

***IN VITRO* ŞARTLARDA MUTANT AVPR2  
PROTEİNLERİNİN YARI ÖMÜR VE GLİKOZİLASYON  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION of HALF-LIFE and GLYCOSYLATION  
PROPERTIES of MUTANT AVPR2 PROTEINS UNDER *IN*  
*VITRO* CONDITIONS**

**HÜSEYİN ÖZGÜR ÖZDEMİREL**

**PROF. DR HATİCE MERGEN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

## ÖZET

### **IN VITRO ŞARTLARDA MUTANT AVPR2 PROTEİNLERİNİN YARI ÖMÜR VE GLİKOZİLASYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hüseyin Özgür ÖZDEMİREL**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

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

**Eylül 2020, 76 sayfa**

Diabetes insipidus (DI), aşırı miktarda idrar oluşumu (poliüri) ve aşırı miktarda susama (polidipsi) ile karakterize olmuş bir hastalıktır. Sebeplerine göre Gestasyonel DI, primer polidipsi, Nefrojenik DI (NDI) ve Santral DI (CDI) olmak üzere sınıflara ayrılır. NDI hastalığı kazanılmış veya kalıtsal olabilir. Kalıtsal NDI, %90 oranla X kromozomu (Xq28) üzerinde bulunun *AVPR2* genindeki mutasyonlardan kaynaklıdır. *AVPR2* proteinin 371 amino asitlik kodlanan DNA'sında gerçekleşen bir mutasyon, farklı semptomlarla gözlemlenebilen bu hastalığın ortaya çıkmasına neden olur. Ortaya çıkan bu mutasyonlar nedeniyle, *AVPR2* proteini yanlış katlanır ve degradasyona yönlendirilir. Bu durum, proteinin yarı ömrünü değiştirmektedir.

Hücre içi proteomun yarı ömrü, birkaç dakika ile birkaç ay arasında değişiklik gösterir. Bu değişikliğin sebebi ise hücre döngülerinde ve çeşitli

çevresel/fizyolojik durumlarda verilen hücrel cevaba bağı olarak protein degradasyon oranının farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. Mutasyon sebebiyle gerçekleşen degradasyon hızının artışı veya azalışı ise proteinin geçirdiği glikozilasyon modifikasyonlarıyla bağlantılıdır.

*AVPR2* geninde meydana gelen, grubumuz tarafından tanımlanan G12E, H80Y, V88M, V88L, R106C, V215M ve L219P mutasyonlarına ait yarı ömür zamanlarını ve glikozilasyon modifikasyonlarını ortaya koymak, yapılan bu tezin amacıdır. Bu kapsamda yapılan deneysel çalışmalarda, yabancı tip kodlayıcı *AVPR2* dizisi taşıyan ifade vektörü kullanılarak, site-directed mutagenез yöntemi ile ilgili mutant *AVPR2* gen dizilerini içeren ifade vektörleri hazırlanmıştır. COS-7 hücrelerinde ifade olması sağlanan mutant proteinlerin hücre içi olgunlaşma sürecinin karakterizasyonun araştırılması için deglikozilasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca proteinlerin yarı ömürlerinin belirlenmesi amacıyla, sikloheksimid analizi yapılmış ve hem deglikozilasyon deneyleri hem de sikloheksimid deneylerine ait sonuçlar immünblot analizi ile değerlendirilmiştir. Böylece mutant proteinlerin degradasyon durumları ve geçirdiği glikozilasyon modifikasyonları arasındaki ilişki ortaya koyulmuştur.

Sonuç olarak her mutantın, ER'de farklı düzeylerde takılı kaldığı görülmektedir. Yarı ömür zamanlarının, direkt olarak proteinin işlevselliği ve oluşturduğu sinyal cevabı ile ilişkili olmadığı ve glikozilasyon modifikasyonlarıyla birlikte değerlendirildiğinde bir anlam taşıdığı düşünülmektedir. Yarı ömür değerleri için mutantlar ile yabancı tip karşılaştırmaları, her mutant için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre L219P en düşük yarı ömür değerine sahiptir ve deglikozilasyon sonuçları ile değerlendirildiğinde büyük bir kısmının ER'de takılı kaldığı görülmüştür. R106C mutantına ait yarı ömür değerinin arttığı ve bu durumun degradasyon mekanizmalarının inhibisyonu ile ilişkili olabileceği önerilmiştir. H80Y mutant proteinin ise en uzun yarı ömür uzunluğuna sahip olmasına rağmen, deglikozilasyon analizi ile değerlendirildiğinde büyük bir kısmının ER'de takılı kaldığı gözlemlenmiştir. Yarı ömür uzunluğunun yabancı tipe yakınlık göstermesi ise mutant proteinin ER'den

Çıkışa ve degradasyona direnç göstermesiyle ilişkilendirilmiştir. AVPR2 proteininin farklı noktalarında ve farklı amino asit değişimleriyle meydana gelen bu mutasyonlar, farklı etki mekanizmalarına sahip olup bu durum, kalıtsal NDI'nın, hastalar arasında değişim gösteren semptomlarını açıklamaya yardımcı olabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** AVPR2, DI, fonksiyon analizi, yarı ömür, glikozilasyon

# **ABSTRACT**

## **INVESTIGATION of HALF-LIFE and GLYCOSYLATION PROPERTIES of MUTANT AVPR2 PROTEINS UNDER *IN VITRO* CONDITIONS**

**Hüseyin Özgür ÖZDEMİREL**

**Master of Science, Department of Biology**

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

**September 2020, 76 pages**

Diabetes insipidus (DI) is a disease characterized by excessive urine formation (polyuria) and excessive thirst (polydipsia). DI is classified into gestational DI, primary polydipsia, Nephrogenic DI (NDI), and Central DI (CDI), according to their causes. Hereditary NDI is caused by mutations in the *AVPR2* gene on the X chromosome (Xq28) with a rate of 90%. A mutation in the 371 amino acid-encoded DNA of the AVPR2 protein causes the emergence of this disease, which can be observed in different symptoms. Because of these mutations, the AVPR2 protein is misfolded and directed to degradation. This changes the half-life of the protein.

The half-life of the intracellular proteome varies from a few minutes to several months. The reason for this change is that the protein degradation rate varies depending on the cellular response given in cell cycles and various

environmental/physiological conditions. The increase or decrease in the rate of degradation caused by the mutation is related to the glycosylation modifications the protein undergoes.

The purpose of this thesis is to reveal the half-life times and glycosylation modifications of the G12E, H80Y, V88M, V88L, R106C, V215M, and L219P mutations occurring in the *AVPR2* gene which were previously defined by our group. In the experimental studies carried out in this context, expression vectors containing the related mutant *AVPR2* gene sequences were prepared by using site-directed mutagenesis method with the expression vector carrying the wild-type coding *AVPR2* sequence. Deglycosylation experiments were carried out to investigate the characterization of the intracellular maturation process of mutant proteins expressed in COS-7 cells. In addition, in order to determine the half-lives of proteins, cycloheximide analysis was performed and the results of both deglycosylation experiments and cycloheximide experiments were evaluated by immunoblot analysis. Thus, the relationship between the degradation state of mutant proteins and the glycosylation modifications they undergo was revealed.

As a result, it is seen that each mutant is trapped in the ER at different levels. It is thought that the half-life times are not directly related to the functionality of the protein and the signal response it generates, and have meaning when evaluated together with glycosylation modifications. Comparisons between mutants and wild type for half-life values were statistically significant for each mutant. According to the results obtained, L219P mutant protein has the lowest half-life value and when evaluated with the deglycosylation results, it was seen that most of it were trapped in the ER. It has been observed that the half-life value of the R106C mutant increases and it has been suggested that this may be related to the inhibition of degradation mechanisms. Although the H80Y mutant protein has the longest half-life, when evaluated by deglycosylation analysis, it was observed that most of it remained stuck in the ER. The fact that the half-life length is close to the wild type has been associated with the resistance of the mutant protein to exit from the ER and degradation. These mutations, which occur at different

points of the AVPR2 protein and with different amino acid changes, have different mechanisms of action, and this may help explain the symptoms of hereditary NDI that vary between patients.

**Keywords:** AVPR2, DI, functional characterization, half-life, glycosylation

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, hep anne şefkatiyle yaklaşan ve yardımını asla esirgemeyen tez danışmanın Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Aklıma gelen her soruyu çekinmeden defalarca sorabileceğim ve öğrendiklerim için hayatım boyunca minnettar kalacağım, yeri geldiğinde hoca yeri geldiğinde ise ablalarım olan çok değerli hocalarım Sayın Dr. Beril ERDEM'e, Dr. Sibel KÜÇÜKYILDIRIM'a ve Doç Dr. Emel SAĞLAR'a

Yakın arkadaş olarak beraber başladığımız bu yolda iyi kötü birçok günü birlikte geçirdiğimiz için her zaman mutluluk duyacağım canım arkadaşım Dilara Ulusal'a

Her aşamada yanımda olduğunu bildiğim canım ablam Dilara Vaizoğlu'na,

Beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Büşra Nur Şeker ve Hazal Tahravi'ye,

Birlikte büyüdüğüm, beni her ne olursa olsun seveceklerini bildiğim tüm arkadaşlarıma,

Desteklerini ve bana olan inançlarını her zaman hissettiren anneme, babama ve kardeşime,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



**BU TEZ ÇALIŞMASI HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA  
PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ FBA-2017-14395 NUMARALI PROJE  
TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Protein Yapısı ve Homeostasisi.....	3
2.2. ER Kalite Kontrol Sistemi.....	6
2.2.1 Hedeflenme ve Translokasyon.....	7
2.2.2. Şaperonlar .....	7
2.2.3. Glikozilasyon ve Kalneksin/Kalretikulin Döngüsü .....	9
2.2.4. ER Aracılı Degradasyon.....	13
2.3. Diabetes insipidus .....	15
2.3.1. Gestasyonel DI .....	20
2.3.2. Primer Polidipsi .....	20
2.3.3. Nefrojenik DI .....	20
2.3.4. Santral DI .....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	26
3.1. Site-directed Mutagenез Yöntemi ile Mutant <i>AVPR2</i> 'leri İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulması.....	27
3.1.1. PZR ile Mutant <i>AVPR2</i> Dizilerinin Elde Edilmesi .....	27
3.1.2. Mutant <i>AVPR2</i> Dizilerinin ve Vektörün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi ve Ligasyon .....	29

3.2. Mutant <i>AVPR2</i> Dizisini İçeren İfade Vektörlerinin Kompetan Hücreye ( <i>E. coli</i> DH5α) Transformasyonu .....	30
3.3. Elde Edilen Kolonilerden İfade Vektörlerini İçeren Plazmid DNA İzolasyonu .....	31
3.4. Elde Edilen İfade Vektörlerinin DNA Dizileme Yöntemi ile Kontrol Edilmesi .....	32
3.5. COS-7 Hücre Hattının Üretimi.....	34
3.5.1. Hücrelerin Üretilmesi ve Devamlılığı.....	34
3.6. Hücre Sayımı ve COS-7 Hücre Hattının Deney İçin Hazırlanması.....	35
3.7. Hazırlanan İfade Vektörlerinin Hücrelere Transfeksiyonu .....	35
3.8. Sikloheksimid Analizi ile Yabanıl ve Mutant <i>AVPR2</i> Proteinlerinin Yarı Ömrünün Belirlenmesi.....	36
3.8.1. Sikloheksimid Uygulaması.....	37
3.8.2. Denatüre Edici Lizis Tamponu ile Protein İzolasyonu.....	37
3.9. Deglikozilasyon Analizi ile Yabanıl ve Mutant <i>AVPR2</i> Proteinlerinin Olgunlaşma Karakterizasyonu .....	38
3.9.1. Diseksiyon Tamponu ile Protein İzolasyonu .....	39
3.9.2 Endo H Enzimi ile Kesim .....	40
3.9.3. PNGase F Enzimi ile Kesim .....	40
3.10. Western Blotlama.....	41
3.10.1. SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlığı.....	41
3.10.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	41
3.10.3. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi.....	42
3.10.4. Membran Blokasyonu ve Antikor ile İşaretleme .....	43
3.10.5. Görüntüleme.....	43
3.11. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz .....	44
4. SONUÇLAR.....	45
4.1. Site-directed Mutagenез Yöntemi ile Mutant <i>AVPR2</i> 'leri İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar .....	45
4.2. Mutant <i>AVPR2</i> Dizisini İçeren İfade Vektörlerinin Kompetan Hücreye ( <i>E. coli</i> DH5α) Transformasyonu ile İlgili Sonuçlar.....	46

4.3. Sanger Dizileme ile Kontrol Edilen Yabancı Tip ve Mutant AVPR2 Dizileri ile İlgili Sonuçlar.....	46
4.4. Oluşturulan İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonu ile İlgili Sonuçlar .....	49
4.5. Sikloheksimid Analizi ile Elde Edilen Yabancı Tip ve Mutant AVPR2 Proteinlerinin Yarı Ömürleri ile İlgili Sonuçlar.....	50
4.6. Deglikozilasyon Analizi ile Elde Edilen Yabancı Tip ve Mutant AVPR2 Proteinlerinin Stabilite Durumu ile İlgili Sonuçlar .....	56
5. Tartışma.....	60
5.1. G12E Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi .....	60
5.2. H80Y Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi .....	61
5.3. V88M ve V88L Mutasyonlarının AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkileri .....	63
5.4. R106C Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi .....	65
5.5. V215M Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi .....	66
5.6. L219P Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi .....	67
6. KAYNAKLAR.....	70
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	
ÖZGEÇMİŞ.....	77

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Protein ifadesi sonrası ER ve Golgi aygıtında gerçekleşen katlanma yolağı .....	3
Şekil 2.2. Protein homeostasis ağı.....	5
Şekil 2.3. ER protein kalite kontrol sistemi .....	6
Şekil 2.4. ER'e hedeflenmiş polipeptid zincirinin translokasyon .....	7
Şekil 2.5. ER'de görevli şaperonlar ve ko-şaperonlar.....	8
Şekil 2.6. Asparajine eklenen glikan yapısı.....	9
Şekil 2.7. Kalneksin/kalretikülin şaperonları.....	10
Şekil 2.8. Disülfid bağlarının oluşumunu ve peptidil prolil bağlarının izomerizasyonunu katalizleyen PDI ve PPI enzim aileleri.....	11
Şekil 2.9. Mannoza rezidularının kademeli olarak uzaklaştırılması .....	12
Şekil 2.10. ER'den çıkış ve COPII kompleksi. ....	13
Şekil 2.11. ERAD mekanizması ile proteozoma yönlendirme .....	14
Şekil 2.12. GPCR yapısı.....	17
Şekil 2.13. Böbrek toplama hücrelerinde gerçekleşen su geri emilim sinyalizasyonu .....	19
Şekil 3.1. Sikloheksimid analizi ile yarı ömür belirleme .....	37
Şekil 3.2. Endo H ve PNGase F enzim kesim yerleri .....	39
Şekil 4.1. H80Y, V88L, V215M, L219P mutasyonlarına ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. ....	45
Şekil 4.2. İlgili mutasyonları içeren bütün halindeki <i>AVPR2</i> dizilerini oluşturmak için gerçekleştirilen füzyon PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	45
Şekil 4.3. Mutant <i>AVPR2</i> plazmidlerini içeren bakterilere ait plak görüntüleri. ....	46
Şekil 4.4. G12E mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü.....	46
Şekil 4.5. H80Y mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü.....	47
Şekil 4.6. V88M mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü.....	47
Şekil 4.7. V88L mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü.....	47
Şekil 4.8. R106C mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü .....	48
Şekil 4.9. V215M mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü.....	48
Şekil 4.10. L219P mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. ....	49
Şekil 4.11. GFP transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinin 48 saat sonraki görüntüleri.....	49
Şekil 4.12. Yabanıl tip (WT) <i>AVPR2</i> ile transfekte edilmiş hücrelere etanol (kontrol) uygulaması sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	50
Şekil 4.13. Yabanıl tip (WT) <i>AVPR2</i> ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü.....	50
Şekil 4.14. G12E mutanti ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü.....	51

Şekil 4.15. H80Y mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	51
Şekil 4.16. V88M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	52
Şekil 4.17. V88L mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	52
Şekil 4.18. R106C mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	53
Şekil 4.19. V215M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	53
Şekil 4.20. L219P mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	54
Şekil 4.22. Yabanıl tip ve mutant <i>AVPR2</i> ile transfekte edilmiş hücrelerin siklohekzimid analizi sonrası elde edilen normalize protein miktarlarının (%) karşılaştırmalı grafiği .....	55
Şekil 4.23. Yabanıl tip (WT) <i>AVPR2</i> ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	56
Şekil 4.24. G12E mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	56
Şekil 4.25. H80Y mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	57
Şekil 4.26. V88M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	57
Şekil 4.28. R106C mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	58
Şekil 4.29. V215M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	59
Şekil 4.30. L219P mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü .....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.1.1 Mutasyonları oluşturmak için kullanılan primerler. ....	28
Çizelge 3.1.1.2. PZR içeriği ve reaksiyon koşulu.....	28
Çizelge 3.1.1.3. Füzyon PZR içeriği ve reaksiyon koşulu. ....	29
Çizelge 3.1.2.1. pLV2R ve mutant AVPR2 DNA'ları için enzim kesimi içerikleri.....	30
Çizelge 3.4.1. PZR pürifikasyonu içeriği ve reaksiyon koşulları.....	32
Çizelge 3.4.2. Sekans reaksiyonu içeriği ve reaksiyon koşulları .....	32
Çizelge 4.5.1. Yabanıl tip ve mutant AVPR2 proteinlerine ait yarı ömür saatleri ile mutantlar ve yabanıl tip arasındaki normalize edilmiş yarı ömür saatlerinin t-testi sonuçları ( $p < 0,01$ )..	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

A	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
%	Yüzde
$\mu$	Mikro
°C	Santigrat derece
$\pm$	Artı eksi
®	Tescilli
™	Ticari marka

### Kısaltmalar

$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
ADH	Antidiüretik hormon
AQP2	Akuaporin 2
AQP3	Akuaporin 3
AQP4	Akuaporin 4
ATP	Adenozin trifosfat
AVP	Arjinin vazopressin
AVPR1a	Arjinin vazopressin 1a reseptörü
AVPR1b	Arjinin vazopressin 1b reseptörü



AVPR2	Arjinin vazopressin 2 reseptörü
BiP	İmmünoglobulin bağlayıcı protein
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CDI	Santral Diabetes insipidus
CHX	Sikloheksimid
CNX/CRT	Kalneksin/kalretikülin
COPII	Kaplama protein kompleksi
CypB	Siklofilin B
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DI	Diabetes insipidus
DMEM	Dulbecco's Moddified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribo nükleotid trifosfat
DPSB	Denaturing protein sample buffer
ECL	Hücre dışı halka
EDEM	ER degradasyon arttırıcı alfa mannozidaz benzeri
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent assay
Endo H	Endoglikosidaz H
ER	Endoplazmik Retikulum
ER Man I	ER $\alpha$ 1,2-mannosidaz I
ER PQC	ER protein kalite kontrol
ERAD	ER aracılı degradasyon
ERGIC	ER Golgi aygıtı arası bölge
FBS	Fetal bovine serum

GDP	Guanozin difosfat
GPCR	G protein bağlı reseptör
GRK	G proteini ile ilişkili kinaz
GTP	Guanozin trifosfat
HA	Hemagglutinin
HGMD	The Human Gene Mutation Database
HRP	Horseradish peroxidase
ICL	Hücre içi halka
IP3	İnositol 3-fosfat
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mOsm	Miliozmol
NDI	Nefrojenik Diabetes insipidus
NEF	Nükleotid değişim faktörü
ng	Nanogram
NP-40	Oktilfenoksi polietoksietanol
NPII	Nörofizin II
OST	Oligosakkariltransferaz kompleksi
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Tween-20 içeren phosphate buffered saline
PCSK1	Pro-protein konvertaz substilin/kexin tip 1
PDI	peptidil disülfid izomeraz
pEGFP	GFP içeren plazmid

pLV2R	AVPR2 içeren plazmid
PNGase F	Peptid N- glikosidaz F
PPI	peptidil prolil izomeraz
PVDF	Polivinilidin florür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Ortalamanın standart hatası
SOC	Super Optimal Broth
SRP	Sinyal tanıma partikülü
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGS	Tris/glisin/SDS
TMD	Transmembran domeyni
Trx	Tioredoksin
U	Ünite
UGGT1	UDP-glukoz/glukoprotein glukozil transferaz
WFS1	Wolframin
WT	Yabanıl tip

# 1. GİRİŞ

DNA'dan alınan genetik bilgi sayesinde, proteinler sentezlenir ve bu proteinler canlı sistemlerin işleyişi için birçok görevi üstlenirler. Canlı bir sistemde bulunan bu protein topluluğu, proteom olarak adlandırılır. Proteomun denge halinde tutulması için, her bir proteinin sentez, katlanma ve yıkım mekanizmaları denge halinde olmalıdır ve bu denge, protein homeostasisi olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle protein yarı ömrü araştırmaları, hücreSEL protein dengesinin anlaşılmasında önem taşımaktadır. Buna ek olarak protein sentezine müdahale edebilecek bileşiklerin veya mutasyonların proteine olan etkilerini de ortaya koymaktadır.

DNA'da gerçekleşen bir mutasyon eğer DNA'nın kodlayıcı bölgesinde gerçekleşmişse, bu DNA dizisinden meydana gelen proteini/proteinleri etkileyebilir. Mutasyon sonucu oluşan bu mutant proteinler, katlanma süreçlerini doğru geçiremeyebilir. Hücre içerisinde yer alan ER protein kalite kontrol sistemi, kendiliğinden de gerçekleşme ihtimali olan bu yanlış katlanma olaylarını kontrol eder ve katlanamayan proteinleri degradasyona yönlendirir.

Mutasyon sebebiyle gerçekleşen degradasyon hızının artışı veya azalışı ise proteinin geçirdiği glikozilasyon modifikasyonlarıyla bağlantılıdır. Asparajin-prolin hariç herhangi bir amino asit-serin veya treonin (Asn-X-Ser/Thr) motifindeki asparajine glikan adındaki karbohidratların eklenmesi, ökaryotlarda korunan, oldukça fazla görülen bir protein modifikasyonudur ve glikozilasyon olarak adlandırılmaktadır. Glikan adındaki bu karbohidratlar, üç glukoz, dokuz mannoz ve iki N-asetilglukozaminden (Glc3Man9GlcNAc2) oluşur ve asparajin amino asidine kovalent olarak eklenir. N-glikozilasyon modifikasyonunun, eklenen hidrofilik glikan kalıntıları sayesinde, polipeptid zincirinin çözünürlüğü artar ve katlanmada görevli lektin şaperonları ile önemli etkileşimlere izin verir.

Bu kontrol noktalarının en önemli temsilcileri, yanlış katlanan proteinleri tanıyan ve degradasyona yönlendiren moleküller olan şaperonlardır. Şaperonlar, doğru konformasyonunu alamayan proteinlerin düzgün bir şekilde katlanmasına yardımcı olur. Bununla birlikte bu mutant proteinler, mutasyonun etki mekanizmalarına göre değişen derecelerde şaperonlar tarafından tutulabilir ve ER'de takılı kalabilir. Proteom dengesindeki bu bozulma ise birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

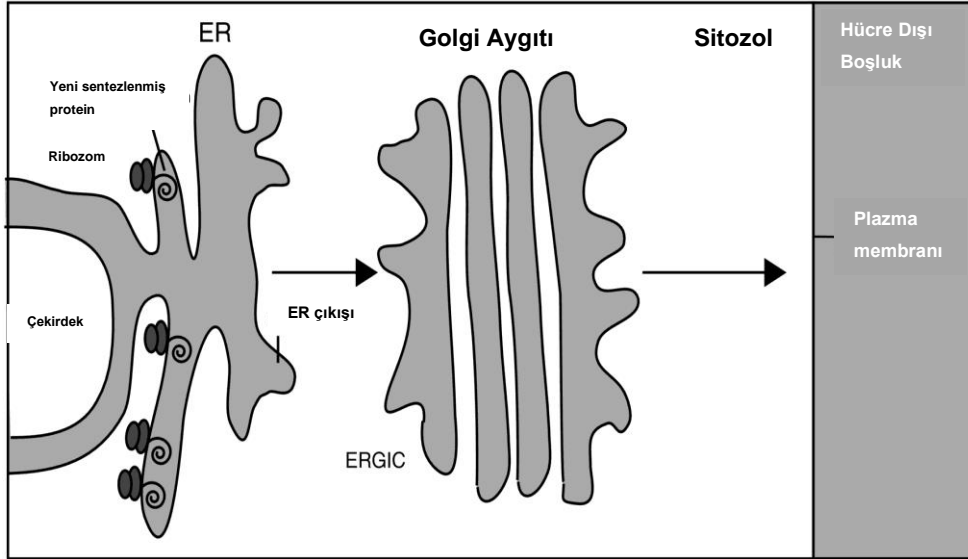
Kalıtsal Nefrojenik Diabetes insipidus hastalığı, *AVPR2* veya *AQP2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hastalık sonucu, vücuttaki su dengesi bozulur ve kaybedilen suyun idrardan geri alımı düzgün bir şekilde gerçekleştirilemez. Yanlış katlanan proteinlerin sebep olduğu bu hastalık, gerçekleşen mutasyonun tipine ve yerleşimine göre farklı düzeylerde semptomlar göstermektedir. Bu nedenle olası bir mutasyonun fonksiyonunun anlaşılması büyük önem taşır.

Tez kapsamında ise grubumuz tarafından *AVPR2* geninde tanımlanan G12E, H80Y, V88M, V88L, R106C, V215M ve L219P mutasyonlarına sahip *AVPR2* proteinlerinin, yarı ömür zamanlarını ve glikozilasyon durumlarını tespit etmek amaçlanmıştır. Sonuç olarak her mutant proteinin, ER'de farklı düzeylerde takılı kaldığı ortaya koyulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Protein Yapısı ve Homeostasisi

Proteinler çeşitlilik gösteren makro-moleküllerdir. Memeli hücrelerinin proteomu 10.000-20.000 arasında değişen birbirinden farklı birçok proteini kapsar. Hücresel süreçlerin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için bu protein bütünüün sentez-katlanma-yıkım mekanizmalarının denge halinde olması ve her aşamada kontrol edilmesi gereklidir. Basitçe ifade etmek gerekirse proteinler, DNA'dan gelen genetik bilginin ribozom üzerinde sentezlenmesiyle oluşur. Yeni sentezlenen bir amino asit dizisinin kendini doğru bir şekilde katlayıp işlevli bir proteine dönüştürmesi, amino asit dizisi içeriğindeki bilgiye ve hücrenin fiziksel ve kimyasal değişkenlerine bağlıdır. Katlanma bazen sentez sırasında yani ribozom üzerindeyken başlayabilir. Bazı proteinler ise ribozomdan ayrıldıktan sonra sitoplazmada katlanmaya başlayıp mitokondri veya Endoplazmik Retikulum (ER) gibi hücresel kompartımanlarda katlanmalarına devam eder (Şekil 2.1.). Her protein özgündür ve katlanma mekanizması da proteine göre değişkenlik gösterebilir fakat yukarıda bahsedilen bu temel süreçler evrenseldir [1, 2].



Şekil 2.1. Protein ifadesi sonrası ER ve Golgi aygıtında gerçekleşen katlanma yolağı ([3] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

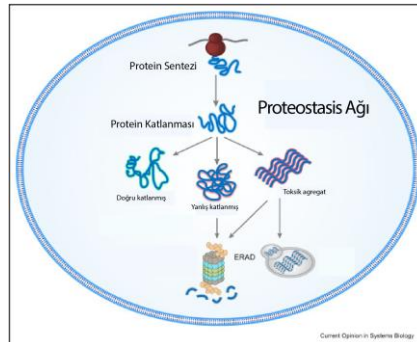
Bir proteinin işlevini yerine getirebilmesi için üç boyutlu konformasyonunun doğru bir şekilde oluşturulması önemlidir ve bu konformasyon; birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı olmak üzere dört düzey tarafından oluşturulur. Birincil yapı polipeptid zinciri oluşturmak için peptid bağları ile bir arada tutulan amino asitlerin doğrusal dizisidir. Peptid bağı, bir amino asidin karboksil grubu ile bir sonraki amino asidin amino grubu arasında oluşur. İkincil yapı, bir polipeptid zincirindeki amino asitlerin amid ve karbonil grupları arasında hidrojen bağları oluşmasıyla meydana gelir.  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -kıvrımlı tabaka olmak üzere iki tip ikincil yapı vardır.  $\alpha$ -sarmal yapı, bir amino asidin kendinden dört önceki amino asit ile sarmal oluşturması sonucuyla meydana gelir. Bir tam sarmal dönüş 3,7 amino-asit içerir.  $\alpha$ -sarmal yapıda R- grupları dışarıya doğru bakar ve birbirleriyle etkileşim halindedir.  $\beta$ -kıvrımlı tabaka yapısı iki veya daha fazla polipeptid zinciri segmentinin paralel veya anti-paralel şekilde çarşaf şeklini almasıyla oluşur.  $\beta$ -kıvrımlı tabakada R- grupları tabaka düzleminin altında veya üstünde yer alır ve birbirleriyle etkileşim halindedir. Üçüncül yapı, bir polipeptidin hidrofobik, kovalent ve kovalent olmayan etkileşimleri sonucu üç boyutlu bir konformasyon oluşturmasıyla meydana gelir. Polipeptidin katlanması için itici güç, R- grupları ve çevre arasındaki hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlerdir. Bazı proteinler iki veya daha fazla polipeptidin (alt birim) birleşmesiyle oluşan dördüncül yapıya da sahiptir [4].

İnsan genomu protein kodlayan (genomun yaklaşık %2'si) ve kodlamayan bölgelere sahiptir (coding and non-coding DNA). Protein kodlanan bu bölgelerde meydana gelen bir mutasyon, protein yapı ve fonksiyonu üzerinde pozitif, negatif veya nötr sonuçlara yol açabilir. Tek bir amino asit değişikliğine yol açacak (yanlış anlamlı mutasyon) bir mutasyon bile canlı organizmanın hayatta kalmasını zorlaştırabilir. Her hücresel kompartıman pH ve tuz konsantrasyonu gibi farklı koşullara sahiptir. Mutasyon sonucu yanlış bölgeye lokalize olan bir protein, uygun katlanma koşullarını bulamadığı için katlanamayabilir. Bir mutasyon, proteinin aktif bölgelerini, protein-protein etkileşim bölgelerini veya allosterik düzenleme bölgelerini değiştirerek proteinin katalitik aktivitesini etkileyebilir. Mutasyonlar, katlanma sırasında meydana gelen ara ürünü doğru katlanmış olarak kabul edilmesine neden olabilir. Bu durum, katlanamayan bu ara ürünün,

düzgün katlanmış fonksiyonel proteinin yerini almasına neden olabilir. Yanlış katlanmış protein, kısmi işlevselliğe sahip olabilir fakat ER aracılı degradasyon faktörleri sebebiyle ömrü kısa olur. Yanlış katlanmış bu proteinler asıl hedeflerine ulaşamayabilir ve degradasyon dengesi sağlanamazsa bu durum ER'de birikime yol açar [4].

Hücre içi proteomun yarı ömrü, birkaç dakika ile birkaç ay arasında değişiklik gösterir. Bu değişikliğin sebebi ise hücre döngülerinde ve çeşitli çevresel/fizyolojik durumlarda verilen hücrel cevaba bağlı olarak protein degradasyon oranının farklılık göstermesinden kaynaklanmakta ve protein yarı ömrü araştırmaları ile hücrel protein dengesinin anlaşılması hedeflenmektedir. Buna ek olarak bu araştırmalar, protein sentezine müdahale edebilecek bileşiklerin veya mutasyonların proteine olan etkilerini de ortaya koymaktadır. Protein yarı ömrü terminolojisi yaklaşık olarak protein degradasyon oranını yansıtmak ve bu proteinleri sayısal bir değer ile metabolik stabilitelerine göre sınıflandırmak için kullanılmıştır. Bu terminoloji kullanılırken, hücrenin geçirdiği ko ve post-translasyonel modifikasyonlar, protein kalite kontrol mekanizmaları ve degradasyon yolları göz önünde bulundurulmaktadır [5].

Protein homeostasisi, işlevlerini doğru gerçekleştirmek adına proteomun konformasyonunu ve konsantrasyonunu normal düzeylerde tutmak için hareket eden geniş bir iletişim ağını ifade eder (Şekil 2.2.). Protein homeostasisinde, protein sentezi, katlanma ve degradasyon denge halindedir. Hemen hemen her hücrel sürece katılan proteinler için proteostasisi korumak ve düzenlemek önemlidir [6].

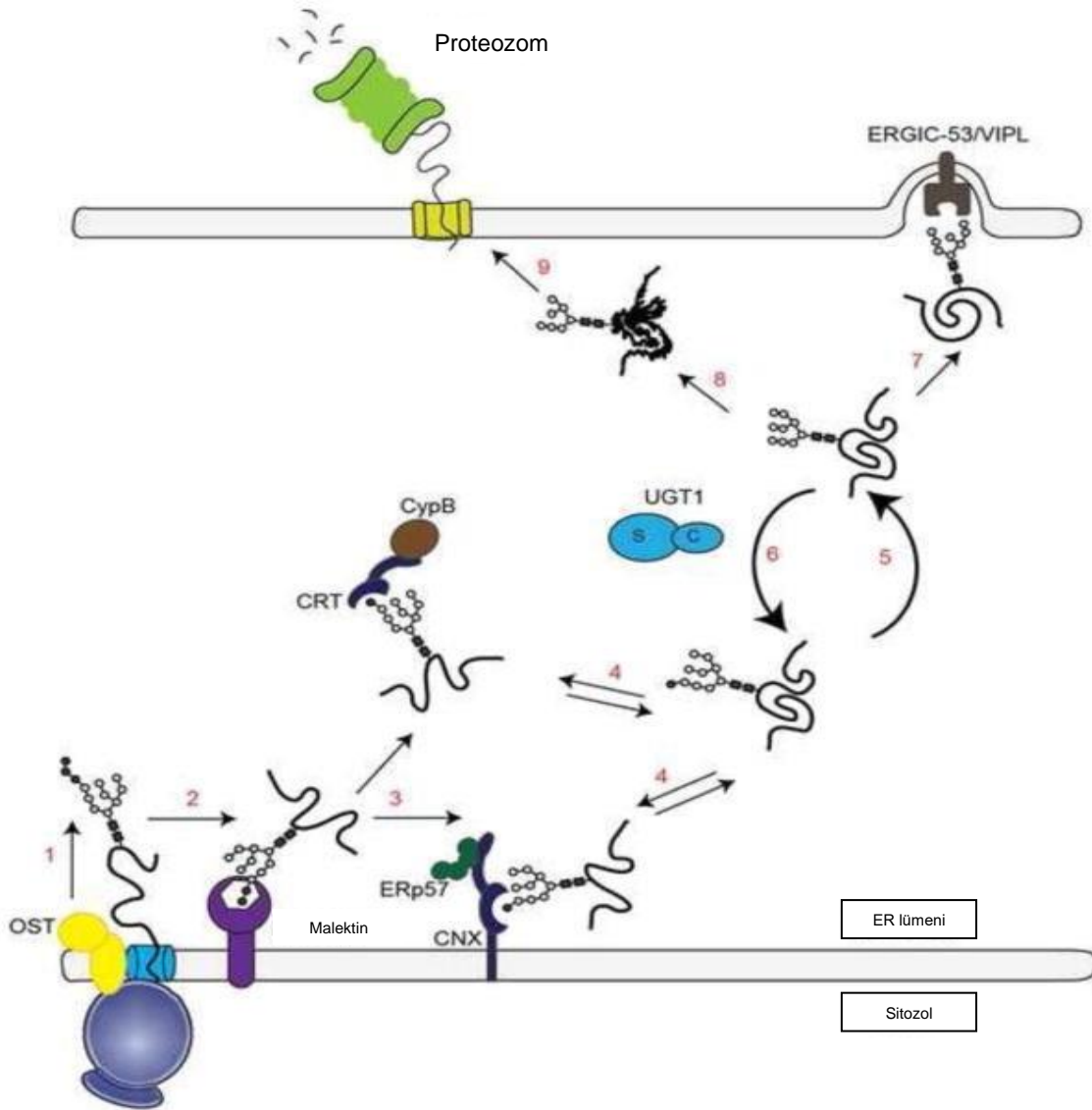


Şekil 2.2. Protein homeostasis ağı ([7] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).



## 2.2. ER Kalite Kontrol Sistemi

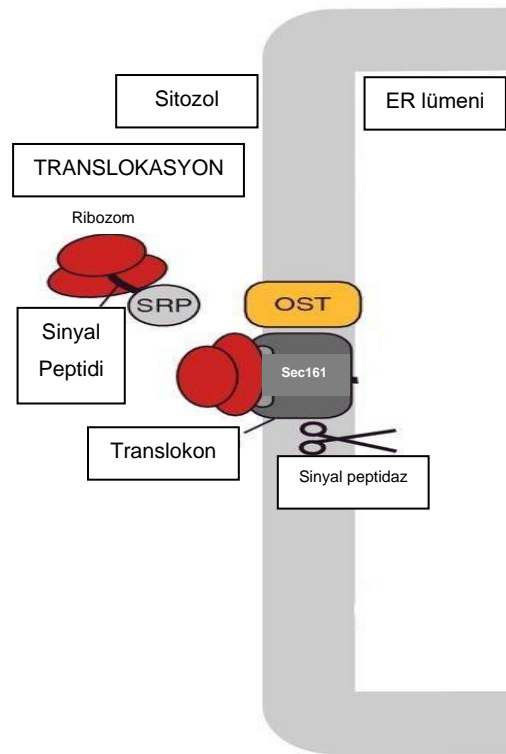
Hücre proteomunun yaklaşık üçte biri ER'e hedefli olarak katlanma ve kontrol sürecini geçirir. ER bu işlemler için moleküler şaperonlara ve katlanma enzimlerine ev sahipliği yapar. Bu hücrel sorgulama adımları moleküler şaperonların keşfinden sonra Helenius ve Hurtley tarafından "protein kalite kontrolü" (ER PQC) [8] olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.3). ER PQC, glikozilasyon ve disülfid bağı oluşumu gibi ko- ve post-translasyonel modifikasyon süreçlerini içerir. Moleküler şaperonlar ve enzimler ise bu süreci yöneten ve proteinin doğru katlanmasını sağlayan moleküllerdir [3].



Şekil 2.3. ER protein kalite kontrol sistemi ([9] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

## 2.2.1 Hedeflenme ve Translokasyon

ER'e hedeflenmiş yeni sentezlenen polipeptid zinciri N-ucunda hidrofobik bir sinyal peptidine sahiptir. Sinyal tanıma partikülü (SRP), translasyonu durdurur ve polipeptid zincirini sinyal peptidi kısmından yakalar. Polipeptid, direkt olarak ER zarındaki Sec61 $\alpha\beta\gamma$  kompleksinden oluşan translokona yönlendirilir ve translokona girişi gerçekleştiğinde translasyon devam eder ve geri kalan polipeptid zinciri ER membranından içeri doğru gerçekleşir. İşlem tamamlandıktan sonra sinyal peptidi sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırılır (Şekil 2.4) [3].

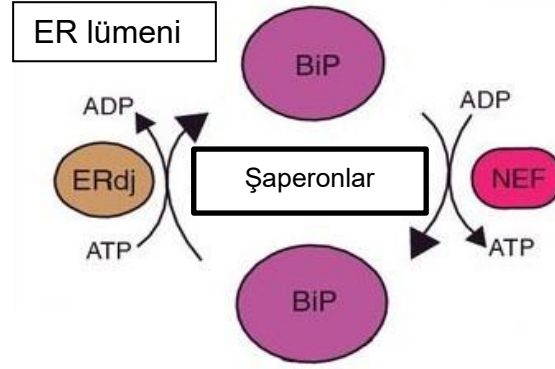


Şekil 2.4. ER'e hedeflenmiş polipeptid zincirinin translokasyonu ([3] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

## 2.2.2. Şaperonlar

Yanlış katlanmış proteinler doğal konformasyonlarından farklı yapıda oldukları için hücre içindeki birçok molekülle istenmeyen etkileşimler kurabilir. Bu nedenle canlı sistemler, bazı önlemlere sahip olanlar lehine evrimleşmiştir. Şaperonlar, bahsedilen bu önlemlerin başlıca molekülleridir. Bazılar ribozomdan çıkan zincirle etkileşime girer, diğerleri ise katlanma sürecinden sonra duruma müdahale eder.

Birçok şaperon çeşidi vardır ve bunlar genellikle birlikte çalışırlar. Sadece proteinlerin doğru katlanmasına rehberlik etmeyip aynı zamanda yanlış katlanmış hatta agregasyon oluşturan proteinlerin de doğru katlanabilmesi için aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu moleküler şaperon aktivite göstermek için adenozin trifosfat'a (ATP) ihtiyaç duyar [2].



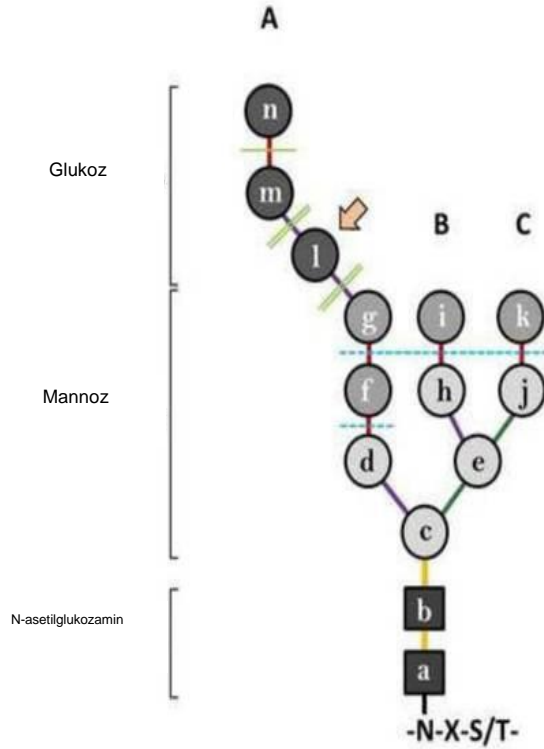
Şekil 2.5. ER'de görevli şaperonlar ve ko-şaperonlar ([3] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

ER, Hsp70 ve Hsp90 şaperon ailelerine ev sahipliği yapar. Hsp70 ailesine ait immüoglobulin bağlayıcı protein (BiP), ATP'ye bağımlı bağlanma ve salınım hareketleri içerir. Yeni sentezlenen polipeptid zincirinin hidrofobik veya agregasyona eğilimli bölgelerine bağlanarak katlanmaya yardımcı olur. BiP şaperonuna ATP hidrolizini katalizleyen ER-yerleşik DNAJ/Hsp40 tipi ko-şaperon üyeleri (ERj1-7) eşlik eder. Bu ko-şaperonlar, BiP ile bağlanmak için His-Pro-Asp (HDP) motifine sahip bir J-domaini içerirler. Ayrıca Sil1 ve Hsp110 şaperon ailesi üyesi Grp170 ise BiP için nükleotid değişim faktörü (NEF) görevi görür (Şekil 2.5). BiP ve ona eşlik eden tüm bu proteinler, polipeptidin translokasyonu, katlanması ve katlanmamış ise hücrel cevabın oluşumunun düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonda rol oynamaktadır [10].

Hsp90 ailesinin üyesi Grp94, ER'de en bol bulunan proteinlerden biridir. Yapısal olarak sitozolik homologuna benzer ve ATP hidrolizine yardımcı olur. Bu şaperonun, katlanma sırasında BiP dahil diğer kalite kontrol elemanları ile kompleks halde olduğu bilinmektedir fakat bağlanma mekanizması ve işlevsel fonksiyonları henüz net değildir [3, 11].

### 2.2.3. Glikozilasyon ve Kalneksin/Kalretikulin Döngüsü

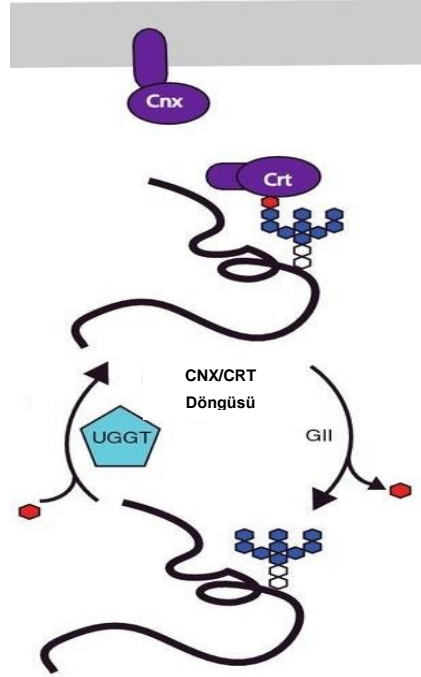
Asparajin-prolin hariç herhangi bir amino asit-serin veya treonin (Asn-X-Ser/Thr) motifindeki asparajine glikan adındaki karbohidratların eklenmesi ökaryotlarda korunmuş ve oldukça fazla görülen bir protein modifikasyonudur. Glikanlar, üç glukoz, dokuz mannoz ve iki N-asetilglukozaminden (Glc3Man9GlcNAc2) oluşur ve asparajin aminoasidine kovalent olarak eklenir (Şekil 2.6). Bu 14 alt birimlik oligosakkaritin transferi oligosakkariltransferaz kompleksi (OST) tarafından gerçekleştirilir. N-glikozilasyon olarak adlandırılan bu modifikasyonda eklenen hidrofilik glikan kalıntıları sayesinde polipeptid zincirinin çözünürlüğü artar ve katlanmada görevli lektin şaperonları ile önemli etkileşimlere izin verir [9].



Şekil 2.6. Asparajine eklenen glikan yapısı ([9] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

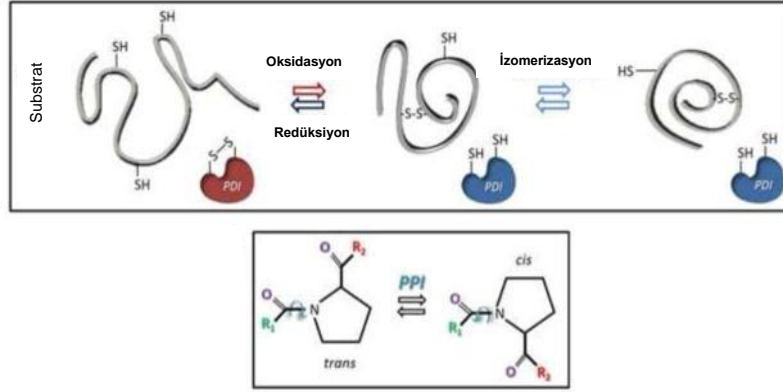
Polipeptid zincirine bağlı oligosakkaritlerin glikanazlar tarafından modifikasyonu sonucu proteinin kaderi belirlenir. Glikan asparajine bağlanır bağlanmaz  $\alpha$ -glukosidaz I ile ilk glukoz kalıntısı kesilir [12]. Uzun süre boyunca ortaya çıkan di-glikozile form, biyolojik önemi olmayan kısa ömürlü bir kırpma ara maddesi olarak görülmüştür fakat malektinin keşfiyle bu görüş değişmiştir. Malektin stres

koşullarında indüklenir ve yanlış katlanmaya başlayan proteinlerin erkenden belirlenmesinde görev aldığı ortaya konulmuştur [13, 14].



Şekil 2.7. Kalneksin/kalretikülin şaperonları ([3] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

$\alpha$ -glukosidaz II, glikan yapısındaki ikinci ve üçüncü glukoz kalıntısını keser ve bu iki kesim karşıt görevleri paylaşır. İkinci glikoz kalıntısının kesilmesi sonucu ortaya çıkan mono-glikozile form kalneksin (CNX) ve kalretikülin (CRT) lektin şaperonları tarafından tanınır (Şekil 2.7). CNX tip 1 membran proteini ve CRT ile %39 oranında dizi homolojisine sahiptir [15]. Benzer yapısal özellik taşırlar ve her ikisi de lektin bağlanma bölgesine sahiptir [16]. ER'e yerleşik özelleşmiş enzimler, disülfid bağlarının oluşumunu ve peptidil prolil bağlarının izomerizasyonunu katalizler. Bu işlevler sırasıyla peptidil disülfid izomeraz (PDI) ve peptidil prolil izomeraz (PPI) enzim ailelerinin üyeleri tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.8). PDI enzim ailesi üyeleri, Cys-X-X-Cys (CXXC) motifini içeren en az bir tioredoksin (Trx) benzeri alanın varlığıyla tanımlanır. Yapılan çalışmalara göre PDI ailesinden oksidoredüktaz ERp57 ve PPI ailesinden siklofilin B (CypB) enzimlerinin CNX ve CRT ile kompleks oluşturduğu önerilmiştir. Bu kompleks yapı, oksidatif katlanmayı ve peptidil prolil bağlarının izomerizasyonunu düzenlemektedir [17, 18].

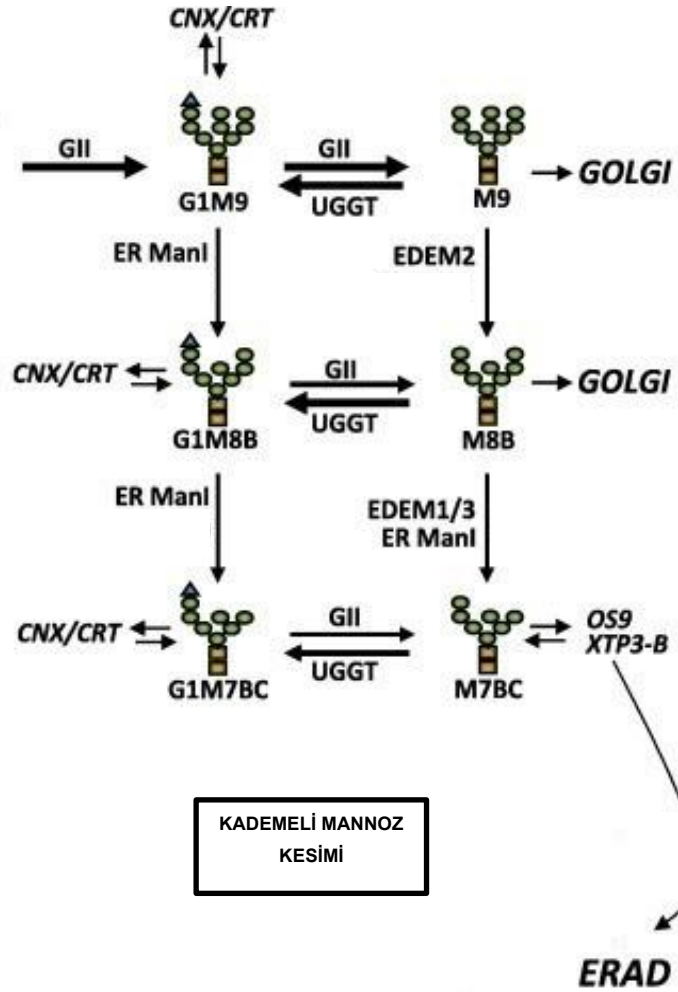


Şekil 2.8. Disülfid bağlarının oluşumunu ve peptidil protil bağlarının izomerizasyonunu katalizleyen PDI ve PPI enzim aileleri ([9] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Üçüncü glukoz kalıntısının kesilmesi sonucu glukoz kalıntısı bulundurmayan bir polipeptid zinciri oluşur ve afinite azalması nedeniyle lektin şaperonları zincirden ayrılır [19]. Bu ayrışmadan sonra proteinin doğru katlanıp katlanmadığına karar verme süreci başlar. Bu aşamada protein doğru katlanmışsa ER'den çıkışı ve hedeflerine ulaşmaları sağlanır. Yanlış katlanmışsa CNX/CRT'nin tekrar proteine bağlanmasını ve katlanma sürecini yeniden başlatmasını sağlamak için çıkarılan glukoz kalıntısı UDP-glukoz/glukoprotein glukozil transferaz (UGGT1) tarafından glikan yapısına tekrar takılır (re-glikozilasyon). Eğer proteinin doğru katlanması mümkün değilse degradasyon yolağına yönlendirilmesi gerçekleştirilir. Bu karar sürecini gerçekleştiren UGGT1, katlanma sensörü olarak tanımlanmıştır. Protein üzerindeki hidrofobik bölgeler gibi kusurları tanıyarak bu karar sürecini yönetir [20, 21].

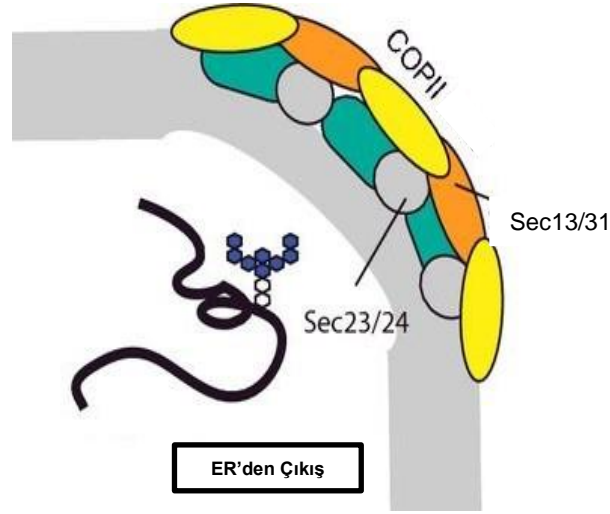
UGGT1'in yanlış katlanan proteinleri re-glikozilasyon ile CNX/CRT döngüsüne sokması sonsuz bir süreç değildir ve bir süre sonra katlanamayan protein degradasyon yolağına yönlendirilmektedir. Bu yönlendirme zamanının, mannoz rezidularının kademeli olarak kesilmesiyle belirlendiği düşünülmektedir (Şekil 2.9). ER  $\alpha$ 1,2-mannosidaz I (ER Man I) ve EDEM 1, 2 ve 3 (ER degradasyon arttırıcı alfa mannozidaz benzeri) proteinleri bu görevi glikanın B ve C kollarındaki mannozları uzaklaştırarak gerçekleştirir. Bu sürecin son bulmasının UGGT1'in afinitesinin azalmasıyla [22] veya re-glikozilasyonun gerçekleştiği glikanın A

kolundaki mannoz rezidusunun uzaklaştırılmasıyla [23] açıklanabileceği önerilmektedir [24].



Şekil 2.9. Mannoze rezidularının kademeli olarak uzaklaştırılması ([25] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Düzgün katlanmış protein CNX/CRT döngüsünden ayrıldıktan sonra ER-Golgi arası bölgeye (ERGIC), daha sonra Golgi aygıtına hedeflenir. ER'den çıkış, translokasyonun olduğu bölgelerin zıt yerlerinde bulunan belirli membran bölgelerinden vezikül oluşturarak gerçekleşir. Kaplama protein kompleksi (COPII), iç yüzeyinde hedefe ulaştırılacak proteinleri tanıyan ve sınıflandıran Sec23/Sec24 kompleksini ve dış yüzeyinde hedef membrana bağlanmayı sağlayan Sec13/Sec31 kompleksini barındırır (Şekil 2.10). COPII adındaki bu kaplama kompleksi sayesinde doğru katlanmış proteinin ER'den kontrollü bir şekilde çıkışı gerçekleşmiş olur [26].



Şekil 2.10. ER'den çıkış ve COPII kompleksi ([3] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

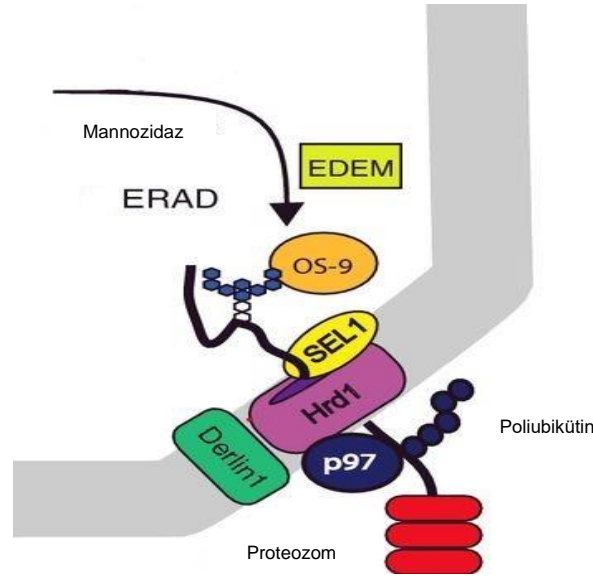
#### 2.2.4. ER Aracılı Degradasyon

Protein kalite kontrolü sisteminin tüm bu elemanlarının çabalarına rağmen transloke olan protein, sistemin hata payı, mutasyonlar veya çeşitli çevresel etkenler sonucu doğru katlanamayabilir. Bu nedenle yanlış katlanan proteinler ER ilişkili degradasyon (ERAD) olarak adlandırılan bir dizi işleme maruz kalırlar. Bu süreç üç temel adımda gerçekleşmektedir: (i) yanlış katlanmış proteinin tanınması ve re-translokasyona yönlendirilmesi, (ii) re-translokasyon ve (iii) degradasyon [27].

*Saccharomyces cerevisiae*'de yapılan çalışmalara göre ERAD sürecinin korunmuş bir mekanizması keşfedilmiştir. Protein, katlanma hatasının yerine göre ERAD-L (lümen), ERAD-M (membran) veya ERAD-C (sitoplazma) yolları tarafından tanınır ve ubiquitinlenir. Substrat re-translokasyonunda rol alan membran proteinleri ise, Hrd1 (ERAD-L/ERAD-M) ve Doa10 (ERAD-C) olarak adlandırılan E3 ubiquitin ligazlarıdır. Memelilerde bireysel ve beraber çalışan birçok E3 ligaz bulunması nedeniyle mayalardaki gibi belirtilen üç sınıfa yerleştirmek zorlaşır. Fakat hem maya hem memeli hücrelerinde şaperon aracılı substrat tanıma, ER'den retrotranslokasyon, poliubikütinasyon ve proteozom aracılı degradasyon mekanizmaları görülmektedir [28].



Yanlış katlanan proteinleri kalneksin/kalretikülin döngüsünden kademeli mannoz kesimleriyle çıkararak degradasyon yolağına yönlendiren EDEM ailesi üyeleri (EDEM 1, 2 ve 3), ERAD mekanizmasına yönlendirme ve degradasyonu hızlandırma konusunda öncü proteinlerdir. Mannoz kesimleri sonucu ortaya çıkan katlanamamış protein, OS9 ve XTP3-B lektinleri tarafından tanınır ve degrade olmak üzere re-translokona yönlendirilir. OS9 ve XTP3-B birbiriyle etkileşime girmez fakat ER membran proteini olan SEL1L sayesinde Hrd1 E3 ubiquitin ligaz ve Derlin1 kompleksi ile birlikte çalışır. OS9 ayrıca BiP/GRP94 ile de etkileşime girer (Şekil 2.11). Burada BiP/GRP94'ün görevinin Hrd1 kompleksinin düzenlenmesi ve yanlış katlanmış proteinlerin diğer etkileşimlerinin engellenmesi olduğu düşünülmektedir [29-31].



Şekil 2.11. ERAD mekanizması ile proteozoma yönlendirme ([3] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Re-translokasyon tamamlandıktan sonra ERAD substratları serin/treonin rezidularından ubiquitinlenir. Ubikütinasyon ERAD substratlarının proteozoma etkili bir şekilde ulaşması için sitozolde gerçekleşir. Ubikütinasyon p97'nin çeşitli ERAD bileşenleriyle ve ubiquitinasyon zinciri bağlayıcılarıyla etkileşim kurmasıyla sağlanır. Ubikütinlenmiş proteinler HR23A/B ve Ubiquilin-1 taşıyıcılarıyla proteozoma taşınır ve degrade edilir [32].

Katlanma, biyolojik aktivitelerin regülasyonu ve hedef proteinlerin farklı lokalizasyonlara taşınması açısından önemli mekanizmalardır. Yanlış katlanmış proteinler kontrol mekanizmalarından kaçabilir ve bu durum birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. İlk grupta, nokta mutasyonlarından kaynaklanan ve protein fonksiyon kaybına yol açan hastalıklar mevcuttur. Bu bozuk proteinlerin toksik agregatlar oluşturmasıyla ortaya çıkan hastalıklar ise ikinci gruba dahildir. Proteinlerin yanlış katlanmasıyla ilişkili hastalıklar, kalıtsal bir mutasyon sonucu veya yaşlanmadan kaynaklanan protein homeostasisinin bozulması sonucu ortaya çıkabilir [1, 2]. Kalıtsal Diabetes insipidus, yukarıda bahsedildiği gibi, mutasyon sonucu yanlış katlanmış proteinlerin sebep olduğu hastalıklardan biridir.

### **2.3. Diabetes insipidus**

Diabetes insipidus (DI), aşırı miktarda idrar oluşumu (poliüri) ve aşırı miktarda susama (polidipsi) ile karakterize olmuş bir hastalıktır. Hastalık her yaşta ortaya çıkabilir ve yayılımı erkekler ve kadınlar arasında benzerdir. Kesin yaygınlık verileri bulunmamasına rağmen edinilmiş DI tipleri, kalıtsal DI tiplerinden daha yaygındır. Sebeplerine göre gestasyonel DI, primer polidipsi, Nefrojenik DI (NDI) ve Santral DI (CDI) olmak üzere sınıflara ayrılır. Sonuç olarak hastalığın tüm tiplerinde böbrek, idrarı konsantre edemez. DI hastaları günde yaklaşık 3-20 litre arası idrar oluşturabilir ve sürekli su alımına ihtiyaç duyabilir. Hipotonik idrar çıkışına bağlı hiponatremi durumu ise ölüme varan sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle vücuttaki su dengesinin korunması ve bu dengeye etki eden mekanizmaların aydınlatılması büyük önem taşımaktadır [33-35].

Vazopressin hormonu (AVP) veya antidiüretik hormon (ADH) ise basitçe vücuttaki su dengesinin kontrolünde ve ilişkili hastalıklarda büyük rolü olan dokuz amino asitlik bir peptid hormondur. Hipotalamusta sentezlenir ve nörohipofiz bölgesinde depo edilir. Prehormon olarak sentezlenen AVP (preprovazopressin), yapısında sinyal peptidi, nörofizin II (NPII) ve glikoprotein içerir. Hormonun olgunlaşması sırasında ER'e girişinden sonra sinyal peptidi kesilir ve katlanma süreci gerçekleşir. Olgunlaşma tamamlandıktan sonra AVP

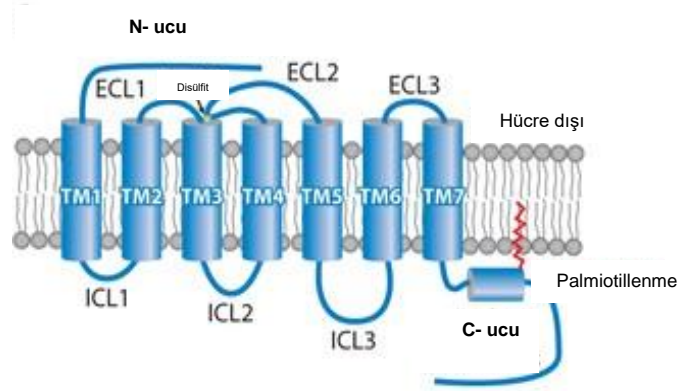
NPİI'den ayrılır ve salgı granülleri içerisinde salgılanma için sinaps yakınında muhafaza edilir [36].

Vazopressin, vücuttaki su dengesini sağlayacak üç ana etkiye sahiptir. Bunlardan ilki, distal tübüllerin ve nefronlardaki toplama tübüllerinin suya geçirgenliğini artırmasıyla ve suyun yeniden emilmesini sağlamasıyla gerçekleşir. Bu işlevi bir dizi uyarıcı sayesinde toplama kanalındaki epitel hücrelerin apikal membranına aquaporin 2 su kanalı proteinlerinin (AQP2) yerleşmesini sağlayarak gerçekleştirir. İkinci etki, toplama kanalının papiller kısmının üreye geçirgenliğini artırarak ürenin geri emilimini sağlar ve suyun geri emilimi ile artan konsantrasyonu düşürür. Üçüncü etki,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  pompasının aktivitesini artırarak Henle kulbunun çıkan kolunda sodyum geri emilimini artırır [37].

Dehidrasyon sonucu plazma ozmolalitesindeki artış, vazopressin salınımının ana uyarandır ve su dengesi bu ozmolalite değişimleri ile sağlanır. Vazopressin için diğer uyarılar ise kan dolaşım hacmindeki düşüş ve stres durumlarıdır [38]. Plazma ozmolalitesi fizyolojik bir eşiğin üzerindeki seviyelere yükseldiğinde (çoğu insanda kilogram su başına 290-295 mOsm), nörohipofizdeki vazopressinerjik sinir uçlarından vazopressin hormonu salınımı artar. Yüksek ozmolalite, susamayı da tetikler. Bu uyarılar sonucu salgılanan vazopressin, böbrekteki reseptörlere bağlanır ve filtrelenmiş suyun büyük bir kısmı kan dolaşımına geri döner [39].

Vazopressinin bahsedilen etkileri ortaya çıkaracak biyokimyasal akışı gerçekleştirmesi için vazopressin reseptörüyle etkileşime girmesi gerekir. Bu etkileşimin gerçekleşebileceği üç tip reseptör tipi vardır. V1a, V1b ve V2 (AVPR1a, AVPR1b ve AVPR2) olarak adlandırılan bu vazopressin reseptörleri G protein bağlı reseptör (GPCR) ailesinin üyeleridir. Bu reseptörler, tipik heptahelikal GPCR yapısı gösterirler (Şekil 2.12) [37].

GPCR'ler, ışık, koku, hormon ve büyüme faktörleri gibi birçok uyarana yanıt veren geniş bir reseptör ailesidir. Alfa sarmal yapısında yedi transmembran içeren bir integral membran proteinidir (Şekil 2.12). G proteinleri ise bu reseptörün sinyal iletimindeki öncü görevlilerdir. G proteinleri,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinden oluşur. Bilinen 20  $\alpha$ , 5  $\beta$  ve 13  $\gamma$  alt birim tanımlanmıştır.  $G\alpha$  alt birimi,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  ve  $G\alpha_{12}$  olmak üzere kendi içinde dört farklı gruba sahiptir. Reseptör ligandı tarafından aktive edildikten sonra GDP (guanozin difosfat), GTP (guanozin trifosfat) ile yer değiştirir ve birbirine sıkıca bağlı olan heterotrimerik yapıdaki G proteinleri  $G\alpha$  ve  $G\beta\gamma$  olmak üzere ayrılarak sinyalizasyonu başlatır. GPCR sinyal iletiminde yer alan farklı bir yolağın görevlileri de arrestinlerdir [40-42].



Şekil 2.12. GPCR yapısı ([40] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

GPCR ailesinin üyeleri olan AVP reseptörleri yapısal olarak şu özelliklere sahiptir [43] :

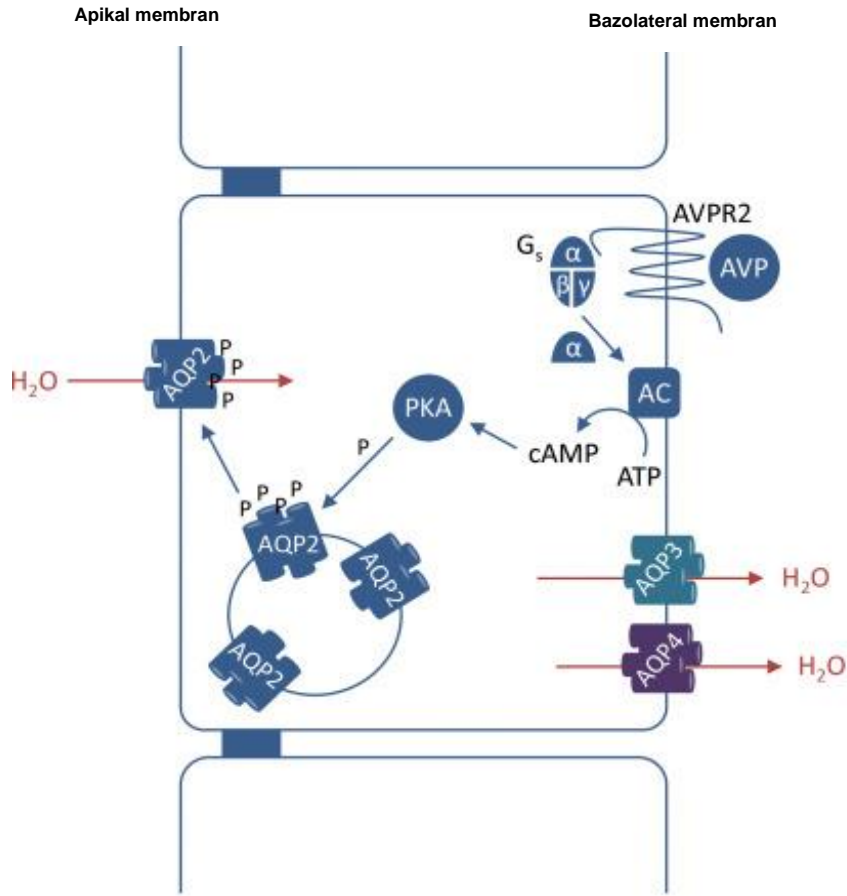
- 1. ve 2. hücre dışı halkalarında (ECL) yer alan sistein reziduları arasında disüflit köprüsü bulunur. Bu köprü, reseptörün uygun konformasyonda kalmasına destek olur.
- 7 transmembran domeyninde (TMD) bulunan ligand bağlanma bölgelerine sahiptir.
- 2. Hücre içi halkasının (ICL) proksimal bölgesinde aspartat (D)-arjinin (R)- tirozin/histidin (Y/H) (DRY/H motifi) motifi bulundurur. Bu motifin GPCR için hücre içi sinyalizasyonda ve konformasyonel kararlılıkta önem taşıdığı düşünülmektedir.

- TMD bölgelerindeki prolin reziduları reseptör katlanması ve işlenmesi için önem taşır.
- TMD7'de reseptör internalizasyonunda ve sinyalizasyonunda görev alan Asn-Pro-X-X-Tyr (asparajin-prolin-herhangi bir amino asit-tirozin) bulunur.
- C-ucu domeyninde palmitillenene ve dördüncü bir ICL oluşturan iki bitişik sistein rezidusu bulunur.
- C-ucu domeyninde G proteiniyle ilişkili kinaz (GRK) fosforile serinler kümesi, reseptör internalizasyonunu ve desensitizasyon oranını kontrol eder.

AVP'nin V1a reseptörlerine bağlanması Gq-PLC yolağını aktive eder ve inositol 3-fosfat (IP3) ve diaçilgliserol artışına neden olur. Bu öncüller hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artırır ve bunun sonucunda protein kinaz C aktive olur. Protein kinaz C ise hücre tipine özgü proteinleri fosforile ederek bazı spesifik biyolojik etkilere neden olur. Bunlar; AVP'nin V1a reseptörü ile etkileşimi, damar daralması, platelet agregasyonu olaylarını uyarır. Bu etkilerinden dolayı AVP'nin arteriyal hipertansiyon, kalp yetmezliği ve ateroskleroz patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir. AVP'nin V1b reseptörü ile etkileşimi sonucu ise adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımı uyarılır ve bu reseptör ACTH üretiminin arttığı tümörlerde önemli bir belirteçdir. Ayrıca bağlanma sonrası oluşan mitotik etki, AP-1 transkripsiyon faktörünün ve onun c-fos ve c-jun alt birimlerinin aktivasyonunu ile gerçekleşir [44, 45].

Böbrek toplama kanalındaki hücrelerin bazolateral membranlarında ise V2 reseptörleri bulunur. AVP'nin V2 reseptörüne bağlanması  $G_s$ -adenil siklaz yolunu aktive eder. Siklik AMP (cAMP) içeriği ve protein kinaz A aktivitesindeki artış, AQP2'lerin fosforillenmesini sağlar ve tetramerler halinde oluşan AQP2'leri içeren veziküllerin apikal membrana yerleşimi gerçekleşir. Aynı zamanda bu veziküllerin endositoz oranı, reseptör ile etkileşimin bir sonucu olarak azalır. Hücre içerisine AQP2'lerin oluşturduğu su kanalları vasıtasıyla su alımını gerçekleştirmiş olur. Su alımı ile denge sağlandığında sinyal iletimi durur ve AQP2'ler membrandan endositoz aracılığıyla uzaklaştırılır. Hücreye alınan suyun

kan dolaşımına geçmesi ise bazolateral membranda bulunan AQP3 ve AQP4 su kanalları ile gerçekleşir (Şekil 2.13) [37, 45].



Şekil 2.13. Böbrek toplama hücrelerinde gerçekleşen su geri emilim sinyalizasyonu ([46] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Su dengesinde rol alan bu moleküllerdeki eksiklik ve/veya sinyal iletimindeki aksaklıklar, hamilelik, psikolojik veya fizyolojik rahatsızlıklar ve/veya kullanılan ilaçların yan etkileri DI'ya neden olabilir. Hastalığın tipleri ise su dengesini bozan etmenlere göre sınıflandırılmıştır. Temel olarak 4 tip DI vardır:

- 1- Gestasyonel DI
- 2- Primer Polidipsi
- 3- Nefrojenik DI
- 4- Santral DI

### **2.3.1. Gestasyonel DI**

Gestasyonel DI, sadece gebelerde görülen, vazopressin dolaşımındaki aksaklıktan kaynaklanan bir DI türüdür. 30.000 gebede 1 görülen bir hastalıktır. 1942 yılında Blotner ve Kunkel tarafından yapılan çalışmada gebelik sırasında görülen DI olarak ilk kez önerilmiştir [47]. Yapılan çalışma sonucu hastalığın, vakalardaki vazopressin seviyesindeki ve fonksiyonundaki değişikliklerden kaynaklandığı önerilmiştir. Daha sonra yapılan birçok çalışmada gebelik döneminde görülen DI vakalarının çeşitli nedenleri olduğu ortaya koyulmuştur. Gebelik döneminde görülen ve geçici olan gestasyonel DI'nın plasentadaki vazopressinaz enzimi üretiminin aşırı artışından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum da, annenin dehidrasyon ve hipernatremi riski altında olmasına neden olur. Bu nedenle hamilelik sırasında gözlemlenen DI semptomlarını tanımlamak, değerlendirmek ve çözüm sağlamak büyük önem taşımaktadır [48, 49].

### **2.3.2. Primer Polidipsi**

Primer polidipsi, düzgün işleyen bir AVP salgılanmasına ve antidiüretik renal tepkilere rağmen aşırı sıvı alımından dolayı poliüri görülen bir DI tipidir. Hastalık iki alt tipe sahiptir. Primer polidipsinin psikojenik olarak adlandırılan alt tipi, nörogelişimsel (otizm ve zihinsel engel gibi) veya psikotik (şizofreni ve bipolar bozukluk gibi) bozukluklara sahip hastalarda görülür. Özellikle kronik şizofreni hastaları primer polidipsi vakalarının yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Psikotik bozukluğa sahip primer polidipsi hastaları nadiren susuzluktan şikâyet ederler ve aşırı su tüketiminin kendilerini daha iyi hissettirdiğini ve anksiyetelerini azalttığını ifade ederler. Primer polidipsinin dipsojenik DI olarak adlandırılan diğer bir alt tipi ise artan susuzluk hissi ile ilişkilendirilir. Fakat susuzluk hissini artması, psikolojik faktörlerden değil hipotalamusta yer alan susuzluk merkezindeki kusurlardan kaynaklanmaktadır [50-52].

### **2.3.3. Nefrojenik DI**

NDI, vazopressinin V2 reseptörü (AVPR2) ile bağlanması sonucu oluşacak yanıt sürecinin aksamasından kaynaklanmaktadır. AVP salınımında sorun

olmamasına rağmen AVP'nin AVPR2 ile bağlandığında ortaya çıkaracağı biyokimyasal tepki oluşmaz veya yetersiz oluşur. Kalıtsal tipi, AVPR2 veya AQP2 genlerinde gerçekleşen mutasyonlar nedeniyle, edinilmiş tipi ise lityum gibi ilaçların yan etkileri nedeniyle veya hiperkalsemi gibi elektrolit bozukluklar nedeniyle ortaya çıkar [53].

### **2.3.3.1. Edinilmiş NDI**

Edinilmiş NDI, kalıtsal NDI'dan çok daha yaygındır. Nadiren şiddetlidir ve poliüri ve polidipsi durumu orta düzeydedir (3-4 L/gün). Edinilmiş NDI'nın başlıca nedeni lityum tedavisidir. Lityum, kısa vadede AQP2 ifadesinin azalmasına, uzun vadede toplama kanalı ana hücrelerinin kaybına neden olur [54, 55]. Lityum tedavisi bipolar bozukluk, şizoaffektif bozukluk, depresyon, alkolizm ve küme baş ağrıları tedavisinde kullanılmaktadır. Lityum tedavisinin kesilmesi NDI semptomlarını giderebilir fakat tercih edilmez. Çünkü ilacın psikiyatrik bozukluk üzerindeki olumlu etkileri, neden olduğu olumsuz etkilerinden daha ağır basar [56, 57].

Edinilmiş NDI'nın diğer bir nedeni de hiperkalsemi, hiperkalsiüri ve obstrüktif üropati olarak adlandırılan, çeşitli nedenlerle gerçekleşebilen idrar yolu tıkanıklığıdır. Obstrüktif üropatisi olan hastalarda, hidrostatik basınç etkisiyle AQP2 ifadesi baskılanabilir. Hiperkalsemi ve hiperkalsiüri gibi elektrolit bozukluklarına bağlı olarak AQP2'nin otofajik degradasyonu indüklenebilir. Bu gibi sebepler edinilmiş geçici NDI semptomlarının oluşmasına neden olmaktadır [56].

### **2.3.3.2. Kalıtsal NDI**

Kalıtsal NDI ilk olarak 1950 yılında birkaç erkek hastada cinsiyete bağımlı ve kalıtsal olarak tanımlanmıştır [58]. Daha sonra hastalığın X kromozomu (Xq28) üzerinde bulunun AVPR2 genindeki mutasyonlardan kaynaklandığı bulunmuştur. X'e bağlı kalıtım modeline sahip olduğu için hastaların çoğu erkektir. AVPR2 proteinin 371 amino asitlik kodlanan DNA'sında gerçekleşen bir mutasyon, farklı semptomlarda gözlemlenebilen bu hastalığın ortaya çıkmasına neden olur. Yeni



doğanlarda ve çocuklarda bu genetik hastalığın teŖhis edilmesi, hafif formlarında büyüme geriliği olarak ortaya çıksa da ağır formlarında ölümlle sonuçlanabildiğinden dolayı zorlaŖır [33, 59, 60].

*AVPR2* genindeki mutasyonlar, fonksiyonlarına göre sınıflara ayrılmıŖtır. 1. tip mutasyona sahip *AVPR2* proteini hücre yüzeyine ulaŖır fakat ligand bağlanması gerçekteŖmediđi için cAMP üretimi indüklenemez. Hücre yüzeyindeki mutant *AVPR2*'lerin fonksiyonu, bağlanma afinitesi analizleriyle veya immünofloresan analizlerle belirlenebilir. En çok görölen, 2. tip mutasyona sahip *AVPR2*, sorunlu bir hücre içi taŖınmaya sahiptir. Bu tip mutasyonlarda protein glikozillenir fakat glikozil uzaklaŖtırılarak gerçekteŖen olgunlaŖma evresi meydana gelmez. Genellikle salgı proteinlerinin, integral membran proteinlerinin ya da ER veya Golgi aygıtı gibi kompartımanlara hedeflenen enzimlerin katlanmasını etkileyen mutasyonlar, direkt olarak fonksiyon kaybına neden olurlar çünkü oluŖan mutant proteinler varıŖ noktalarına ulaŖamazlar. Bu nedenle mutasyon içeren *AVPR2* görev göreceği hücre membranına ulaŖamaz ve Golgi aygıtı öncesi bir sekresyon yolağında takılı kalır. 3. tip mutasyona sahip *AVPR2*'ler başarısız bir transkripsiyon geçirir ve bu durum, hızlı bozulan kararsız mRNA'lara yol açar. Bu tip mutasyonlar nadir görölmektedir [61].

Mutant *AVPR2*, AVP mutantlarında olduğu gibi toksik bir agregat oluŖturma eğiliminde değildir. Daha çok yanlıŖ katlanmış polipeptidin hızlı bir Ŗekilde degrade olduğu dűŖünölmektedir çünkü *AVPR2*'nin ifade edildiği toplama kanalının ana hücrelerinde diğer önemli iŖlevler tamamen normal gerçekteŖir. Bu hücrelerde epitelyal sodyum kanalı ifade edilir. Bu kanalın azalmıŖ fonksiyonu ise sodyum kaybetmeye neden olmaktadır fakat *AVPR2* mutasyonlarına sahip hastalarda bu durum gözlemlenmemiŖtir [62].

Human Gene Mutation Database'e (HGMD) göre *AVPR2* geninde 287 mutasyon tanımlanmıŖtır (The Human Gene Mutation Database, HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=AVPR2>, EriŖim tarihi: 17.08.2020). Tanımlanan bu mutasyonların büyük bir kısmı farklı Ŗekillerde etkisini gösteren

yanlış anlamlı mutasyonlardır. Buna ek olarak delesyon ve insersiyonun neden olduğu çerçeve kayması yaklaşık %24, anlamsız mutasyonlar yaklaşık %9, büyük delesyonlar yaklaşık %11, çerçeve içi delesyon veya insersiyonlar yaklaşık %4 ve kırılma bölgesi mutasyonları yaklaşık %2 oranındadır. Mutasyonlar genel anlamda reseptörün tüm etki alanlarında görülmüştür fakat mutasyona en çok rastlanan bölgeler transmembran domeynlerdir [53, 62].

Kalıtsal NDI, %90 oranla X kromozomu (Xq28) üzerinde bulunun *AVPR2* genindeki mutasyonlardan kaynaklıdır. Geriye kalan %10'luk oranda ise otozomal dominant veya otozomal resesif kalıtsal olarak, 12q13 bölgesinde bulunan *AQP2* genindeki mutasyonlar bu hastalığa neden olur. *AQP2* genindeki mutasyonlardan kaynaklanan NDI, ilk olarak hem erkek hem de kadın bireylerde ciddi poliürik semptomlar gösteren, reseptörün sinyal iletimi aşamasında değil (cAMP üretimi), daha sonrasında defekti olan, X'e bağlı olmayan bir NDI formu olarak önerilmiştir [61].

Tespit edilen *AQP2* mutasyonlarının çoğu, otozomal resesif NDI'ya neden olan anlamsız ya da yanlış anlamlı mutasyonlardır. Bazı *AQP2* mutasyonları, membrana yanlış yerleşen fakat fonksiyonel akuaporin 2 su kanalları ifade edilmesine neden olurken, bazı mutasyonlar ise ERAD'a yönlendirilen ciddi şekilde yanlış katlanmış proteinlerle sonuçlanır. *AQP2*'nin C-ucundaki mutasyonlar ise otozomal dominant karakterde NDI'ya neden olur. Bu bölgede gerçekleşen mutasyonlar genellikle katlanma yapısı etkilemez fakat hücre içi taşıma için kritiktir. Bu nedenle karboksil ucunda meydana gelen mutasyonların, heterotetramer yapısındaki *AQP2*'lerin Golgi aygıtında tutulmasına neden olduğu ve hücre membranına taşınamamasından dolayı dominant karakter gösterdiği düşünülmektedir [63, 64].

#### **2.3.4. Santral DI**

CDI, vazopressin üretimindeki veya salgılanmasındaki aksamadan kaynaklanır. Cinsiyet ve yaş fark etmeksizin ortaya çıkmaktadır ve en yaygın görülen DI tipidir.

Bu aksama mutasyon sonucu kalıtsal olarak veya tümör gibi rahatsızlıklardan dolayı edinilmiş olarak meydana gelebilir. AVP eksikliği sonucu, hastalarda poliüri ve polidipsi gibi klasik DI semptomları meydana gelir. Nadiren kalıtsaldır ve yaklaşık 25.000 kişide 1 görülür. Kalıtsal olan CDI aynı zamanda nörohipofizal DI olarak da isimlendirilir ve X'e bağlı çekinik, otozomal dominant veya otozomal resesif olarak aktarılır [65, 66].

#### **2.3.4.1. Edinilmiş CDI**

Edinilmiş CDI tipleri travma, tümör, inflamasyon veya vasküler hastalıklara bağlı olabilir. Genellikle, dolaşımdaki vazopressinin tamamen veya kısmen eksikliği, nörohipofizin travmatik veya patolojik durumundan kaynaklıdır. CDI'nın en çok karşılaşılan nedeni, AVP nöron sistemine zarar veren merkezi sinir sistemi tümörleridir. Aynı şekilde bu bölgelerde gerçekleştirilen cerrahi işlemler de DI semptomlarına neden olmaktadır. DI hastalığının ortaya çıkması için, hipotalamusta AVP üretimi görevini üstlenen magnoselüler hücrelerde %80-90 oranında kayıp yaşanması gerekmektedir. AVP'nin salınımını regüle eden ozmoreseptörlerdeki tahribat da edinilmiş CDI'ya neden olur. Edinilmiş CDI idiyopatik olarak da görülmektedir. Bu hastalar genelde yaralanma veya hastalık geçmesine sahip değillerdir. Yapılan araştırmalar sonucunda, idiyopatik edinilmiş CDI hastalığının, nörohipofizin otoimmün yıkımından dolayı meydana geldiği önerilmektedir [63, 67, 68].

#### **2.3.4.2. Kalıtsal CDI**

Ailesel nörohipofizal DI olarak da adlandırılan kalıtsal CDI, DI vakalarının %10'undan daha azını oluşturur. AVP, WFS1 (wolframin kodlar) ve PCSK1 (pro-protein konvertaz substilin/kexin tip 1 kodlar) genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır. PCSK1, hipotalamik ve sindirim hormonlarının işlenmesinde rol oynar ve bu bölgede gerçekleşen mutasyonlara sahip hastaları yaklaşık %80'i santral DI semptomları gösterir [63, 69].

Otozomal dominant olarak aktarılan kalıtsal CDI, AVP'nin kopeptin kısımları dışında meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır. Tanımlanmış 70'ten fazla mutasyon, otozomal dominant kalıtsal CDI ile ilişkilendirilmiştir. Mutasyona sahip heterozigot bebekler doğumda sağlıklıdır. Fakat mutasyonun yerine göre hastalığın başlangıç zamanı değişiklik gösterir. Sinyal peptidinde mutasyona sahip bireylerde daha geç yaşta (genç erişkinlik) semptomlar meydana gelmesine rağmen, AVP taşıyıcı NPll'de mutasyona sahip bireylerde semptomların ortaya çıkması daha erken olur. Mevcut araştırmalar, oluşan mutant proteinlerin magnoselüler nöronların ER'de tutulduğunu göstermektedir [70].

Otozomal resesif kalıtım gösteren CDI, AVP'deki veya diğer genlerdeki mutasyonların neden olduğu nadir bir tiptir. Klinik fenotipi otozomal dominant karakterdeki CDI'dan farklılık gösterir. En yaygın formu, Wolfram sendromuna da sebep olan WFS1 genindeki mutasyonlardan kaynaklanır [63].

X'e bağlı çekinik kalıtım gösteren CDI ise santral DI fenotipi gösteren bir çocukta tanımlanmıştır. Xq28 bölgesinde olduğu düşünülmektedir fakat sorumlu gen veya genler henüz tanımlanmamıştır [71].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan tez çalışmasında, NDI hastalığına neden olduğu belirlenen *AVPR2* geninde grubumuz tarafından tanımlanan G12E, H80Y, V88M, V88L, R106C, V215M ve L219P mutasyonlarının reseptör proteininin olgunlaşması karakterizasyonu ve ifade edilen reseptör proteinlerinin yarı ömürlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda gerçekleştirilen deneysel sürecin sonunda elde edilen sonuçların, hastalığın tedavisinde etkili olabilecek tedavi yöntemleri araştırmalarına ışık tutması ve deney sürecinin DI gibi diğer metabolik hastalıklar için model teşkil etmesi hedeflenmektedir.

Bu amaç doğrultusunda,

- *AVPR2* geninde tanımlanan H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonları, yabancı tip *AVPR2* dizisini içeren ifade vektörleri kullanılarak site-directed mutagenesis yöntemi ile oluşturulmuştur.
- G12E, V88M ve R106C *AVPR2* mutant dizilerini içeren ifade vektörleri ise TÜBİTAK SBAG 216S304 ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi FBA-2017-14395 Nolu projeler kapsamında oluşturulmuş olup bu vektörler DNA dizi analizi kontrol çalışmalarına dahil edilmiştir.
- Oluşturulan mutant *AVPR2* dizilerini içeren ifade vektörleri DNA dizileme ile kontrol edilmiştir.
- Mutant ve yabancı tip *AVPR2* ifade vektörleri kullanılarak COS-7 hücreleri geçici olarak transfekte edilmiştir.
- Daha sonra, mutant ve yabancı tip *AVPR2*'leri geçici olarak ifade eden COS-7 hücrelerinden protein izolasyonu yapılmıştır.

- Elde edilen yabancı tip ve mutant protein örneklerinin olgunlaşma durumları deglikozilasyon analizi ile; yarı ömür durumları ise sikloheksimid analizi ile belirlenmiştir.
- Sikloheksimid ve deglikozilasyon analizleri sonrası, protein örnekleri western blot tekniği ile incelenmiştir.
- Elde edilen sonuçların hesaplanması ve istatistiksel analizi, Image Lab Software Version 6.1. ve GraphPad Prism 6 Software programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.1. Site-directed Mutagenез Yöntemi ile Mutant *AVPR2*'leri İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulması**

Site-directed mutagenез, bir plazmid vektörü içindeki dizinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile mutasyona uğratılmasına dayanan bir genetik manipülasyon yöntemidir. Bu teknik ile belirli bir amino asidin protein yapısı ve işlevine etkisini incelemek mümkündür [72]. Tez kapsamında olgunlaşma ve stabilite karakterizasyonu yapılan G12E, V88M ve R106C mutasyonları için grubumuz tarafından TÜBİTAK SBAG 216S304 ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi FBA-2017-14395 Nolu projeler kapsamında oluşturulmuş olan ifade vektörleri kullanılmıştır [73]. H80Y, V88L, V215M ve L219P mutantları için aşağıda yer alan yöntemlerle ifade vektörleri oluşturulmuştur.

#### **3.1.1. PZR ile Mutant *AVPR2* Dizilerinin Elde Edilmesi**

İlk basamak ise PZR ile mutasyonun oluşturulmasıdır. Bilinen mutasyonlara ait amino asit değişimi, mutasyona ait amino asit değişimini barındıran mismatch primerler ile sağlanır. Fakat bu primerler ile mutasyon oluşturmak için iki ayrı PZR reaksiyonu gereklidir. Bu nedenle *AVPR2* dizisi ikiye bölünmüş olur. Örneğin, H80Y mutasyonu için oluşturulan ilk PZR ürünü, Cozak-HA ileri ve H80Y geri primerleri ile, ikinci PZR ürünü ise H80Y ileri ve -FLAG geri primerleri ile

oluşturulur. Mutasyon oluşturmak için yapılan bu ayrı iki reaksiyon ürünü, bir sonraki aşamada bütün bir *AVPR2* dizisini oluşturmak üzere Cozak-HA ileri ve pL-FLAG geri primerleri ile reaksiyon oluşturularak kullanılır. İlgili mutasyona göre tasarlanmış ileri ve geri primerler ve uygulanan PZR protokolü Çizelge 3.1.1.1 ve 3.1.1.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.1 Mutasyonları oluşturmak için kullanılan primerler (F: ileri primer, R: geri primer).

Primer adı	Primer dizisi
Kozak-HA univ-F:	5'-ccaccATGTACCCCTACGACGTC-3'
H80Y-F:	5'-TCTTCATTGGC <sub>t</sub> ACTTGTGCCTGGC-3'
H80Y-R:	5'-GCCAGGCACAAGT <sub>a</sub> GCCAATGAAGA-3'
V88L-F:	5'-GCCGACCTGGCC <sub>t</sub> TGGCTCTGTTCC-3'
V88L-R:	5'-GGAACAGAGCCA <sub>a</sub> GGCCAGGTCGGC-3'
V215M-F:	5'-TGATGGTGTTC <sub>a</sub> TGGCACCTACCC-3'
V215M-R:	5'-GGGTAGGTGCCA <sub>t</sub> GAACACCATCA-3'
L219P-F:	5'-TGGCACCTACCC <sub>c</sub> GGGTATCGCCGC-3'
L219P-R:	5'-GCGGCGATACCC <sub>g</sub> GGGTAGGTGCCA-3'
pL-FLAG-R:	5'-TCATGTCTGGATCCACTAGTTCActtatogtcatogtc-3'

Çizelge 3.1.1.2. PZR içeriği ve reaksiyon koşulu.

Reaksiyon İçeriği		Reaksiyon Koşulu	
200ng/μl DNA (Yabanıl Tip <i>AVPR2</i> içeren plazmid DNA)	2μl	96°C	3 dakika
10X PZR Tamponu	5μl	94°C	45 saniye
2,5 mM dNTP	2μl	60°C	45 saniye
5M Betain	2,5μl	72°C	1 dakika
10mM İleri Primer	1μl	72°C	10 dakika
10mM Geri Primer	1μl	10°C	∞
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,5μl		
dH <sub>2</sub> O	36μl		
Son Hacim	50μl		

34 döngü

Yapılan ilk PZR sonrası elde edilen iki ayrı ürün, tüm parçayı kapsayacak baş ve son primerler ile (Cozak-HA ileri ve pL-FLAG geri) ikinci bir reaksiyona koyulur. Yapılan ikinci füzyon reaksiyonu sonucu mutasyonları içeren bütün bir *AVPR2* dizisi elde edilmiş olur. Uygulanan füzyon PZR protokolü ve reaksiyon koşulları Çizelge 3.1.1.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1.1.3. Füzyon PZR içeriği ve reaksiyon koşulu.

Reaksiyon İçeriği		Reaksiyon Koşulu	
2X Phusion High-Fidelity	25µl	98°C	30 saniye
Master Mix (Thermo Fisher Scientific)		98°C	10 saniye
10 µM Cozak-HA F	1µl	60°C	30 saniye
10 µM pL-FLAG R	1µl	72°C	1 dakika
DMSO(%100)	1,5µl	72°C	10 dakika
PZR Ürünü 1	2µl	10°C	∞
PZR Ürünü 2	2µl		
dH2O	17,5µl		
Son Hacim	50µl		

### 3.1.2. Mutant *AVPR2* Dizilerinin ve Vektörün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi ve Ligasyon

N ucu HA işaretli, C ucu FLAG işaretli, ilgili mutasyonu içeren *AVPR2* dizilerini, pLV2R plazmidi içerisine aktarmak için mutant PZR ürünleri ve pLV2R vektörü *AatII* ve *SpeI* enzimleri ile 1 saat boyunca 37°C'de kesilmiştir. Ardından, oda ısısında 15 dakika boyunca ligasyona tabi tutulmuşlardır. Gerçekleştirilen enzim kesimi ve ligasyon reaksiyonları Çizelge 3.1.2.1 ve 3.1.2.2'de verilmiştir.



### Çizelge 3.1.2.1. pLV2R ve mutant AVPR2 DNA'ları için enzim kesimi içerikleri

pLV2R için Restriksiyon Kesim Reaksiyonu İçeriği	Mutant AVPR2 DNA'ları için Restriksiyon Kesim Reaksiyonu İçeriği
400ng/µl DNA (Yabanıl Tip AVPR2 içeren plazmid DNA)	Füzyon PZR Ürünü
7µl	43µl
10x Cut Smart Tampon (NEB)	10x Cut Smart Tampon (NEB)
5µl	5µl
5U/µl AatII	5U/µl AatII
1µl	1µl
5U/µl SpeI	5U/µl SpeI
1µl	1µl
1U/µl FAST Alkalin Fosfataz	Son Hacim
1µl	50µl
dH2O	
35µl	
Son Hacim	
50µl	

### Çizelge 3.1.2.2. Ligasyon reaksiyonu içeriği

Ligasyon Reaksiyonu İçeriği	
Vektör (Yabanıl Tip Kesim Ürünü)	1µl
Insert (Mutant DNA Kesim Ürünü)	16µl
10X T4 DNA Ligaz Tamponu	2µl
5U/µl T4 DNA Ligaz	1µl
Son Hacim	20µl

## 3.2. Mutant AVPR2 Dizisini İçeren İfade Vektörlerinin Kompetan Hücreye (*E. coli* DH5α) Transformasyonu

- Ligasyon ürünü, 100µl *E. coli* DH5α kompetan hücre içerisine aktarılır.
- Buz üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
- 42°C'de 45 saniye boyunca ısı şokuna uğratılır.
- Tekrar buz üzerine alınarak 2 dakika inkübe edilir.
- 250µl SOC (Super Optimal Broth) besiyeri eklenir.
- 37 °C'lik çalkalamalı etüvde 1 saat inkübe edilir.
- Örneğin tamamı ampisilin içeren LB (Luria-Bertani) agar plağa ekilir ve 37°C'lik etüvde gece boyu inkübasyona bırakılır. Ampisilin içermesinin nedeni, ifade vektöründe ampisilin direnç geni bulunmasıdır. İfade vektörünü içine alan bakteri hücresi bu şekilde seçilmiş olur.

### 3.3. Elde Edilen Kolonilerden İfade Vektörlerini İçeren Plazmid DNA İzolasyonu

İnkübasyon sonrası elde edilen koloniler, 3ml LB sıvı besiyerine ekilir ve 37°C'lik etüvde gece boyu inkübasyona bırakılır. Elde edilen bakteri kültüründen, Promega PureYield™ Plazmit DNA İzolasyon Kiti ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Üreticinin önerdiği protokol uygulanmıştır.

#### Lizat Oluşturma ve Plazmit DNA'nın Bağlanması

- Elde edilen bakteri kültürü 5 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edilerek pelet elde edilir.
- 250µl hücre re-süspansiyon solüsyonu eklenir ve pelet süspanse edilir.
- 250µl hücre lizis solüsyonu eklenir. Tüpler 4 kere alt üst edilir.
- 10µl alkalın proteaz solüsyonu eklenir. Tüpler 4 kere alt üst edilir.
- 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır.
- 350µl nötralizasyon solüsyonu eklenir. Tüpler 4 kere alt üst edilir.
- Oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Spin kolon toplama tüpüne yerleştirilir.
- Lizat spin kolona aktarılır.
- Oda ısısında 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Süzüntü atılır.

#### Yıkama

- 750µl yıkama solüsyonu (etanol eklenmiş) eklenir.
- Oda ısısında 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Toplama tüpündeki süzüntü atılır ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- 250µl yıkama solüsyonu (etanol eklenmiş) eklenir.
- Oda ısısında 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilir.

#### Elüsyon

- Kolonda yıkama solüsyonu kalıntısı olmamasına dikkat edilir. Daha sonra kolon 1,5ml'lik tüpe alınır.
- Kolona filtreyi tamamen kaplayacak şekilde 100µl nükleaz içermeyen steril su eklenir. Oda ısısında 2 dakika boyunca inkübe edilir.

- İnkübasyon sonrası 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Kolon atılır ve elde edilen DNA, -20°C'de saklanır.

### 3.4. Elde Edilen İfade Vektörlerinin DNA Dizileme Yöntemi ile Kontrol Edilmesi

İzole edilen DNA'ların, *AVPR2* dizisini kontrol etmek ve istenilen mutasyonun dışında mutasyon oluşup oluşmadığını anlamak adına dizilemesi yapılır. Dizileme yöntemi olarak Sanger Dizileme tercih edilmiştir. Dizileme yönteminin ilk aşaması, okunması istenilen bölgenin PZR reaksiyonu ile çoğaltılmasıdır. Yapılan PZR reaksiyonu içeriği ve koşulları Çizelge 3.1.1.3.'te gösterilmiştir. Daha sonra elde edilen PZR ürünleri PZR pürifikasyonu ile pürifiye edilir ve pürifiye edilmiş PZR ürünleri, sekans reaksiyonuna alınır. PZR pürifikasyonu ve sekans reaksiyonu için kullanılan reaksiyon içerikleri ve döngüleri Çizelge 3.4.1. ve Çizelge 3.4.2.'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.4.1. PZR pürifikasyonu içeriği ve reaksiyon koşulları

PZR Pürifikasyonu İçeriği		PZR Pürifikasyonu Reaksiyon Koşulu	
PZR Ürünü	4µl	37°C	20 dakika
Exonuclease I (10 U/µl)	0,4µl	80°C	20 dakika
Shrimp Alkalen Fosfataz (2 U/µl)	0,8µl	95°C	2 dakika

Çizelge 3.4.2. Sekans reaksiyonu içeriği ve reaksiyon koşulları

Sekans Reaksiyonu		Sekans Reaksiyonu Koşulu	
Pürifiye PZR Ürünü	1,5µl	96°C	10 saniye
10µM Primer	0,5µl	50°C	5 saniye
Big Dye (Thermo Fisher Scientific)	0,6µl	60°C	4 dakika
10X Big Dye Tamponu	0,95µl		
dH2O	6,45µl		
Son Hacim	10µl		

24 döngü

Sekans reaksiyonu için BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Sekans reaksiyonu tamamlandıktan sonra reaksiyon ürünleri sekans pürifikasyonu işlemine alınır. Sekans pürifikasyonu için kullanılan yöntem aşağıda sıralı olarak verilmiştir.

- Sekans reaksiyonu sonunda elde edilen ürüne, 2µl 3M sodyum asetat ve 50µl %100'lük soğuk etanol eklenir ve iyice karıştırılır. Karışım 1,5 ml'lik tüpe alınır.
- 20 dakika -20°C'de inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası 20 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilir. Örneklerin santrifüje koyulma şekli önemlidir çünkü santrifüj sonrası pelet görülmez.
- Üst faz dikkatlice uzaklaştırılır.
- 250µl %70'lik soğuk etanol eklenir ve 5 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
- Üst faz dikkatlice uzaklaştırılır.
- Peletler, etanol ortamdan tamamen uzaklaşana kadar oda sıcaklığında kurutulur.
- Etanolün tamamen ortamdan uzaklaştığına emin olduktan sonra 20µl formamid eklenir. Daha sonra vortekslenir ve spin edilir.
- Örnekler sekans tüplerine alınır ve 94°C'de 4 dakika boyunca denatüre edilir.
- Denatürasyon sonrası -20°C'de 3 dakika inkübe edilir. İnkübasyon süresini tamamlamış örnekler sekans cihazına yüklenmek için hazırdır.

Elde edilen ürünleri dizilemek için yürütme işlemi, Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) kapiller elektroforez sisteminde yapılmıştır.

### 3.5. COS-7 Hücre Hattının Üretimi

COS-7 (ATCC® CRL-1651™), maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek dokusundan alınmış, fibroblast morfolojisine sahip, yüzeye tutunan (adherent) bir hücre hattıdır. COS kısaltması, orijini CV-1 hücresi olan ve SV-40 genetik materyali taşıyan anlamına gelmektedir. Yüksek oranda transfeksiyon etkinliği ve hücre büyüme başarısı, hücre üzerinde yapılan modifikasyonların sonucudur. Bu özelliklere sahip olması nedeniyle AVPR2 protein fonksiyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır.

COS-7 hücre hattı için kullanılan temel besiyeri, %10 FBS (fetal bovine serum), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM'dir (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde 3 gün boyunca inkübe edilerek üretilir.

#### 3.5.1. Hücrelerin Üretilmesi ve Devamlılığı

Kanser hücreleri dışındaki hücreler, birbirleriyle temas halinde olduklarında ve üremeleri için yeterli başka bir alan kalmadığında kontakt inhibisyon etkisiyle hücre proliferasyonunu durdurma eğilimindedirler. Bu nedenle hücre çoğaltılması sırasında hücrelerin alanı kaplama oranı (konfluensi) %85-100 arasında olduğunda aşağıda belirtilen pasajlama işleminin yapılması gerekmektedir.

- Hücrelerin konfluent olma durumları ışık mikroskopunda kontrol edilir ve yeterli görülürse protokole başlanır.
- Hücre ortamındaki besiyeri hücrelere zarar vermeden uzaklaştırılır.
- 25cm<sup>2</sup>'lik flask için 3ml 1X DPBS, (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 75cm<sup>2</sup>'lik flask için 6ml 1X DPBS eklenir ve hücrelere zarar vermeden ortamdaki DPBS uzaklaştırılarak ölü hücreler ve besiyeri artıkları temizlenir.
- 25cm<sup>2</sup>'lik flask için 0,5ml %0,25 Tripsin-EDTA, 75cm<sup>2</sup>'lik flask için 1,5ml %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden kalkması

sağlanır. %0,25 Tripsin-EDTA eklendikten sonra 2 dakika boyunca 37°C'lik etüvde inkübe edilerek enzimin etkisi artırılır.

- Hücrelerin yüzeyden kalktıkları kontrol edildikten sonra 25cm<sup>2</sup>'lik flask için 4,5ml %10 FBS içeren DMEM, 75cm<sup>2</sup>'lik flask için 13,5ml %10 FBS içeren DMEM flaska eklenir ve pipetaj ile hücre karışımı homojen hale getirilir.
- Bir sonraki aşama için gereken hücre miktarı göz önünde bulundurularak kullanılacak flask miktarı belirlenir. 25cm<sup>2</sup>'lik flask için 4,5ml %10 FBS içeren DMEM üzerine 0,5ml hücre karışımından eklenir. 75cm<sup>2</sup>'lik flask için 13,5ml %10 FBS içeren DMEM üzerine 1,5ml hücre karışımından eklenir.
- Hazırlanan flasklar ışık mikroskopunda kontrol edilerek %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılır.

### **3.6. Hücre Sayımı ve COS-7 Hücre Hattının Deney İçin Hazırlanması**

COS-7 hücre hattının deney için hazırlanması aşamasında öncelikle 1ml'deki hücre sayısı miktarı Thoma camı kullanılarak hesaplanmalıdır. Elde edilen bu değer, deneye göre istenilen hücre sayısının hesaplanmasında kullanılır.

Yapılacak deneye göre istenilen hücre sayısı konsantrasyonunu elde etmek için hesaplanan miktarlarda sayımı yapılan hücreler ve DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenmiş) süspansiyon edilir. Hücreler, sikloheksimid ve deglikozilasyon analizleri için 200.000 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara ekilmiştir.

### **3.7. Hazırlanan İfade Vektörlerinin Hücrelere Transfeksiyonu**

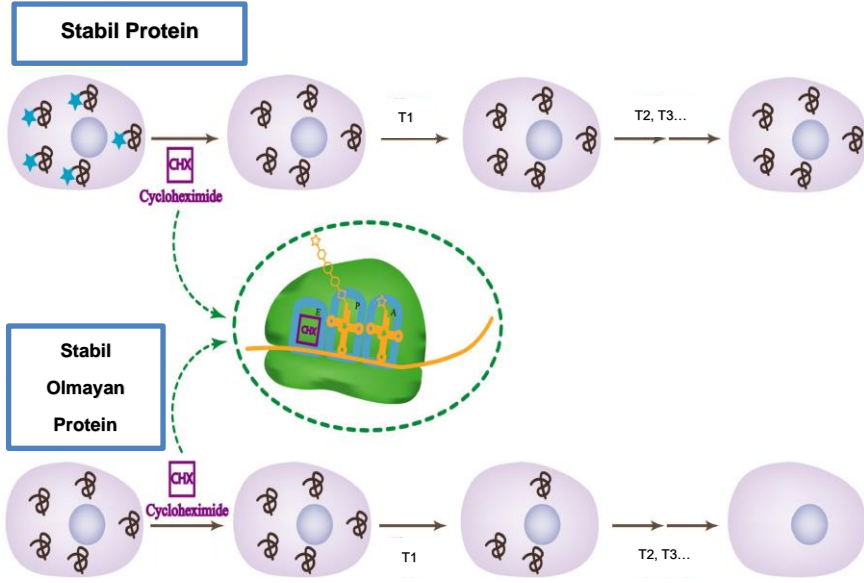
Transfeksiyon, ökaryotik bir hücreye istenilen genetik materyali aktarma işleminin genel adıdır. Viral transdüksiyonla, elektroporasyonla veya kimyasal reaktiflerle transfeksiyon işlemini gerçekleştirmek mümkündür.

12 kuyucuklu plaklara ekilmiş olan hücrelerin bir gün inkübasyonu sonrası, hücrelerin plate yüzeyine eşit dağılımı ve yüzeyi kaplama oranı ışık mikroskopuyla kontrol edilir. Kontrol edilmiş hücrelere, oluşturulan yabancı ve mutant ifade vektörleri transfekte edilir. 12 kuyucuklu plak için optimize edilen miktarlarda DNA ve transfeksiyon ajanı kullanılan transfeksiyon işlemi aşağıda belirtilmiştir. Transfeksiyon etkinliği, yeşil floresan proteinini ifade eden vektörün (pEGFP), hücreye transfeksiyonu ile kontrol edilmiştir.

- 2µg DNA, 200µl serumsuz DMEM içerisine eklenir ve iyice pipetaj yapılır.
- DNA-DMEM karışımına 6µl TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific™) eklenir ve iyice pipetaj yapılır.
- 20 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır.
- Hazırlanan karışım hücrelerin üzerine damlalar halinde yavaşça dağıtılır. Belirtilen miktarlar 1 kuyu için gerekli olan miktarlardır. Bu oranlar kullanılarak deneyler için belirlenen kuyu sayısına göre transfeksiyon işlemi yapılmıştır.
- Hazırlanan kuyucuklu plaklar, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılır. Transfeksiyon etkinliği 48-72 saat sonra belirlenebilir.

### **3.8. Sikloheksimid Analizi ile Yabancı ve Mutant AVPR2 Proteinlerinin Yarı Ömrünün Belirlenmesi**

Sikloheksimid, *Streptomyces griseus* bakterisi tarafından üretilen, ökaryotlarda translasyon inhibitörü etkisi gösteren bir antibiyotik türüdür. Protein sentezinin kontrollü inhibisyonu ve proteinlerin yarı ömrünün belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil3.1). Proteinlerin sikloheksimid ile kontrollü inhibisyonu sonrası western blotlama ile bozulma eğrileri oluşturulur. Elde edilen bozulma eğrileri, aktin, GAPDH veya tübinin gibi her hücrede stabil ifade edilen proteinlerle normalize edilir. Tez kapsamında yarı ömrü belirlenmesi istenilen proteinler için uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir [5].



Şekil 3.1. Sikloheksimid analizi ile yarı ömür belirleme ([5] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

### 3.8.1. Sikloheksimid Uygulaması

- Sikloheksimid analizi için 12 kuyucuklu plakta hazırlanan ve transfeksiyon uygulaması yapılan hücrelerin transfeksiyon etkinliği kontrol edilir ve kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılır.
- Sikloheksimid uygulanacak kuyulara 1ml 50µM sikloheksimid içeren DMEM, kontrol kuyularına ise aynı hacimde sikloheksimid antibiyotiğinin çözücüsü olan etanolü içeren DMEM eklenir. 0, 4, 8, 12 ve 24. saat periyotlarına ait tüm kuyucuklu plaklar için aynı işlem uygulanır.
- Kuyucuklu plaklar, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresini tamamlamış kuyucuklu plaktaki hücrelerden protein izolasyonu yapılır.

### 3.8.2. Denatüre Edici Lizis Tamponu ile Protein İzolasyonu

Protein izolasyon aşamaları proteaz inhibitörlerinin maliyeti, hücre parçalanması için gereken ek aşamalar ve protein kaybı gibi sınırlayıcı faktörlere sahiptir. Bu nedenle proteaz inhibitörü içermeyen, hızlı, memeli hücreleri için optimize edilmiş ve blotlama için uygun olan bir protein izolasyon yöntemi kullanılmıştır [74].



Yönteme ait uygulanan protokol aşağıda belirtilmiştir.

- İnkübasyon süresi tamamlanmış olan kuyucuklu plaklardan besiyeri uzaklaştırılır. Besiyerinin tamamının uzaklaştırılmasına dikkat edilir.
- Hücrelere zarar vermeyecek şekilde 1 ml soğuk PBS eklenir ve geri çekilir.
- Kuyulara 300µl denatüre edici lizis tamponu eklenir.

Denatüre Edici Lizis Tamponu (pH 6,8) : 0,625M Tris-base

%10 Gliserol

%3 SDS

0,5mM EDTA

%0,1 bromfenol mavisi

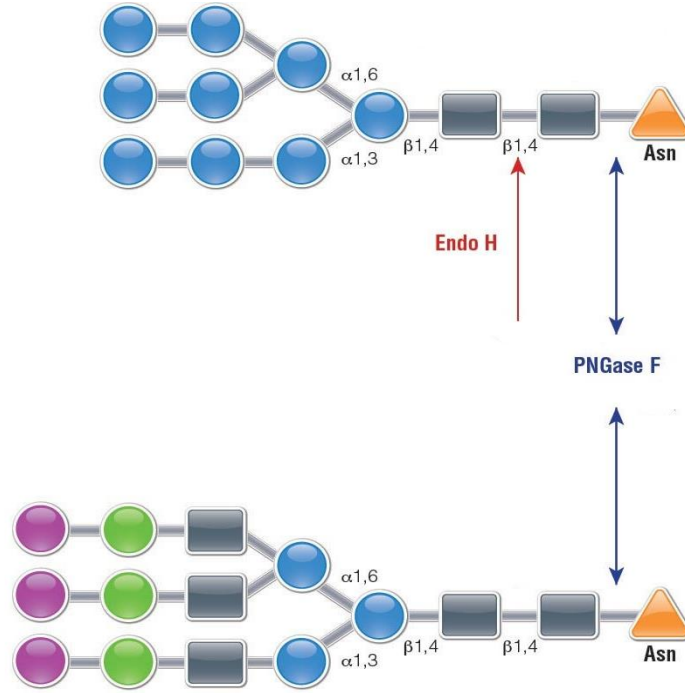
%10 2-β merkaptoetanol  
(Kullanmadan hemen önce taze olarak eklenmelidir.)

- Kuyucuklu plaklar buz üzerine alınır.
- Hücreler hızlıca kazınır ve santrifüj tüplerine aktarılır.
- 99°C'de çalkalamalı ısı bloğunda 10 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası örnekler western blotlama için -20 veya -80°C'de saklanır.

### **3.9. Deglikozilasyon Analizi ile Yabanıl ve Mutant AVPR2 Proteinlerinin Olgunlaşma Karakterizasyonu**

Proteinler, translasyon sonrasında birçok modifikasyon geçirir, katlanır ve olgunlaşır. Glikozilasyon, bu olgunlaşma aşamalarının bir parçasıdır ve proteinin nasıl bir katlanma hikayesi geçirdiğini anlamak ve bu konuda yorum yapabilmek adına büyük önem taşır. Bu amaçla, bir proteinin glikozilasyon durumunu incelemek için glikosidaz enzimleri kullanılır. Tez kapsamında kullanılan glikosidazlar, Endo H (endoglikosidaz H) ve PNGase F (peptid N- glikosidaz F) enzimleridir. Endo H, bazı hibrit oligosakkaritleri ve yüksek mannoz yapılarını N bağlı glikoproteinlerden uzaklaştırır. PNGase F ise asparajine bağlı olan

glikanların tamamını glikoproteinlerden uzaklaştırır. Endo H ve PNGase F enzim kesimleri için kullanılan proteinler, diseksiyon tamponu ile izole edilmiştir.



Şekil 3.2. Endo H ve PNGase F enzim kesim yerleri [https://www.promegaconnections.com/endo-h-application-monitoring-protein-trafficking, ilgili kaynaktan değiştirilerek alınmıştır].

### 3.9.1. Diseksiyon Tamponu ile Protein İzolasyonu

- Deglikozilasyon analizi için 12 kuyucuklu plaklara hazırlanan ve transfeksiyon uygulaması yapılan hücrelerin transfeksiyon etkinliği kontrol edilir ve kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılır.
- Hücrelere zarar vermeyecek şekilde 1 ml soğuk PBS eklenir ve geri çekilir.
- Kuyulara 300µl diseksiyon tamponu eklenir.

Diseksiyon Tamponu (pH 7,2): 300mM Sükroz

25mM İmidazol

1mM EDTA

Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich)

- Kuyucuklu plak buz üzerine alınır.
- Hücreler hızlıca kazınır ve santrifüj tüplerine aktarılır.
- Hücreler 30 saniye boyunca pipetaj ile homojenize edilir.
- Örnekler 3000xg'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilir.
- Süpernatant yeni tüpe aktarılır.
- Quawell Q5000 UV Spektrofotometre (Quawell Technology, Inc) ile protein konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilir.
- Protein örnekleri, kesim için -20 veya -80°C'de saklanır.

### **3.9.2 Endo H Enzimi ile Kesim**

- 10µg protein örneğine 1µl 10X Glikoprotein Denatürasyon Tamponu eklenir ve son hacim steril distile su ile 10µl'ye tamamlanır.
- Örnekler 100°C'de 10 dakika boyunca denatüre edilir. Örnekler denatürasyon sonrası buza alınır.
- Örneklerin üzerine 2µl 10X Glikobuffer 3 ve 0,25µl Endo H (NEB) eklenir ve son hacim steril distile su ile 20µl'ye tamamlanır.
- 37°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası örnekler SDS-PAGE için hazırdır.

### **3.9.3. PNGase F Enzimi ile Kesim**

- 10µg protein örneğine 1µl 10X Glikoprotein Denatürasyon Tamponu eklenir ve son hacim steril distile su ile 10µl'ye tamamlanır.
- Örnekler 100°C'de 10 dakika boyunca denatüre edilir. Örnekler denatürasyon sonrası buza alınır.
- Örneklerin üzerine 2µl 10X Glikobuffer 2, 2µl %10 NP-40 ve 6µl steril distile su eklenerek son hacim 20µl'ye tamamlanır.
- 1µl PNGase F (NEB) eklenir ve hafifçe karıştırılır.
- 37°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası örnekler SDS-PAGE için hazırdır.

### 3.10. Western Blotlama

Sikloheksimid ve deglikozilasyon analizleri için izole edilen protein örnekleri, western blotlama tekniği kullanılarak görüntülenmiştir. Western blotlama, SDS poliakrilamid jelde boyutlarına göre ayrılan protein bantlarının membrana aktarılması sonrası spesifik bir antikor ile işaretlenip görüntülenmesi olarak özetlenebilir.

#### 3.10.1. SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlığı

Denatüre edici poliakrilamid jel olarak da bilinen SDS poliakrilamid jel, içeriğindeki SDS sayesinde proteinleri denatüre eder ve tüm proteinlerin negatif yükü yüklenmesini sağlar. AVPR2 proteininin moleküler ağırlığı göz önünde bulundurularak tercih edilen jel yüzdesi %10'dur. Jel içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

<u>%10 Poliakrilamid Jel:</u>	%40 Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	10ml
	1,5M Tris-base (pH 8,8)	10ml
	Distile su	19,2ml
	%10 SDS	400µl
	%10 Amonyum persülfat	400µl
	TEMED	40µl
	Total Hacim	40ml

#### 3.10.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Polimerleşme süresini tamamlamış olan jeller elektrofrez tankına yerleştirilir. Tank, TGS yürütme tamponu ile doldurulur ve kuyulardaki kalıntılar temizlenir. Gerekli görülürse yürütme boyası yüklenerek boyanın kuyuda ilerleme durumuna göre jelin kalitesi kontrol edilir. Protein örnekleri kuyulara yüklenmeden hemen önce 9:1 oranında 2-β merkaptetanol içeren yükleme boyası ile karıştırılır ve

42°C'de 15 dakika boyunca denatüre edilir. Denatüre edilen protein örnekleri buz üzerine alınır ve kuyulara yüklenir. Marker olarak Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (BioRad) ve Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder (BioLegend) kullanılmıştır. Örnekler, 120 Volt'ta boya jelin alt kısımlarına gelene dek yürütülür.

<u>TGS Yürütme Tamponu (pH 8,3) :</u>	Tris-base	0,25M
	Glisin	1,92M
	SDS	%1

### 3.10.3. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

SDS-poliakrilamid jelde ayrışması gerçekleşen protein örnekleri, işaretleme ve görüntüleme yapılması amacıyla PVDF bir membrana (GE Life Sciences) aktarılmalıdır. Membrana aktarma işlemi Biorad Trans-Blot Turbo Transfer System ile gerçekleştirilmiştir. Aktarma işlemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleşmiştir.

- 1. Filtre kâğıdı, transfer tamponu ile muamele edilir ve transfer kasetine yerleştirilir. Rulo yardımıyla hava kabarcıkları yok edilir.
- PVDF membran, 30 saniye boyunca metanol içerisinde aktive edilir. Daha sonra transfer tamponundan geçirilir.
- Transfer tamponundan geçirilen membran, transfer kasetine yerleştirilen filtre kâğıdının üzerine yerleştirilir.
- Yürütme işlemi yapılmış SDS-poliakrilamid jel, membran üzerine yerleştirilir.
- 2. Filtre kâğıdı transfer tamponu ile muamele edilir ve SDS-poliakrilamid jel üzerine yerleştirilir. Rulo yardımıyla hava kabarcıkları yok edilir. Yapılan işlemler sonrası aşağıdan yukarıya sıralama 1. filtre kâğıdı, membran, SDS-poliakrilamid jel, 2. filtre kâğıdı şeklinde olmalıdır.

- Transfer kaseti kapatılır ve cihaza yerleştirilir. 7 dakika boyunca 25 Volt uygulanarak aktarma gerçekleştirilir.

#### **3.10.4. Membran Blokasyonu ve Antikor ile İşaretleme**

Transfer işlemi gerçekleştirilen membranı antikor ile işaretlemeden önce blokasyon işlemi gereklidir. Bu işlem ile spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilir. Transfer sisteminden çıkarılan membran, %0,05 Tween-20 içeren PBS (PBST) ile muamele edilerek transfer tamponundan arındırılır. Membran daha sonra blokasyon solüsyonu (%5 skim milk (CST) içeren PBST) ile 50rpm'de en az 1 saat çalkalanarak inkübe edilir. Blokasyon işlemi sonrası membran 3 kez 10'ar dakika boyunca PBST ile yıkanır. Membran, antikor ile işaretleme için hazırdır.

Transfekte edilen *AVPR2* ifade vektörleri, N ucunda HA (Hemagglutinin) işareti içermektedir. Bu nedenle hedef proteinleri işaretleme amacıyla HA-Tag (6E2) Mouse mAb (HRP konjugatına sahip) (CST #2999) antikorunu kullanılmıştır. HRP konjugatı, görüntüleme aşamasında substratı ile muamele edildiğinde proteinin tespitini sağlar. Kullanılan bu antikor, HRP konjugatı içerdiği için ikincil bir antikora ihtiyaç duyulmamıştır. Antikor, %5 skim milk içeren PBST içerisinde 1:1000 oranında sulandırılarak kullanılır. Antikor işaretleme için hazır olan membran, hazırlanan antikor karışımı ile 4°C'de 50rpm'de çalkalanarak gecelik inkübasyona bırakılır. Gecelik inkübasyon sonrası membran 3 kez 10'ar dakika boyunca PBST ile yıkanır. Membran, görüntüleme için hazırdır.

#### **3.10.5. Görüntüleme**

Membran, ChemiDoc™ görüntüleme sistemine (Bio-Rad Laboratories, Inc) yerleştirilir. Stabil peroksit solüsyonu ve luminol/enhancer solüsyonu 1:1 oranında karıştırılarak membranın yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde dağıtılır.

### **3.11. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz**

Elde edilen western blot görüntüleri, "Image Lab Software Version 6.1." programı kullanılarak normalize edilmiştir. Daha sonra elde edilen normalize bant yoğunluklarına ait sayısal değerler aynı program ile hesaplanmıştır. Elde edilen normalize bant yoğunluklarına ait sayısal değerler "GraphPad Prism 6 Software" programı kullanılarak doğrusal olmayan regresyon/tek fazlı bozunma analizi ile analiz edilmiş ve yarı ömür değerleri bulunmuştur. Yarı ömür analizi verilerine ilişkin grafikler de bu program kullanılarak çizilmiştir. Elde edilen yarı ömür saatleri normalize edilmiştir ve SEM değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, saat  $\pm$  SEM şeklinde verilmiştir. Mutant AVPR2 yarı ömürleri ile yabanıl tip proteinin yarı ömrü arasındaki fark t-testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş olup  $p < 0,01$  değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

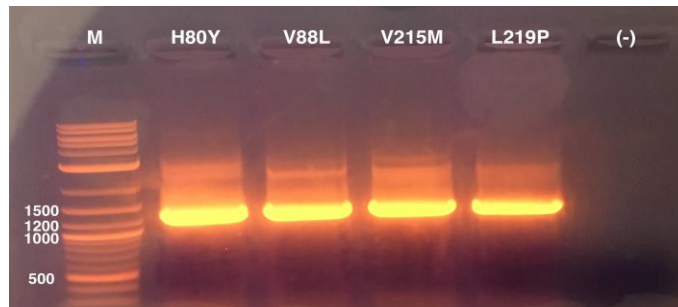
### 4.1. Site-directed Mutagenез Yöntemi ile Mutant *AVPR2*'leri İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar

Cozak-HA univ ileri primer ile ilgili mutasyona ait geri primer ve pL-FLAG geri primer ile ilgili mutasyona ait ileri primer kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü, Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. H80Y, V88L, V215M, L219P mutasyonlarına ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. M, marker; (-), negatif kontrol.

PZR ürünlerinin kalıp olarak kullanıldığı, bütün bir *AVPR2* dizisi oluşturma amacıyla yapılan füzyon PZR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü, Şekil 4.2'de verilmiştir.

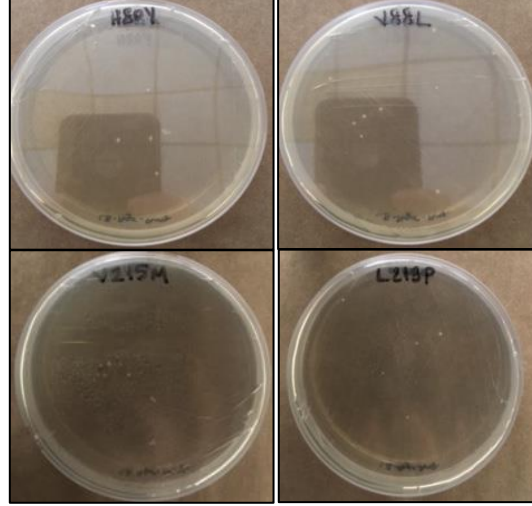


Şekil 4.2. İlgili mutasyonları içeren bütün halindeki *AVPR2* dizilerini oluşturmak için gerçekleştirilen füzyon PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. M, marker, (-), negatif kontrol.



#### 4.2. Mutant AVPR2 Dizisini İçeren İfade Vektörlerinin Kompetan Hücreye (*E. coli* DH5α) Transformasyonu ile İlgili Sonuçlar

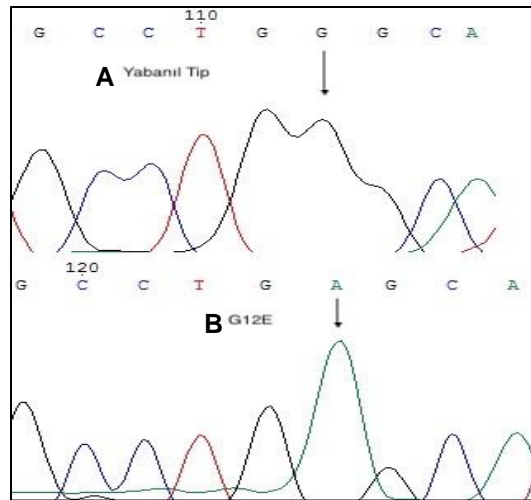
Vektörlerin, *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası elde edilen koloni görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



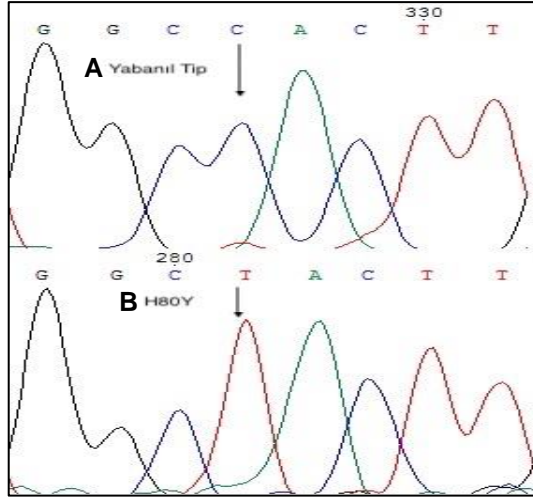
Şekil 4.3. Mutant AVPR2 plazmidlerini içeren bakterilere ait plak görüntüleri.

#### 4.3. Sanger Dizileme ile Kontrol Edilen Yabani Tip ve Mutant AVPR2 Dizileri ile İlgili Sonuçlar

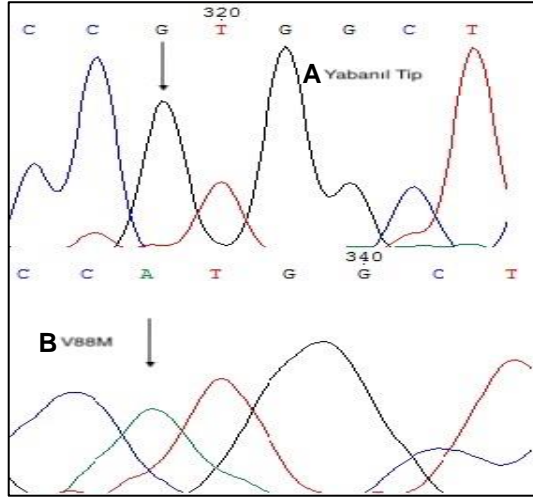
AVPR2 gen dizisinde oluşturulan G12E, V88M, R106C, H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonlarını içeren ifade vektörlerinin, yapılan Sanger dizileme yöntemi sonrası elde edilen kromatogram görüntüleri Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9. ve 4.10'de verilmiştir.



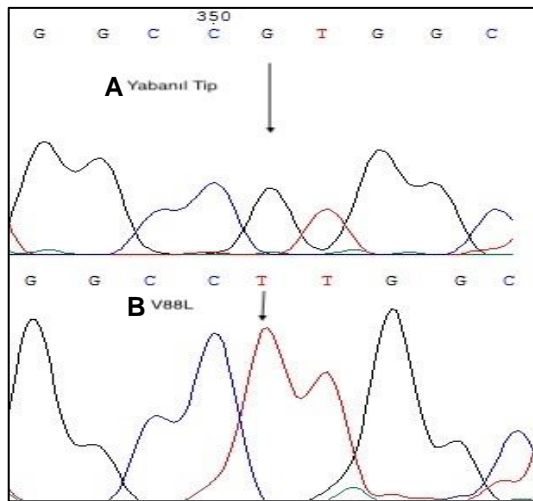
Şekil 4.4. G12E mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabani tip AVPR2 dizisi, B: G12E mutasyonunu içeren AVPR2 dizisindeki GGG→GAG dönüşümü.



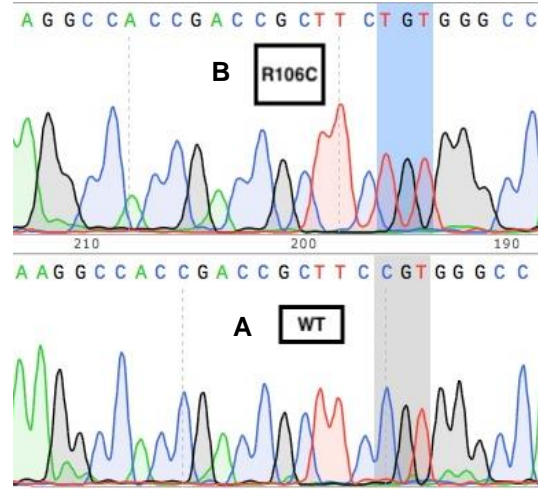
Şekil 4.5. H80Y mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabanıl tip *AVPR2* dizisi, B: H80Y mutasyonunu içeren *AVPR2* dizisindeki CAC→TAC dönüşümü.



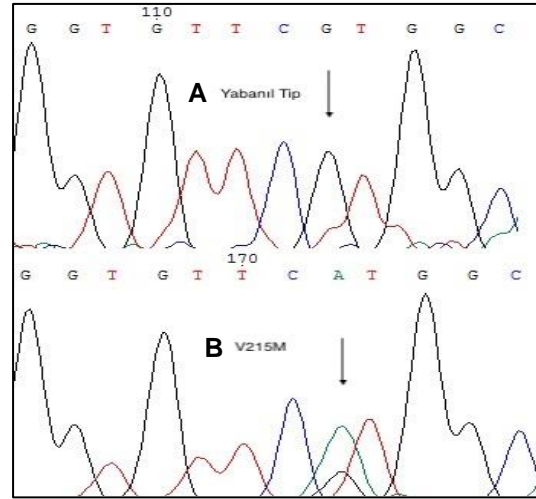
Şekil 4.6. V88M mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabanıl tip *AVPR2* dizisi, B: V88M mutasyonunu içeren *AVPR2* dizisindeki GTG→ATG dönüşümü.



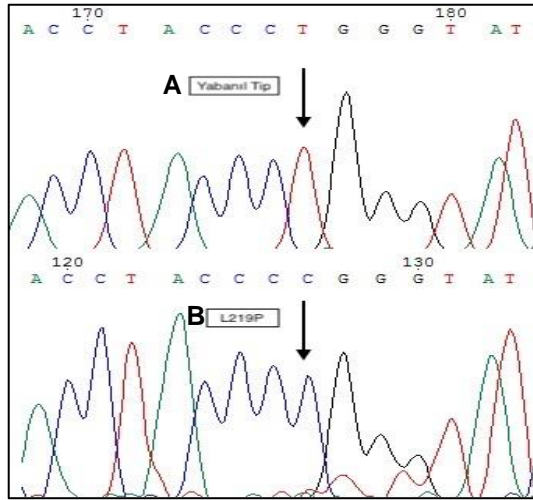
Şekil 4.7. V88L mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabanıl tip *AVPR2* dizisi, B: V88L mutasyonunu içeren *AVPR2* dizisindeki GTG→TTG dönüşümü



Şekil 4.8. R106C mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabani tip *AVPR2* dizisi, B: R106C mutasyonunu içeren *AVPR2* dizisindeki TGT→CGT dönüşümü.



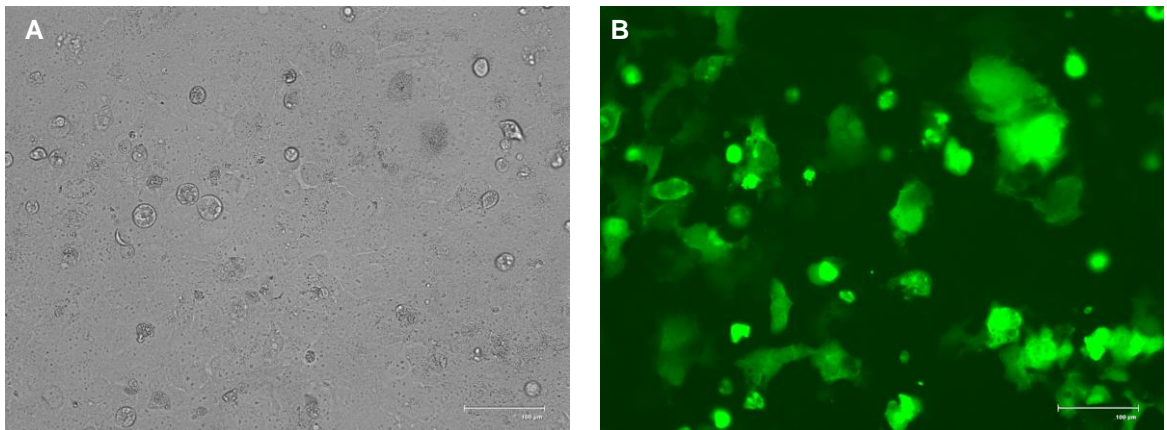
Şekil 4.9. V215M mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabani tip *AVPR2* dizisi, B: V215M mutasyonunu içeren *AVPR2* dizisindeki GTG→ATG dönüşümü.



Şekil 4.10. L219P mutasyonuna ait kromatogram görüntüsü. A: Yabanıl tip *AVPR2* dizisi, B: L219P mutasyonunu içeren *AVPR2* dizisindeki CTG→CCG dönüşümü.

#### 4.4. Oluşturulan İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonu ile İlgili Sonuçlar

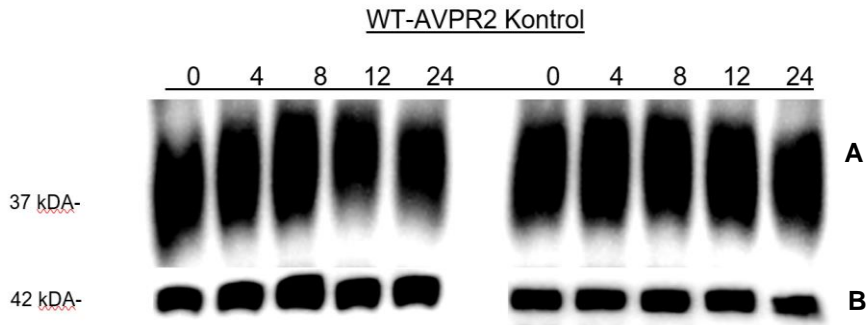
Yabanıl tip ve mutasyon içeren *AVPR2* gen dizileri hücrelere transfekte edilmiş ve transfeksiyon etkinliği, eş zamanlı olarak gerçekleşen pEGFP dizisinin hücrelere transfeksiyonuyla kontrol edilmiştir. Elde edilen görüntüler, Şekil 4.11’de verilmiştir.



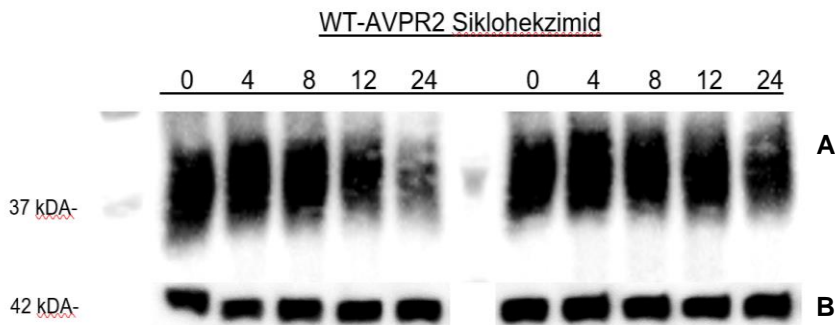
Şekil 4.11. GFP transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinin 48 saat sonraki görüntüleri. A: Transfekte edilen COS-7 hücrelerinin beyaz ışık altındaki görüntüsü, B: GFP ifade edilmiş COS-7 hücrelerinin görüntüsü.

#### 4.5. Sikloheksimid Analizi ile Elde Edilen Yabanıl Tip ve Mutant AVPR2 Proteinlerinin Yarı Ömürleri ile İlgili Sonuçlar

Sikloheksimid ve etanol (sikloheksimid çözücüsü, kontrol grubu) uygulaması sonucu elde edilen AVPR2 yabanıl tip ve mutant proteinlerin ve bant normalizasyonu için yapılan aktin proteinlerinin western blotlama görüntüleri, Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20'da verilmiştir. Yapılan analiz, birbirinden bağımsız gerçekleştirilen iki ayrı tekrar içermektedir. Her tekrar, 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlere ait örnekler içermektedir. Yabanıl tip AVPR2 transfeksiyonu sonrası yapılan etanol uygulaması sonucu elde edilen kontrol grubunda, etanolün AVPR2 proteini yarı ömrü üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Sikloheksimid analizi sonrası yabanıl tip için elde edilen yarı ömür  $21,61 \pm 0,25$  saat olarak bulunmuştur.

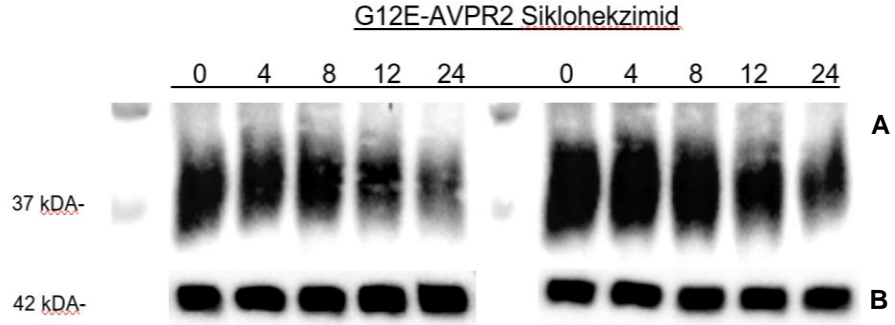


Şekil 4.12. Yabanıl tip (WT) AVPR2 ile transfekte edilmiş hücrelere etanol (kontrol) uygulaması sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlere ait yabanıl tip AVPR2 proteini bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.

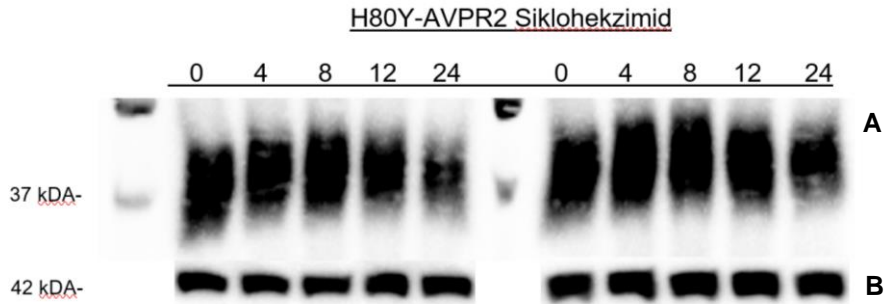


Şekil 4.13. Yabanıl tip (WT) AVPR2 ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlere ait yabanıl tip AVPR2 proteini bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.

G12E ve H80Y mutasyonları için yapılan sikloheksimid analizi sonrası elde edilen yarı ömür değerleri sırasıyla  $17,97 \pm 1,37$  saat ve  $20,15 \pm 0,73$  saat olarak bulunmuştur.

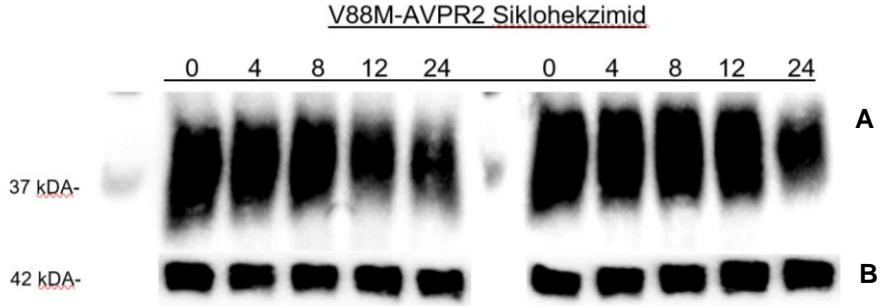


Şekil 4.14. G12E mutanlığı ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin G12E örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.

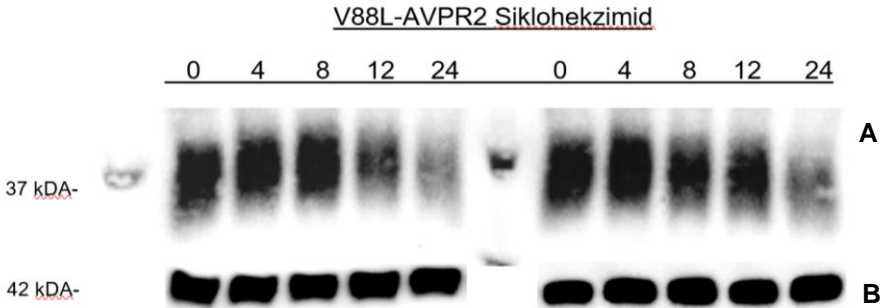


Şekil 4.15. H80Y mutanlığı ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin H80Y örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.

V88M ve V88L mutasyonları için yapılan sikloheksimid analizi sonrası elde edilen yarı ömür değerleri sırasıyla  $18,37 \pm 0,48$  saat ve  $17,89 \pm 0,34$  saat olarak bulunmuştur.

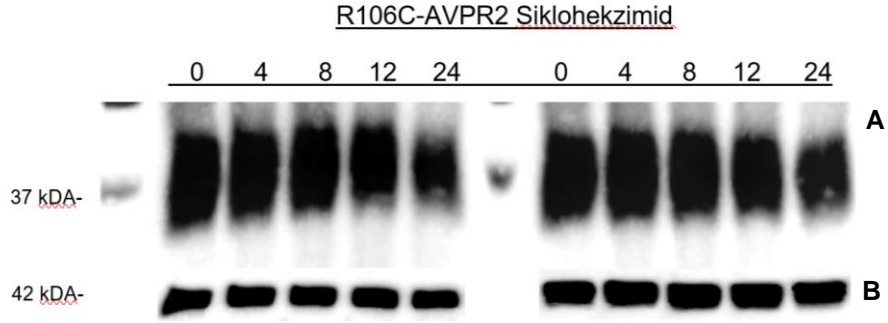


Şekil 4.16. V88M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin V88M örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.

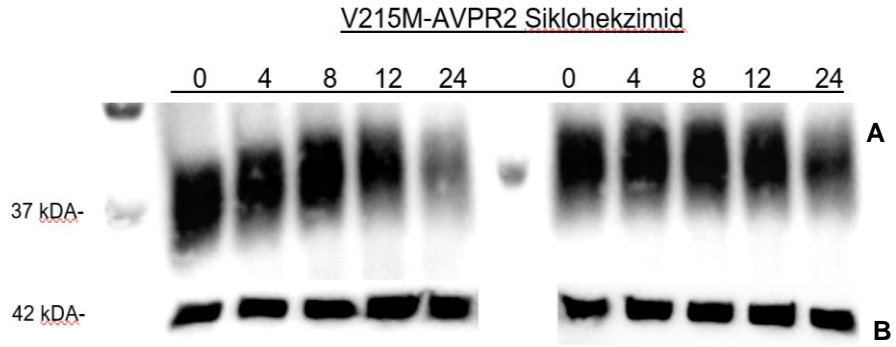


Şekil 4.17. V88L mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin V88L örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.

R106C ve V215M mutasyonları için yapılan sikloheksimid analizi sonrası elde edilen yarı ömür değerleri sırasıyla  $23,73 \pm 0,68$  saat ve  $16,35 \pm 0,77$  saat olarak bulunmuştur.



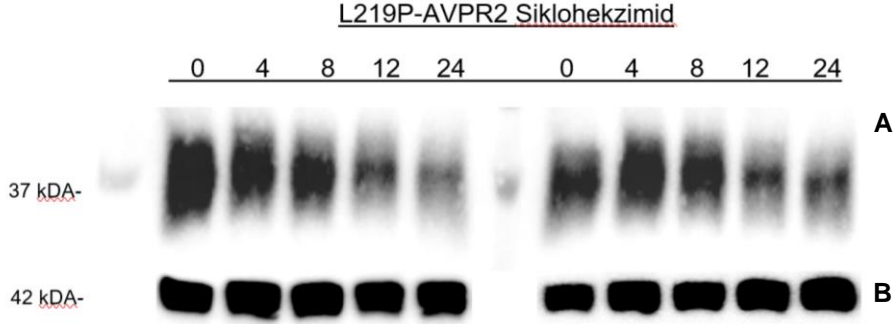
Şekil 4.18. R106C mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin R106C örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.



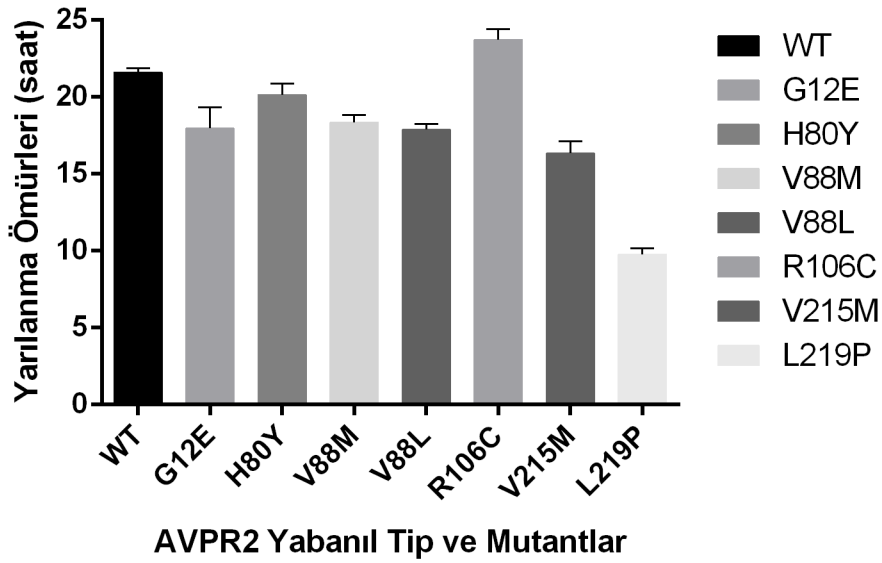
Şekil 4.19. V215M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin V215M örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları.



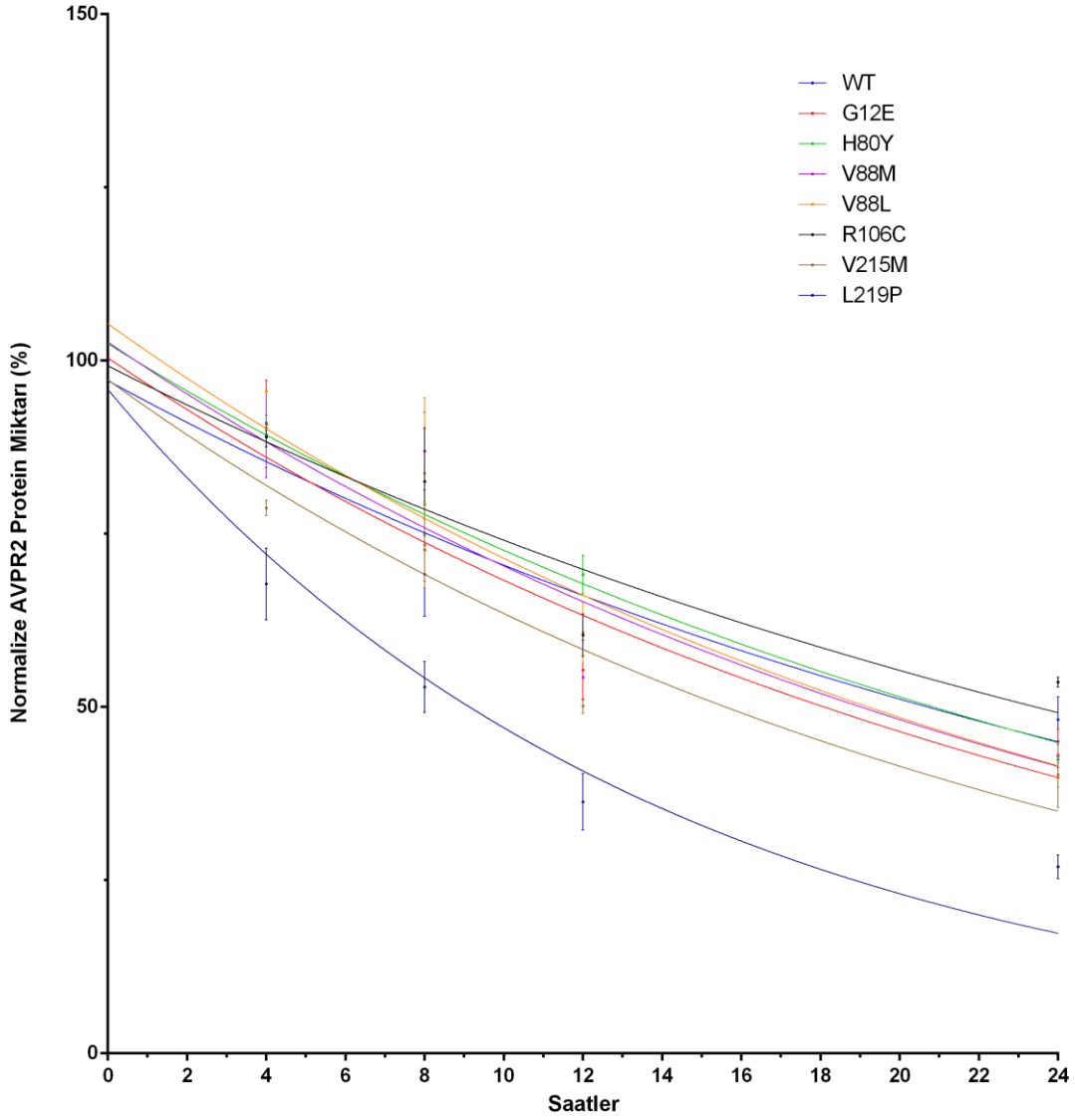
L219P mutasyonu için yapılan sikloheksimid analizi sonrası elde edilen yarı ömür değeri  $9,77 \pm 0,38$  saat olarak bulunmuştur. Yabani tip ve mutant proteinlerin yarı ömürlerinin karşılaştırmalı grafiği ve saatlere göre azalan protein miktarlarına ilişkin grafik Şekil 4.21 ve 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.20. L219P mutantı ile transfecte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. A: 0., 4., 8., 12. ve 24. saatlerinin L219P örneğine ait protein bantları, B: Aktin kontrolü protein bantları



Şekil 4.21. Yabani tip ve mutant AVPR2 proteinlerin yarı ömür değerlerinin karşılaştırmalı grafiği (WT: Yabani tip)



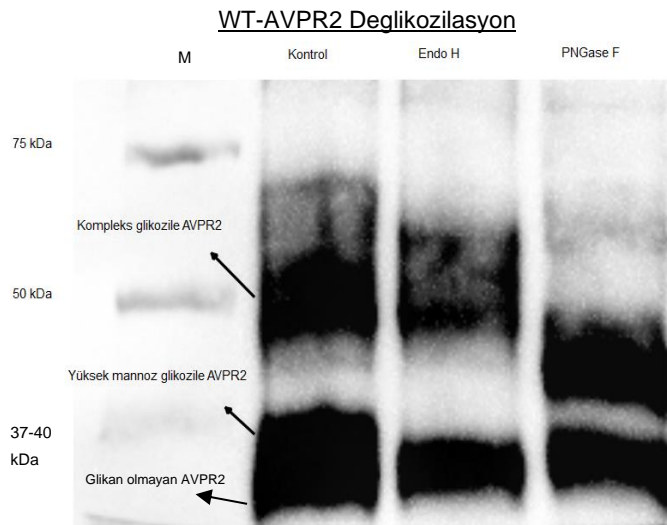
Şekil 4.22. Yabanıl tip ve mutant *AVPR2* ile transfekte edilmiş hücrelerin sikloheksimid analizi sonrası elde edilen normalize protein miktarlarının (%) karşılaştırmalı grafiği.

	Yarı ömür saatleri	p değerleri
WT	21,62	-
G12E	17,99	0,001494272
H80Y	20,15	0,000515198
V88M	18,33	4,66306E-07
V88L	17,88	8,63651E-06
R106C	23,69	0,001809605
V215M	16,26	2,3411E-05
L219P	9,731	8,35889E-10

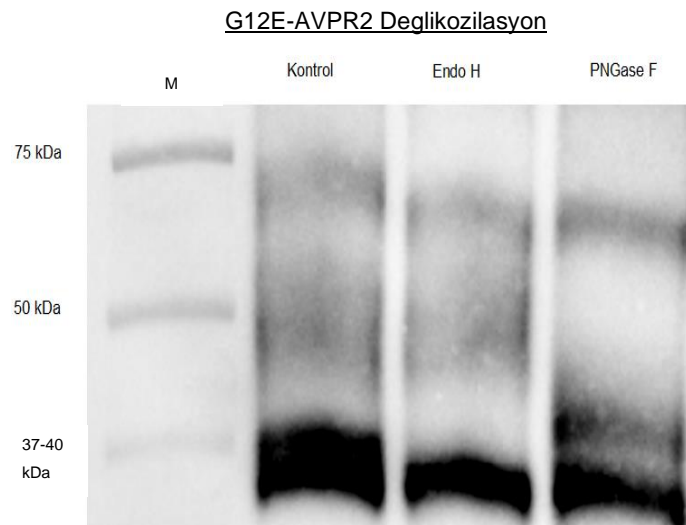
Çizelge 4.5.1. Yabanıl tip ve mutant *AVPR2* proteinlerine ait yarı ömür saatleri ile mutantlar ve yabanıl tip arasındaki normalize edilmiş yarı ömür saatlerinin t-testi sonuçları ( $p < 0,01$ )

#### 4.6. Deglikozilasyon Analizi ile Elde Edilen Yabancıl Tip ve Mutant AVPR2 Proteinlerinin Stabilite Durumu ile İlgili Sonuçlar

Yabancıl tip ve mutant AVPR2 proteinlerinin glikozilasyon durumlarını incelemek için yapılan Endo H ve PNGase F enzim kesimlerini ilişkin sonuçlar kontrolleri ile birlikte Şekil 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29 ve 4.30'da verilmiştir. Yaklaşık 37-40 kDa'da görülen bant yüksek mannoz yapısı barındıran ER'deki olgunlaşmamış AVPR2 proteinini, yaklaşık 50 kDa'da görülen bant ise kompleks glikan yapısına sahip olan olgun AVPR2 proteinini temsil etmektedir. 75 kDa'da görülen bant ise 37-40 kDa'da görülen AVPR2 bandının multimerik formudur.

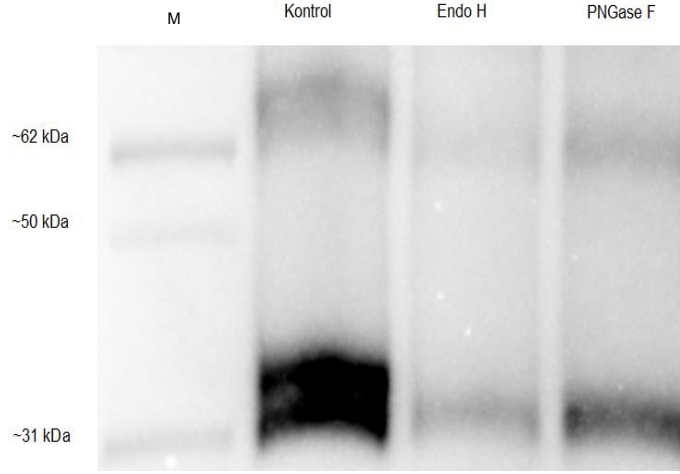


Şekil 4.23. Yabancıl tip (WT) AVPR2 ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).



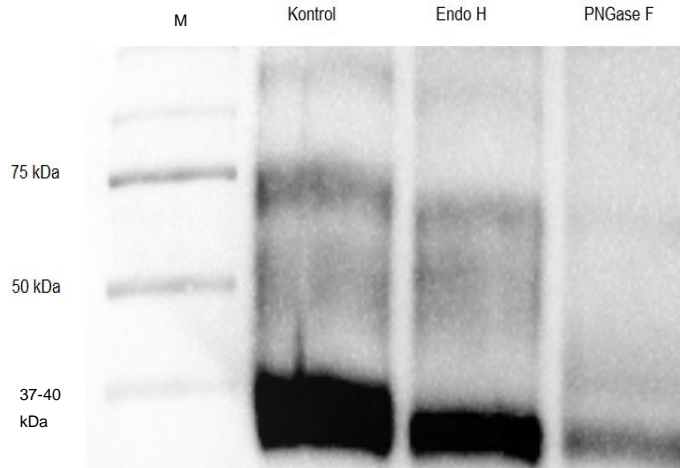
Şekil 4.24. G12E mutanti ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).

#### H80Y-AVPR2 Deglikozilasyon

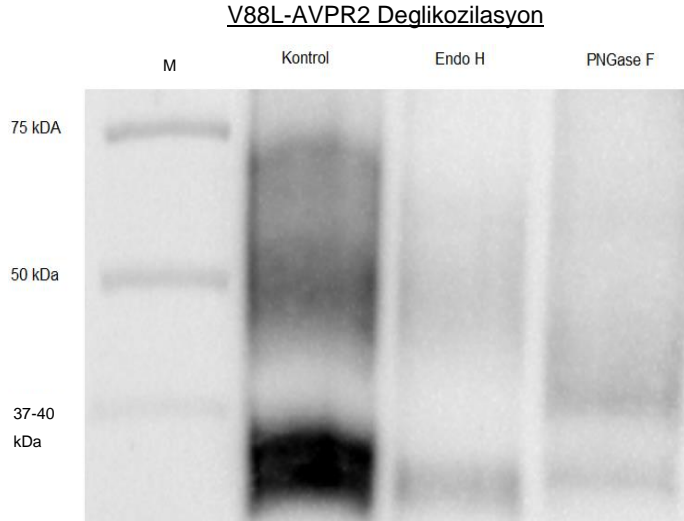


Şekil 4.25. H80Y mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).

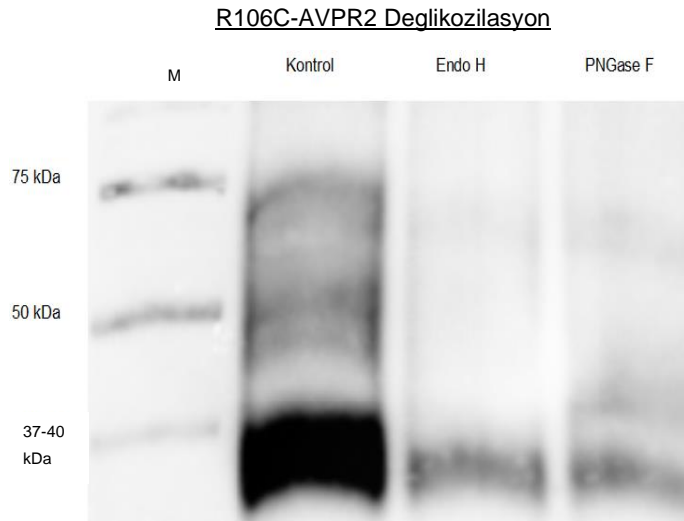
#### V88M-AVPR2 Deglikozilasyon



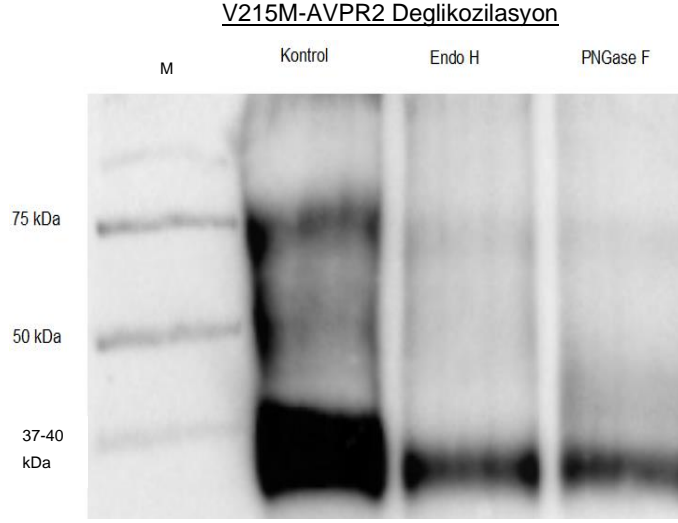
Şekil 4.26. V88M mutanıtı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).



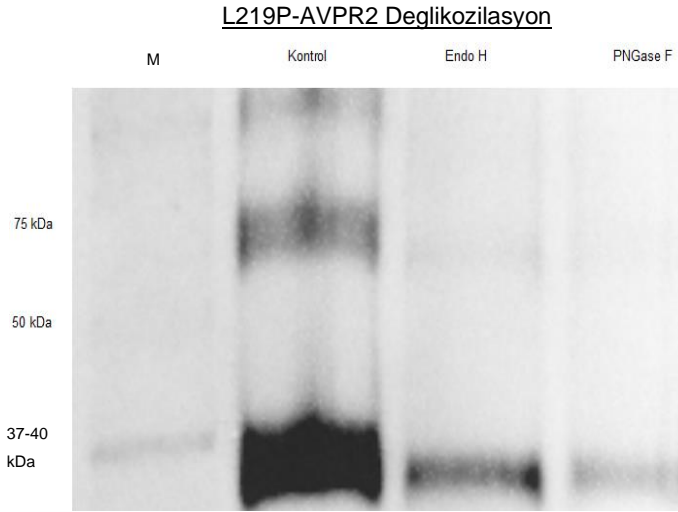
Şekil 4.27. V88L mutanđ ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).



Şekil 4.28. R106C mutanđ ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).



Şekil 4.29. V215M mutanı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).



Şekil 4.30. L219P mutanı ile transfekte edilmiş hücrelerin deglikozilasyon analizi sonrası elde edilen western blotlama görüntüsü. (Kontrol: kesim yapılmamış protein, M: marker).

## 5. TARTIŞMA

Reseptör proteinine bağılı gelişen kalıtsal NDI, *AVPR2* geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanan, nadir görülen genetik bir hastalıktır. HGMD veri tabanında, *AVPR2* gen bölgesi için 287 mutasyon tespit edilmiştir. Genin her bölgesinde yayılış gösteren bu mutasyonlar, hastalığın farklı düzeylerde oluşmasına neden olur [53, 62]. Mutasyonun etki seviyesini ve fonksiyonel etkinliğini incelemek, tedavi sürecine yön vermek ve hastalığın mekanizmalarını anlamak için büyük önem taşımaktadır. Yapılan tez çalışması kapsamında, grubumuz tarafından tanımlanan G12E, H80Y, V88M, V88L, R106C, V215M ve L219P mutasyonlarının, reseptör proteininin olgunlaşması ve ifade edilen reseptör proteinlerinin yarı ömürleri üzerine etkileri incelenmiştir.

### 5.1. G12E Mutasyonunun *AVPR2* Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi

Tez çalışmasında etkilerinin incelendiği G12E mutasyonu, ilk olarak 1994 yılında Wenkert ve ark. tarafından tanımlanmıştır [75]. Bu mutasyon, *AVPR2*'nin hücre dışında N-ucunda bulunan 12. kodondaki glisin amino asidinin glutamat amino asidine dönüşümüne neden olur (GGG→GAG). Glisin, küçük ve yüksüz bir amino asittir; fakat glutamat, glisinden daha büyük ve negatif yüklü bir amino asittir. Memeli ortologları arasında korunmuş bir bölge olmayan 12. kodonda yer alan bu yük değişiminin, reseptörün ligandı ile bağlanmasını etkileyeceği düşünülmektedir. Genel konformasyondaki bu yük değişiminin, reseptörün membrana yerleşimini, katlanma ve olgunlaşma sürecini ve/veya reseptörün ligandı ile bağlanma afinitesini etkilemesi beklenmektedir.

Yapılan fonksiyon analizi çalışmalarında, toplamda ne kadar protein ifade edildiği ve ifade edilen bu proteinin ne kadarının membran yüzeyine taşınabildiği ELISA deneyleriyle belirlenmiştir ve ek olarak cAMP cevabı oluşumuna bakılmıştır. Elde edilen ELISA ve cAMP analizi sonuçlara göre, yük değişimine neden olan bu mutasyonun, büyük bir değişime neden olmadığı görülmüştür ve yabanıl tip ile yakın sonuçlar elde edilmiştir [73, 76].

Tez çalışması kapsamında ise, G12E mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü  $17,97 \pm 1,37$  saat olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip ile karşılaştırıldığında, yarı ömür zamanı %16,84'lük bir düşüş göstermiştir (Çizelge 4.5.1). Bu nedenle olgunlaşmamış mutant proteinlerin bir kısmının şaperonlar tarafından tanınıp degradasyona yönlendirilmiş olabileceğini düşündürmüştür. Deglikozilasyon analizi sonuçları da göz önüne alınarak, yaklaşık 37-40 kDa büyüklüğündeki yüksek mannoz yapısındaki AVPR2 proteininin, Endo H ile kesildiği gözlenmiştir (Şekil 4.24). Bu sonuç, yabanıl tipin yüksek mannoz yapısındaki (37-40 kDa) protein bandının yoğunluğuyla karşılaştırıldığında G12E mutant proteininin bir kısmının ER'de takılı kalabileceğini göstermiştir. Ayrıca, yaklaşık 50 kDa'da görülen olgun AVPR2 formunda da bant görülmektedir ve bu kompleks glikozile form AVPR2'nin O-glikozilasyonuna da [77, 78] bağlı olarak PNGase F ile kesilmiştir. Bu nedenle, mutant proteinin bir kısmı degradasyona yönlendirilse de yabanıl tip ile karşılaştırıldığında, büyük bir kısmının da olgun hale gelebileceği düşünülmüştür. Grubumuz tarafından da yapılan fonksiyon analizleri sonuçları [73] ile karşılaştırıldığında, ELISA analizi sonuçlarının yabanıl tip ile yakın olması (hücre yüzeyi ifadesi %76,6 total ifade %84,8), yarı ömür ve deglikozilasyon sonuçları ile örtüşmektedir. Sonuç olarak, G12E mutasyonu sonucu oluşan AVPR2 proteinlerinin küçük bir kısmının şaperonlar tarafından tanınarak ER aracılı degradasyon yolağına yönlendirilebileceği fakat büyük bir çoğunluğunun da olgun forma erişebileceği düşünülmüştür.

## **5.2. H80Y Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi**

*AVPR2* geninde yer alan H80Y mutasyonu, ilk olarak 2018 yılında grubumuz tarafından tanımlanmıştır [79]. Bu mutasyon, 2. transmembran domeyninde bulunan 80. kodondaki histidin amino asidinin, tirozin amino asidine dönüşümüne neden olur (CAC→TAC). Histidin, hidrofilik ve pozitif yüke sahip bir amino asittir; fakat tirozin, aromatik ve hidrofobik karaktere sahip bir amino asittir. Bu farklılıkların, protein yapısında ve katlanmasında büyük farklılıklara yol açabileceği öngörülmektedir. Transmembran domeynleri, ligandın reseptöre bağlandıktan sonra hücre içerisine sinyalin iletilmesi sırasında, reseptörün aktif konformasyonu almasını sağlar. Korunmuş bir bölgede meydana gelen H80Y



mutasyonunun, reseptörün düzgün bir şekilde katlanıp membrana yerleşimini ve daha sonrasında gelen sinyali iletme sırasında doğru konformasyonu almasını etkilediği düşünülmektedir.

1994 yılında Yuasa ve ark. tarafından aynı bölgede yer alan ve bir başka amino asit değişimine neden olan (H80R) bir mutasyon tanımlanmıştır [80]. Tanımlanan bu mutasyonun fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen ilgili makalede 80. kodon olan histidinin korunmuş bir amino asit rezidusu olduğu ve bu bölgede gerçekleşen bir mutasyonun, reseptör konformasyonunda büyük bir değişime neden olacağı vurgulanmıştır.

Tez çalışması kapsamında ise, H80Y mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü  $20,15 \pm 0,7$  saat olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip ile karşılaştırıldığında yarı ömür zamanı, %6,75'lik bir düşüş göstermiştir (Çizelge 4.5.1). Diğer mutasyonlar arasında yabanıl tipe en yakın yarı ömür değeri gösteren mutasyon H80Y'dir. Yarı ömür sonuçlarına göre, mutant proteinin çok az bir miktarı ER aracılı degradasyon yolağına yönlendirilmektedir. Bu durum iki şekilde açıklanabilir. İlk seçenek, mutant proteinin büyük bir kısmı olgunlaştığı için çok az miktarının degradasyon yolağına yönlendirilmesidir. Diğer bir seçenek ise, mutant proteinin şaperonlar tarafından tanınmadığı ve/veya ER'den taşınmaya ve degradasyona dirençli olduğu için ER'de takılı kalmasıdır. Bunun nedeni, yarı ömür sonuçlarının deglikozilasyon analizi sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmesiyle daha iyi anlaşılabilir. Şekil 4.25'te görüldüğü üzere H80Y mutantının 50 kDa'da görülen olgun AVPR2 formunda bant görülmemektedir. Endo H kesimine bakıldığında ise yüksek mannoz yapısındaki 37-40 kDa'da görülen bandın büyük çoğunluğu kesime uğramıştır. Bu durumda, ifade edilen mutant proteinin büyük bir kısmının ER'de yüksek mannoz yapısında takılı kalarak, Golgi aygıtına ulaşamayarak, kompleks glikozillenmiş olgun formuna erişemeyeceği düşünülmüştür. Yarı ömür zamanında görülen düşüşün az olması ise, şaperonların mutant proteini tanıyabilmesi fakat mutant proteinin ER'den taşınmaya veya degradasyona dirençli olmasıyla ilişkilendirilebilir. G201D mutasyonuna sahip AVPR2 proteinleri ile yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir ve mutant proteinin ER'den

taşınmaya veya degradasyona dirençli olmasıyla ilişkilendirilmiştir [78]. Sonuç olarak şaperonlar tarafından tanınan fakat degradasyona ve ER'den taşınmaya direnç gösterdiği düşünülen mutant protein, ER'de, yüksek mannoz yapısında takılı kalabilir ve olgun formuna ulaşamayabilir.

### **5.3. V88M ve V88L Mutasyonlarının AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkileri**

Tez çalışmasında etkilerinin incelendiği V88M mutasyonu, ilk olarak 1992 yılında Pan ve ark. tarafından tanımlanmıştır [81]. Bu mutasyon, 2. transmembran domeyninde bulunan ve memeli ortologları arasında korunmuş olan 88. kodondaki valin amino asidinin, metiyonin amino asidine dönüşümüne neden olur (GTG→ATG). Her iki amino asit de hidrofobik karakterlidir. Benzer amino asit yapılarına sahip bir değişim gerçekleştiren bu mutasyonun, protein konformasyonunu ve membrana yerleşimini ciddi derecelerde etkilememesi beklenmektedir.

Tez çalışmasında olası etki mekanizmaları incelenen V88L mutasyonu ise ilk olarak 2000 yılında Arthus ve ark. tarafından tanımlanmıştır [82]. Bu mutasyon, 2. transmembran domeyninde bulunan 88. kodondaki valin amino asidinin, lösin amino asidine dönüşümüne neden olur (GTG→TTG). V88M mutasyonunda olduğu gibi, her iki amino asit de hidrofobik karakterde ve benzer dallanma yapılarına sahiptir. V88M'de gerçekleşen amino asit değişimi ile benzer bir değişim gerçekleşen bu mutasyonun da etkisinin benzer olacağı düşünülmektedir.

V88M mutantı için grubumuz tarafından da yapılan fonksiyon analizi çalışmalarında, toplam ifade edilen ve membran yüzeyine ulaşan protein miktarının yabanıl tipe göre büyük bir düşüş göstermediği fakat cAMP cevabının oldukça azaldığı gösterilmiştir [73, 83]. cAMP cevabındaki bu azalma muhtemelen ligand bağlanma afinitesine bağlıdır. Bu mutasyon, proteinin yapısal olarak membrana doğru yerleşmesini engellememektedir fakat ligand

bağlanmaları için önemli bir bölge olan transmembran domeyninde yer aldığı için AVP'ye olan afinitenin azalmasına neden olmaktadır.

Tez çalışma kapsamında V88M mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü  $18,37 \pm 0,48$  saat, V88L mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü ise  $17,89 \pm 0,34$  saat olarak belirlenmiştir. Yabani tip ile karşılaştırıldığında, yarı ömür zamanı V88M için %14,99'luk, V88L için ise %17,19'luk bir düşüş göstermiştir (Çizelge 4.5.1). Aynı noktada gerçekleşen iki farklı amino asit değişimi için elde edilen yarı ömür zamanları yakınlık göstermektedir. Bu, her iki mutant proteinin de ER aracılı degradasyona yakın derecelerde yönlendirilebileceğini düşündürmüştür. Fakat, Şekil 4.26 ve 4.27'de glikozilasyon durumlarının mutant proteinler arasında farklılık gösterdiği görülür. Her iki mutant için, olgun formu temsil eden 50 kDa'daki bant görülmektedir ve PNGase F kesim ile kompleks glikan yapısı ve O-glikozilasyona bağlı eklentiler uzaklaştırılmıştır. Fakat bu proteinlerin, yüksek mannoz formunu temsil eden 37-40 kDa'daki bantlarının Endo H kesimi karşılaştırıldığında, V88L mutantına ait Endo H kesimin, V88M mutantına göre daha fazla gerçekleştiği görülmektedir. Bu sonuç bize, V88L mutant proteininin, çoğunlukla yüksek mannoz yapısındaki olgun olmayan formda bulunduğunu gösterir. Olgun forma ulaşabilen V88L mutant proteinleri ise muhtemelen şaperonlar tarafından yanlış katlandığı tespit edilemeyen ve Golgi aygıtına ulaşabilen kısmını temsil etmektedir. Şaperonların V88L mutant proteinini doğru analiz edememesi ve degradasyona yönlendirememesi, yarı ömür zamanlarının V88M mutanti ile yakın değerlerde bulunmasını açıklamaktadır. Hermosilla ve ark. da bazı AVPR2 mutasyonların, ER'de şaperonlar tarafından yetersiz bir şekilde tanınan bir katlanmaya neden olduğu hipotezini destekler nitelikte sonuçlar elde etmiştir [84]. Sonuç olarak her iki mutasyon da ER'de takılı kalarak degradasyon yolağına yönlendirilebilirken, V88L mutantlarının bir kısmı degradasyon yolağına yönlendirilemez. Şaperon kontrolünden sıyrıldığı düşünülen olgun V88L mutantlarının, fonksiyonel olarak daha işlevsiz olacağı tahmin edilmektedir.

#### **5.4. R106C Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi**

Tez çalışmasında etkilerinin incelendiği R106C mutasyonu, ilk olarak 1994 yılında Bichet ve ark. tarafından tanımlanmıştır [85]. Bu mutasyon, 1. hücre dışı halkada bulunan 106. kodondaki arjinin amino asidinin, sistein amino asidine dönüşümüne neden olur (CGT→TGT). Arjinin pozitif karakterde bir amino asittir; fakat sistein, yüksüz ve hidrofilik karakterde bir amino asittir. Karakter farklılıklarının yanı sıra sistein amino asidi, diğer sistein rezidularıyla disülfid köprüleri oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, amino asit dizisine katılan fazladan bir sistein rezidusunun, AVPR2 reseptörünün uygun konformasyonda membrana yerleşebilmesi ve aktif formunu koruması bakımından negatif etkiler meydana getireceği düşünülmektedir.

Yapılan fonksiyon analizi çalışmalarında ise R106C mutasyonuna sahip AVPR2 proteininin total ifadesinin yabanıl tipe yakın olduğu, yüzeye ulaşan protein ifadesinin ise yarıya düştüğü gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak, cAMP cevabında da önemli bir azalma görülmüştür. Sistein amino asidinin, 1. hücre dışı halka ve 2. hücre dışı halka arasındaki disülfid köprüsünü etkilediği ve bağlanma afinitesini etkilediği için cAMP cevabının azaldığı elde edilen çalışmalar sonucu gösterilmiştir [73, 86-88].

Tez çalışması kapsamında R106C mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü  $23,73 \pm 0,68$  saat olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip ile karşılaştırıldığında yarı ömür zamanı, %9,83'lük bir artış göstermiştir (Çizelge 4.5.1). Yarı ömür zamanında artış gösteren tek mutant proteindir. Genel bir görüş olarak mutasyon sonucu degradasyon hızının artması ve yarı ömür zamanının düşmesi öngörülmektedir. Fakat her mutasyonun etki mekanizması, farklı şekilde işler. Spastin proteini ile yapılan yarı ömür analizi sonucu, I344K mutasyonuna sahip olan proteinin yarı ömrünün, yabanıl tipe göre artış gösterdiği ortaya konmuştur [89]. Mutasyonun, degradasyonu inhibe ettiği ve stabilitesini arttırdığı yönündeki görüşleri, R106C mutasyonu için de geçerli olabilir. Ayrıca sisteinin getirmiş olduğu bağ yapma gücü, proteine ek bir stabilite kazandırmış olabilir. Fakat,

stabilitesinin artıp bununla birlikte yarı ömrünün de artmış olması, mutant reseptörün etkin bir şekilde katlanarak görev göreceği membrana yerleşeceği ve fonksiyonel olacağı anlamına gelmeyebilir. Nitekim, grubumuz tarafından yapılan fonksiyon analiz çalışmaları sonucunda, R106C mutant reseptörünün yukarıda da bahsedildiği gibi membrana yerleşiminde azalma gözlemlendiği ve ligand ile uyarıldıktan sonra cevap olarak yeterli miktarda cAMP üretilmediği belirlenmiştir [73]. Bu bağlamda elde edilen deglikozilasyon analizi sonuçlarına bakılacak olursa, Şekil 4.28'de görüldüğü üzere yüksek mannoz yapısını temsil eden 37-40 kDa bandında Endo H kesimi gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, olgun formu temsil eden 50 kDa'daki bant gözlemlenmiş olup PNGase F ile kesimi gerçekleştirilmiş olsa da, oluşan olgun formdaki mutant proteinlerin şaperonların kontrolünden sıyrılan, düzgün katlanamamış, işlevi yetersiz proteinler olduğu tahmin edilmektedir. Sonuç olarak R106C mutant proteininin büyük bir çoğunluğu ER'de takılı kalabilir ve degradasyonu inhibe ettiği için yarı ömründe artış gözlemlenebilir.

### **5.5. V215M Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi**

Tez çalışmasında etkilerinin incelendiği V215M mutasyonu, ilk olarak 1998 yılında Wildin ve ark. tarafından tanımlanmıştır [90]. Bu mutasyon, 5. transmembran domeyninde bulunan 215. kodondaki valin amino asidinin, metiyonin amino asidine dönüşümüne neden olur (GTG→ATG). Her iki amino asit de hidrofobik karakterlidir. V88M ile benzer etkilerin görüleceği öngörülmekle birlikte, farklı transmembran domeynlerinde meydana gelen aynı amino asit değişiminin etkilerinin ortaya konmasında önemli bir karşılaştırma olacağı düşünülmektedir.

Yapılan fonksiyon analizi çalışmalarında, V215M mutasyonuna sahip AVPR2 proteininin AVP doz uygulamaları sonrası oluşturduğu cevaba bakıldığında yabancı tipe göre daha yüksek ligand konsantrasyonlarında da olsa sinyal verme kapasitesini koruduğu ortaya konmuştur [90].

Tez çalışması kapsamında V215M mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü  $16,35 \pm 0,77$  saat olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip ile karşılaştırıldığında, yarı ömür zamanı %24,34'lük bir düşüş göstermiştir (Çizelge 4.5.1). L219P'den sonra en fazla düşüş gösteren mutant V215M olmuştur. V88M ile karşılaştırıldığında aradaki yaklaşık %10'luk fark, 5. transmembran domeyninde gerçekleşen bu değişimin 2. transmembran domeyninde gerçekleşenden daha fazla stabilite kaybına yol açabileceğini ortaya koymaktadır. Her ne kadar aynı amino asit değişimi gerçekleşmiş olsa da, mutasyonun gerçekleştiği bölgeye göre etkisinin değişebildiği de elde edilen bu sonuçlarla kanıtlanmıştır. Nitekim, 215. kodon, memeli ortologları arasında kısmen korunmuş bir bölge iken, 88. kodon oldukça korunmuştur. Yarı ömür zamanına bakıldığında, V215M mutantının şaperonlar tarafından degradasyona yönlendirildiği söylenebilir. Deglikozilasyon analizi ile elde edilen sonuçlar birlikte yorumlanacak olursa, 37-40 kDa'da görülen yüksek mannoz yapısındaki AVPR2 proteininin bir kısmı, Endo H ile kesilmiştir. Kompleks glikan yapısı barındıran ve O-glikozilasyona bağlı olarak PNGaseF kesiminin gerçekleştiği 50 kDa'daki olgun form gözlemlenmiştir. Fakat büyük çoğunluğu ER'de takılı kalan mutant proteinlerin olgun formlarının şaperonların kontrolünden sıyrılan ve gerekli hücre sel sinyalizasyonu sağlayamayacak proteinler olduğu tahmin edilmektedir.

## **5.6. L219P Mutasyonunun AVPR2 Proteini Yarı Ömrüne ve Glikozilasyon Modifikasyonlarına Etkisi**

Tez çalışmasında etkilerinin incelendiği L219P mutasyonu, ilk olarak 1997 yılında Cheong ve ark. tarafından tanımlanmıştır [91]. Bu mutasyon, 5. transmembran domeyninde bulunan 219. kodondaki lösin amino asidinin, prolin amino asidine dönüşümüne neden olur (CTG→CCG). Prolin, bulunduğu noktada yapısal hareketliliği azaltır ve katı bir düzenleme sağlar. Polipeptid zincirinde sabit bir bükülme oluşturduğu bilinir. Bu nedenle gerçekleşen bu değişimin büyük konformasyonel etkileri olacağı öngörülmektedir.

Yapılan çalışmalara göre, AVPR2'nin 44., 62. ve 292. kodonlarında, lösinden proline değişimi gerçekleşen 3 mutasyon (L44P, L62P, L292P) daha

bulunmaktadır [75, 92, 93]. Her biri için yapılan fonksiyon analizi çalışmalarının ortak sonucu, prolin dönüşümünün, AVPR2 konformasyonunu ve ligand bağlanma afinitesini oldukça olumsuz etkilediği yönündedir [78, 94, 95].

Tez çalışması kapsamında L219P mutasyonu içeren AVPR2 proteininin yarı ömrü  $9,77 \pm 0,38$  saat olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip ile karşılaştırıldığında, yarı ömür zamanı %54,77'lik bir düşüş göstermiştir (Çizelge 4.5.1). Diğer mutant proteinlerle karşılaştırıldığında en kısa yarı ömüre sahip mutant protein olduğu görülmektedir. Prolin amino asidinin neden olduğu keskin değişim ve aynı dönüşümün diğer noktalarda gerçekleştiği mutasyonlara ait fonksiyon analizi çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen bu değer anlamlı olabilir. Elde edilen bu sonuç, ifade edilen proteinin ER'de takılı kalarak hızlı bir şekilde degrade edilebileceğini düşündürmektedir. Deglikozilasyon analiziyle beraber değerlendirmek adına Şekil 4.30'a bakıldığında, proteinin 50 kDa'da bulunan kompleks glikozile olgun formunun ifade edilmediği görülmektedir. 37 kDa'da bulunan yüksek mannoz yapısının yüksek oranda Endo H enzimi ile kesildiği görülmektedir. Bu sonuç bize, ifade edilen proteinin büyük bir çoğunluğunun yüksek mannoz yapısında bulunduğunu ve yarı ömür zamanı da göz önünde bulundurulduğunda, şaperonlar tarafından büyük bir çoğunluğunun tanınarak degradasyon yolağına iletilip degrade edildiğini göstermektedir. ER'de takılı kalan ve hızla degrade olan bu L219P mutantının, diğer prolin dönüşümlerinde de olduğu gibi fonksiyonel olamayacağı öngörülmektedir [78, 94, 95].

Elde edilen tüm bu değerlere bakıldığında, her mutantın ER'de farklı düzeylerde takılı kalabileceği görülmektedir. Bazı mutantlar şaperonlar tarafından uygun şekilde kontrol edilebilirken, bazı mutantlar şaperonlardan sıyrılabilir fakat işlevsiz olarak tahmin edilen olgun AVPR2 proteinleri meydana gelmesine neden olabilirler. Protein yarı ömrü analizinin tek başına belirleyici bir analiz olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, proteinin işlevselliği ve oluşturduğu sinyal cevabı, sadece proteinin yarı ömür uzunluğuyla ilişkili olmak zorunda değildir. H80Y örneğinde görüldüğü üzere yarı ömür uzunluğu yabanıl tipe yakın olabilir veya V88M ve V215M örneklerinde olduğu gibi, aynı değişim, proteinin farklı

noktalarında meydana geldiğinde, farklı sonuçlar elde edilebilir. Bu noktada analizler, glikozilasyon durumlarıyla birlikte yorumlanmıştır. Bir proteinin sekresyon yolağında geçirdiği tüm modifikasyonlar büyük önem taşımaktadır ve görüldüğü üzere her mutant bu yolağı farklı şekillerde etkilemektedir. R106C mutantında da görüldüğü üzere degradasyon mekanizmasının inhibisyonu ile yarı ömür uzunluğunun artması dahi mümkündür veya L219P mutasyonunda olduğu gibi mutant proteinlerin büyük çoğunluğu degradasyona yönlendirilebilir. Bu nedenle, AVPR2 proteininin farklı noktalarında ve farklı amino asit değişimleriyle meydana gelen bu mutasyonlar, farklı şekillerde etki mekanizmalarına sahiplerdir. Bu durum, NDI'nın, hastalar arasında değişim gösteren semptomlarını açıklamak için ilave veriler sunabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] F.U. Hartl, Protein Misfolding Diseases, *Annu Rev Biochem*, 86 (2017) 21-26.
- [2] C.M. Dobson, Protein folding and misfolding, *Nature*, 426 (2003) 884-890.
- [3] K. McCaffrey, I. Braakman, Protein quality control at the endoplasmic reticulum, *Essays in Biochemistry*, 60 (2016) 227-235.
- [4] S. Nademi, J.G. Dickhout, Protein misfolding in endoplasmic reticulum stress with applications to renal diseases, *Adv Protein Chem Struct Biol*, 118 (2019) 217-247.
- [5] M.A. Eldeeb, R. Siva-Piragasam, M.A. Ragheb, M. Esmaili, M. Salla, R.P. Fahlman, A molecular toolbox for studying protein degradation in mammalian cells, *J Neurochem*, 151 (2019) 520-533.
- [6] L. Clausen, A.B. Abildgaard, S.K. Gersing, A. Stein, K. Lindorff-Larsen, R. Hartmann-Petersen, Protein stability and degradation in health and disease, *Adv Protein Chem Struct Biol*, 114 (2019) 61-83.
- [7] M. Brehme, A. Sverchkova, C. Voisine, Proteostasis network deregulation signatures as biomarkers for pharmacological disease intervention, *Current Opinion in Systems Biology*, 15 (2019) 74-81.
- [8] S.M. Hurtley, A. Helenius, Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum, *Annu Rev Cell Biol*, 5 (1989) 277-307.
- [9] A. Tannous, G.B. Pisoni, D.N. Hebert, M. Molinari, N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER, *Semin Cell Dev Biol*, 41 (2015) 79-89.
- [10] A. Melnyk, H. Rieger, R. Zimmermann, Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum, *Subcell Biochem*, 78 (2015) 179-200.
- [11] M. Marzec, D. Eletto, Y. Argon, GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum, *Biochim Biophys Acta*, 1823 (2012) 774-787.
- [12] A.J. Parodi, Protein glycosylation and its role in protein folding, *Annu Rev Biochem*, 69 (2000) 69-93.
- [13] T. Schallus, K. Feher, U. Sternberg, V. Rybin, C. Muhle-Goll, Analysis of the specific interactions between the lectin domain of malectin and diglucosides, *Glycobiology*, 20 (2010) 1010-1020.
- [14] C. Galli, R. Bernasconi, T. Solda, V. Calanca, M. Molinari, Malectin participates in a backup glycoprotein quality control pathway in the mammalian ER, *PLoS One*, 6 (2011) e16304.
- [15] I. Wada, D. Rindress, P.H. Cameron, W.J. Ou, J.J. Doherty, 2nd, D. Louvard, A.W. Bell, D. Dignard, D.Y. Thomas, J.J. Bergeron, SSR alpha and

associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane, *J Biol Chem*, 266 (1991) 19599-19610.

[16] J.D. Schrag, J.J. Bergeron, Y. Li, S. Borisova, M. Hahn, D.Y. Thomas, M. Cygler, The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding, *Mol Cell*, 8 (2001) 633-644.

[17] C.E. Jessop, S. Chakravarthi, N. Garbi, G.J. Hammerling, S. Lovell, N.J. Bulleid, ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains, *EMBO J*, 26 (2007) 28-40.

[18] G. Kozlov, S. Bastos-Aristizabal, P. Maattanen, A. Rosenauer, F. Zheng, A. Killikelly, J.F. Trempe, D.Y. Thomas, K. Gehring, Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain, *J Biol Chem*, 285 (2010) 35551-35557.

[19] C. Hammond, I. Braakman, A. Helenius, Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (1994) 913-917.

[20] M. Sousa, A.J. Parodi, The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase, *EMBO J*, 14 (1995) 4196-4203.

[21] S.M. Arnold, R.J. Kaufman, The noncatalytic portion of human UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase I confers UDP-glucose binding and transferase function to the catalytic domain, *J Biol Chem*, 278 (2003) 43320-43328.

[22] M.C. Sousa, M.A. Ferrero-Garcia, A.J. Parodi, Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase, *Biochemistry*, 31 (1992) 97-105.

[23] S. Olivari, T. Cali, K.E. Salo, P. Paganetti, L.W. Ruddock, M. Molinari, EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation, *Biochem Biophys Res Commun*, 349 (2006) 1278-1284.

[24] R. Benyair, E. Ron, G.Z. Lederkremer, Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum, *Int Rev Cell Mol Biol*, 292 (2011) 197-280.

[25] J.J. Caramelo, A.J. Parodi, A sweet code for glycoprotein folding, *FEBS Lett*, 589 (2015) 3379-3387.

[26] C. Lord, S. Ferro-Novick, E.A. Miller, The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (2013).

[27] R.S. Hegde, H.L. Ploegh, Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum, *Curr Opin Cell Biol*, 22 (2010) 437-446.

[28] Z. Sun, J.L. Brodsky, Protein quality control in the secretory pathway, *J Cell Biol*, 218 (2019) 3171-3187.

[29] N. Hosokawa, Y. Kamiya, K. Kato, The role of MRH domain-containing lectins in ERAD, *Glycobiology*, 20 (2010) 651-660.

- [30] J.C. Christianson, T.A. Shaler, R.E. Tyler, R.R. Kopito, OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD, *Nat Cell Biol*, 10 (2008) 272-282.
- [31] D. Eletto, D. Dersh, Y. Argon, GRP94 in ER quality control and stress responses, *Semin Cell Dev Biol*, 21 (2010) 479-485.
- [32] K. Araki, K. Nagata, Protein folding and quality control in the ER, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (2011) a007526.
- [33] H.A. Lu, Diabetes Insipidus, *Adv Exp Med Biol*, 969 (2017) 213-225.
- [34] A. Harrois, J.R. Anstey, Diabetes Insipidus and Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone in Critically Ill Patients, *Crit Care Clin*, 35 (2019) 187-200.
- [35] C. Saifan, R. Nasr, S. Mehta, P. Sharma Acharya, I. Perrera, G. Faddoul, N. Nalluri, M. Kesavan, Y. Azzi, S. El-Sayegh, Diabetes insipidus: a challenging diagnosis with new drug therapies, *ISRN Nephrol*, 2013 (2013) 797620.
- [36] B. Cuzzo, S.A. Padala, S.L. Lappin, Vasopressin (Antidiuretic Hormone, ADH), *StatPearls*, Treasure Island (FL), 2020.
- [37] S. Pisipati, H. Hashim, Vasopressin Receptors in Voiding Dysfunction, in: K.-E. Andersson, M.C. Michel (Eds.) *Urinary Tract*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 453-483.
- [38] L. Bankir, D.G. Bichet, N.G. Morgenthaler, Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation, *J Intern Med*, 282 (2017) 284-297.
- [39] M.A. Knepper, T.H. Kwon, S. Nielsen, Molecular physiology of water balance, *N Engl J Med*, 372 (2015) 1349-1358.
- [40] W.I. Weis, B.K. Kobilka, The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation, *Annu Rev Biochem*, 87 (2018) 897-919.
- [41] V. Syrovatkina, K.O. Alegre, R. Dey, X.Y. Huang, Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins, *J Mol Biol*, 428 (2016) 3850-3868.
- [42] L. Yves, J.P. Gies, Heterotrimeric G Proteins Control Diverse Pathways of Transmembrane Signaling, a Base for Drug Discovery, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2 (2002) 361-372.
- [43] M. Thibonnier, Genetics of vasopressin receptors, *Curr Hypertens Rep*, 6 (2004) 21-26.
- [44] P.C. M Thibonnier, A Thibonnier, and M Shoham, The Basic and Clinical Pharmacology of Nonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists, *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology..* , (2001).
- [45] E. Jackson, Vasopressin and other agents affecting renal conservation of water, 2005, pp. 771-788.
- [46] M.H. Scherthaner-Reiter, C.A. Stratakis, A. Luger, Genetics of Diabetes Insipidus, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 46 (2017) 305-334.
- [47] H. Blotner, P. Kunkel, Diabetes Insipidus and Pregnancy, *New England Journal of Medicine*, 227 (1942) 287-292.
- [48] J.W. Briet, Diabetes insipidus, Sheehan's syndrome and pregnancy, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 77 (1998) 201-203.

- [49] S. Ananthakrishnan, Gestational diabetes insipidus: Diagnosis and management, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, (2020) 101384.
- [50] E. Mercier-Guidez, G. Loas, Polydipsia and water intoxication in 353 psychiatric inpatients: an epidemiological and psychopathological study, *Eur Psychiatry*, 15 (2000) 306-311.
- [51] D.L. May, Patient perceptions of self-induced water intoxication, *Arch Psychiatr Nurs*, 9 (1995) 295-304.
- [52] G.L. Robertson, Dipsogenic diabetes insipidus: a newly recognized syndrome caused by a selective defect in the osmoregulation of thirst, *Trans Assoc Am Physicians*, 100 (1987) 241-249.
- [53] A. Balla, L. Hunyady, Nephrogenic Diabetes Insipidus, *Exp Suppl*, 111 (2019) 317-339.
- [54] D. Marples, S. Christensen, E.I. Christensen, P.D. Ottosen, S. Nielsen, Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla, *J Clin Invest*, 95 (1995) 1838-1845.
- [55] B.M. Christensen, D. Marples, Y.H. Kim, W. Wang, J. Frokiaer, S. Nielsen, Changes in cellular composition of kidney collecting duct cells in rats with lithium-induced NDI, *Am J Physiol Cell Physiol*, 286 (2004) C952-964.
- [56] D. Bockenhauer, D.G. Bichet, Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus, *Nat Rev Nephrol*, 11 (2015) 576-588.
- [57] R.T. Timmer, J.M. Sands, Lithium intoxication, *J Am Soc Nephrol*, 10 (1999) 666-674.
- [58] J.F. Cannon, Diabetes insipidus; clinical and experimental studies with consideration of genetic relationships, *AMA Arch Intern Med*, 96 (1955) 215-272.
- [59] A.M. van den Ouweland, J.C. Dreesen, M. Verdijk, N.V. Knoers, L.A. Monnens, M. Rocchi, B.A. van Oost, Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus, *Nat Genet*, 2 (1992) 99-102.
- [60] M. Birnbaumer, Vasopressin receptor mutations and nephrogenic diabetes insipidus, *Arch Med Res*, 30 (1999) 465-474.
- [61] D.G. Bichet, D. Bockenhauer, Genetic forms of nephrogenic diabetes insipidus (NDI): Vasopressin receptor defect (X-linked) and aquaporin defect (autosomal recessive and dominant), *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 30 (2016) 263-276.
- [62] D.G. Bichet, V2R mutations and nephrogenic diabetes insipidus, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 89 (2009) 15-29.
- [63] M. Christ-Crain, D.G. Bichet, W.K. Fenske, M.B. Goldman, S. Rittig, J.G. Verbalis, A.S. Verkman, Diabetes insipidus, *Nat Rev Dis Primers*, 5 (2019) 54.
- [64] S.M. Mulders, D.G. Bichet, J.P. Rijss, E.J. Kamsteeg, M.F. Arthus, M. Lonergan, M. Fujiwara, K. Morgan, R. Leijendekker, P. van der Sluijs, C.H. van Os, P.M. Deen, An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal

dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex, *J Clin Invest*, 102 (1998) 57-66.

[65] L.L.I. Feldkamp, E. Kaminsky, T. Kienitz, M. Quinkler, Central Diabetes Insipidus Caused by Arginine Vasopressin Gene Mutation: Report of a Novel Mutation and Review of Literature, *Horm Metab Res*, (2020).

[66] N. Di Iorgi, F. Napoli, A.E. Allegri, I. Olivieri, E. Bertelli, A. Gallizia, A. Rossi, M. Maghnie, Diabetes insipidus--diagnosis and management, *Horm Res Paediatr*, 77 (2012) 69-84.

[67] P. Heinbecker, H.L. White, HYPOTHALAMICO-HYPOPHYSIAL SYSTEM AND ITS RELATION TO WATER BALANCE IN THE DOG, *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 133 (1941) 582-593.

[68] H. Imura, K. Nakao, A. Shimatsu, Y. Ogawa, T. Sando, I. Fujisawa, H. Yamabe, Lymphocytic infundibuloneurohypophysitis as a cause of central diabetes insipidus, *N Engl J Med*, 329 (1993) 683-689.

[69] L. Pepin, E. Colin, M. Tessarech, S. Rouleau, N. Bouhours-Nouet, D. Bonneau, R. Coutant, A New Case of PCSK1 Pathogenic Variant With Congenital Proprotein Convertase 1/3 Deficiency and Literature Review, *J Clin Endocrinol Metab*, 104 (2019) 985-993.

[70] M. Babey, P. Kopp, G.L. Robertson, Familial forms of diabetes insipidus: clinical and molecular characteristics, *Nat Rev Endocrinol*, 7 (2011) 701-714.

[71] R.L. Habiby, G.L. Robertson, P.B. Kaplowitz, S. Rittig, A Novel X-linked Form of Familial Neurohypophyseal Diabetes Insipidus. • 386, *Pediatric Research*, 41 (1997) 67-67.

[72] J. Bachman, Site-directed mutagenesis, *Methods Enzymol*, 529 (2013) 241-248.

[73] B. Erdem Tuncdemir, H. Mergen, E. Saglar Ozer, Evaluation of pharmacochaperone-mediated rescue of mutant V2 receptor proteins, *Eur J Pharmacol*, 865 (2019) 172803.

[74] R.C. Silva, B.A. Castilho, E. Sattlegger, A Rapid Extraction Method for mammalian cell cultures, suitable for quantitative immunoblotting analysis of proteins, including phosphorylated GCN2 and eIF2alpha, *MethodsX*, 5 (2018) 75-82.

[75] D. Wenkert, J.J. Merendino, Jr., A. Shenker, N. Thambi, G.L. Robertson, A.M. Moses, A.M. Spiegel, Novel mutations in the V2 vasopressin receptor gene of patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *Hum Mol Genet*, 3 (1994) 1429-1430.

[76] D. Wenkert, T. Schoneberg, J.J. Merendino, Jr., M.S. Rodriguez Pena, R. Vinitzky, P.K. Goldsmith, J. Wess, A.M. Spiegel, Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations, *Mol Cell Endocrinol*, 124 (1996) 43-50.

[77] H. Sadeghi, M. Birnbaumer, O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor, *Glycobiology*, 9 (1999) 731-737.

- [78] J.H. Robben, N.V. Knoers, P.M. Deen, Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model, *Am J Physiol Renal Physiol*, 289 (2005) F265-272.
- [79] A. Celebi Tayfur, T. Karaduman, M. Ozcan Turkmen, D. Sahin, A. Caltik Yilmaz, B. Buyukkaragoz, A.D. Bulus, H. Mergen, A Novel Mutation in the AVPR2 Gene Causing Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus, *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 10 (2018) 350-356.
- [80] H. Yuasa, M. Ito, Y. Oiso, M. Kurokawa, T. Watanabe, Y. Oda, T. Ishizuka, N. Tani, S. Ito, A. Shibata, et al., Novel mutations in the V2 vasopressin receptor gene in two pedigrees with congenital nephrogenic diabetes insipidus, *J Clin Endocrinol Metab*, 79 (1994) 361-365.
- [81] Y. Pan, A. Metzberg, S. Das, B. Jing, J. Gitschier, Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *Nat Genet*, 2 (1992) 103-106.
- [82] M.F. Arthus, M. Lonergan, M.J. Crumley, A.K. Naumova, D. Morin, L.A. De Marco, B.S. Kaplan, G.L. Robertson, S. Sasaki, K. Morgan, D.G. Bichet, T.M. Fujiwara, Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol*, 11 (2000) 1044-1054.
- [83] D. Bockenhauer, E. Carpentier, D. Rochdi, W. van't Hoff, B. Breton, V. Bernier, M. Bouvier, D.G. Bichet, Vasopressin type 2 receptor V88M mutation: molecular basis of partial and complete nephrogenic diabetes insipidus, *Nephron Physiol*, 114 (2010) p1-10.
- [84] R. Hermosilla, M. Oueslati, U. Donalies, E. Schonenberger, E. Krause, A. Oksche, W. Rosenthal, R. Schulein, Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway, *Traffic*, 5 (2004) 993-1005.
- [85] D.G. Bichet, M. Birnbaumer, M. Lonergan, M.F. Arthus, W. Rosenthal, P. Goodyer, H. Nivet, S. Benoit, P. Giampietro, S. Simonetti, et al., Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Hum Genet*, 55 (1994) 278-286.
- [86] N. Namatame-Ohta, S. Morikawa, A. Nakamura, K. Matsuo, M. Nakajima, K. Tomizawa, Y. Tanahashi, T. Tajima, Four Japanese Patients with Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus due to the AVPR2 Mutations, *Case Rep Pediatr*, 2018 (2018) 6561952.
- [87] K. Pasel, A. Schulz, K. Timmermann, K. Linnemann, M. Hoeltzenbein, J. Jaaskelainen, A. Gruters, G. Filler, T. Schoneberg, Functional characterization of the molecular defects causing nephrogenic diabetes insipidus in eight families, *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (2000) 1703-1710.
- [88] C.H. Chen, W.Y. Chen, H.L. Liu, T.T. Liu, A.P. Tsou, C.Y. Lin, T. Chao, Y. Qi, K.J. Hsiao, Identification of mutations in the arginine vasopressin receptor 2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus in Chinese patients, *J Hum Genet*, 47 (2002) 66-73.
- [89] J.H. Lim, H.M. Kang, H.R. Jung, D.S. Kim, K.H. Noh, T.K. Chang, B.J. Kim, D.H. Sung, H.S. Cho, K.S. Chung, N.S. Kim, C.R. Jung, Missense mutation of

SPAST protein (I344K) results in loss of ATPase activity and prolonged the half-life, implicated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864 (2018) 3221-3233.

[90] R.S. Wildin, D.E. Cogdell, V. Valadez, AVPR2 variants and V2 vasopressin receptor function in nephrogenic diabetes insipidus, *Kidney Int*, 54 (1998) 1909-1922.

[91] H.I. Cheong, H.W. Park, I.S. Ha, H.N. Moon, Y. Choi, K.W. Ko, J.K. Jun, Six novel mutations in the vasopressin V2 receptor gene causing nephrogenic diabetes insipidus, *Nephron*, 75 (1997) 431-437.

[92] A. Oksche, J. Dickson, R. Schulein, H.W. Seyberth, M. Muller, W. Rascher, M. Birnbaumer, W. Rosenthal, Two novel mutations in the vasopressin V2 receptor gene in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus, *Biochem Biophys Res Commun*, 205 (1994) 552-557.

[93] N.V. Knoers, A.M. van den Ouweland, M. Verdijk, L.A. Monnens, B.A. van Oost, Inheritance of mutations in the V2 receptor gene in thirteen families with nephrogenic diabetes insipidus, *Kidney Int*, 46 (1994) 170-176.

[94] M. Oueslati, R. Hermosilla, E. Schonenberger, V. Oorschot, M. Beyermann, B. Wiesner, A. Schmidt, J. Klumperman, W. Rosenthal, R. Schulein, Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides, *J Biol Chem*, 282 (2007) 20676-20685.

[95] C.M. Tan, H.H. Nickols, L.E. Limbird, Appropriate polarization following pharmacological rescue of V2 vasopressin receptors encoded by X-linked nephrogenic diabetes insipidus alleles involves a conformation of the receptor that also attains mature glycosylation, *J Biol Chem*, 278 (2003) 35678-35686.