 18, ss. 16332–16339, 2002.
- [118] J. H. Robben ve P. M. T. Deen, "Pharmacological Chaperones in Nephrogenic Diabetes Insipidus", *BioDrugs*, c. 21, sayı 3, ss. 157–166, 2007.
- [119] C. Czaplewski, R. Kaźmierkiewicz, ve J. Ciarkowski, "Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex.", *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, c. 12, sayı 3, ss. 275–287, 1998.
- [120] R. Hermosilla *vd.*, "Disease-causing V2 vasopressin receptors

are retained in different compartments of the early secretory pathway", *Traffic*, c. 5, sayı 12, ss. 993–1005, 2004.

- [121] R. Schülein, K. Zühlke, A. Oksche, R. Hermosilla, J. Furkert, ve W. Rosenthal, "The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues", *FEBS Lett.*, c. 466, sayı 1, ss. 101–106, 2000.
- [122] R. Schülein, K. Zühlke, G. Krause, ve W. Rosenthal, "Functional Rescue of the Nephrogenic Diabetes Insipidus-causing Vasopressin V2 Receptor Mutants G185C and R202C by a Second Site Suppressor Mutation", *J. Biol. Chem.*, c. 276, sayı 11, ss. 8384–8392, 2001.
- [123] R. Hermosilla ve R. Schülein, "Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells.", *Mol. Pharmacol.*, c. 60, sayı 5, ss. 1031–9, 2001.
- [124] B. Erdem *vd.*, "Functional characterization of AVPR2 mutants found in Turkish patients with nephrogenic diabetes insipidus", ss. 56–64, 2018.
- [125] Y. Yamamura *vd.*, "OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats.", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, c. 287, sayı 3, ss. 860–7, 1998.
- [126] M. Thibonnier, P. Coles, D. M. Conarty, C. L. Plesnicher, ve M. Shoham, "A molecular model of agonist and nonpeptide antagonist binding to the human V1 vascular vasopressin receptor", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, c. 294, sayı 1, ss. 195–203, 2000.
- [127] S. P. Brothers, A. Cornea, J. A. Janovick, ve P. M. Conn, "Human loss-of-function gonadotropin-releasing hormone receptor mutants retain wild-type receptors in the endoplasmic

reticulum: molecular basis of the dominant-negative effect.”,
Mol. Endocrinol., c. 18, sayı 7, ss. 1787–97, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Dilara Şahin
Doğum yeri : Ankara
Medeni Hali : Bekar
E-posta : dilarasah@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi,
Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,
Moleküler Biyoloji A.B.D.
06800 Beytepe Ankara

Eğitim

Lise : Reha Alemdaroğlu Lisesi, 2003-2006
Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2008-2013
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Bölümü 2017-2018

Yabancı Dil

Yökdil 2018 : 61,25

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Hücre kültürü çalışmaları
Moleküler genetik teknikler (DNA izolasyonu, PZR, DNA dizi analizi)
ELISA teknikleri

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Poster

1. Tolvaptan; OPC41061, Mozavaptan; OPC31260 and OPC21268 As Pharmacological Chaperones to Rescue of Mutant AVPR2s



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:13/07/2018

Tez Başlığı / Konusu: Bazı Farmakolojik Şaperonların Mutant AVPR2 Proteinlerinde Gözlemlenen Fonksiyon Kayıpları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 91 sayfalık kısmına ilişkin, 11/06/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynaklar hariç
- 2- Alıntılar dahil
- 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.

13/07/2018
Dilara Şahin
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Dilara Şahin
Öğrenci No: N16220248
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Hatice MERGEN