





**V2 RESEPTÖR FONKSİYONU ÜZERİNE H80Y, V88L,  
V215M VE L219P MUTASYONLARININ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF H80Y, V88L,  
V215M AND L219P MUTATIONS ON V2 RECEPTOR  
FUNCTION**

**DİLARA ULUSAL**

**PROF. DR. HATİCE MERGEN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2021



*Bu tez, geleceğime dair her zaman yeni umutlar taşıyan ve benimle her zaman gurur  
duyan dedelerime ithaf edilmiştir.*



## ÖZET

### V2 RESEPTÖR FONKSİYONU ÜZERİNE H80Y, V88L, V215M VE L219P MUTASYONLARININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Dilara ULUSAL**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

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

**Ocak 2021, 78 sayfa**

Diabetes insipidus (DI), aşırı miktarda idrar oluşumu (poliüri) ve çok fazla miktarda su içme (polidipsi) ile karakterize edilen nadir bir hastalıktır. Bu hastalık nedeniyle idrar konsantre edilemez. Susuzluk testi, DI tanısını doğrulamak için kullanılır. Testin amacı, hastanın idrarı konsantre etme yeteneğini gözlemlemek ve arjinin vazopressine (vazopressin, antidiüretik hormon, ADH, AVP) olan cevabını değerlendirmektir. Tanı gecikirse ciddi hipernatremi ve dehidratasyon gibi belirtiler ortaya çıkabilir. Tedavide desmopressin (DDAVP) kullanılır.

Kalıtsal veya edinilmiş nedenlerle çeşitli tiplerde DI hastalığı oluşmaktadır. Arjinin vazopressin reseptör 2 (V2 reseptörü, V2R, AVPR2) ve onu kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar ile aquaporin 2 su kanalları (AQP2) ve onu kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar; konjenital (ailesel, kalıtsal) tipteki Nefrojenik Diabetes İnsipidus'a (NDI)

neden olmaktadır. Konjenital NDI'da normal şekilde salgılanan ve sentezlenen AVP varlığına veya yüksek plazma konsantrasyonlarına rağmen idrar konsantre edilemez. Konjenital NDI'a neden olan *V2R* genindeki mutasyonlar farklı fenotipte reseptör oluşumuna neden olabilir. Bu farklı fenotipteki reseptörler, farklı reseptör fonksiyonları meydana getirirler ve bunun sonucunda hastalığın seyri ve şiddeti değişiklik gösterebilir.

Bu tez çalışmasının amacı, konjenital NDI hastalığına neden olduğu bilinen ve *V2R* geninde tanımlanan H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonlarının, V2 reseptör fonksiyonu üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Bu araştırmalar sayesinde, hastalığın seyrinin aydınlatılması ve gelecekteki tedavi çalışmalarında kullanılması için bilgiler sunulması hedeflenmiştir.

Bu amaç ve hedefler doğrultusunda yapılan deneysel çalışmalarda, ilgili mutasyonlar yabancı tip *V2R* geni içeren memeli ifade vektörleri kullanılarak site-directed mutagenesis yöntemi ile oluşturulmuştur ve COS-7 hücrelerine transfeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Yabancı tip ve mutant V2 reseptörlerinin hücre içi ve hücre yüzeyindeki ifadeleri, enzim-bağlı immünosorbent analiz (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) deneyleri ile tespit edilmiştir. Mutant V2 reseptör aktivitesi ise transfekte hücrelerin AVP ile uyarılması sonucunda cevap olarak sentezlenen siklik adenosin monofosfat (siklik AMP, cAMP) düzeylerine bakılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca mutant V2 reseptörlerinin hücre içindeki yerleşimleri ve endoplazmik retikulumda (ER) takılı kalma durumları floresan görüntüleme yöntemi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak, tez kapsamında çalışılan tüm mutant tip V2 reseptörlerinin yabancı tipe göre farklı düzeylerde fonksiyon kaybına uğradıkları gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes insipidus, AVPR2, V2 reseptör, V2R, fonksiyon analizi



## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF H80Y, V88L, V215M AND L219P MUTATIONS ON V2 RECEPTOR FUNCTION**

**Dilara ULUSAL**

**Master of Science, Department of Biology**

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

**January 2021, 78 pages**

Diabetes insipidus (DI) is a rare disease that is characterized by significantly high urine production (polyuria) and excessive water consumption (polydipsia). This disease generally prevents concentration mechanism of urine. Dehydration tests are applied for confirming the diagnosis of DI. The purpose of dehydration test is to observe the patient's ability to concentrate urine and to evaluate the patient's reaction to arginine vasopressin (vasopressin, antidiuretic hormone, ADH, AVP). In case of late diagnosis, DI can result in serious hypernatremia and dehydration. DI is treated with desmopressin (DDAVP).

Variations of DI can occur either as a hereditary or an acquired disease. Mutations of arginine vasopressin receptor 2 (V2 receptor, V2R, AVPR2) and its coding genes as well as mutations of aquaporin 2 channels (AQP2) and its coding genes cause congenital (hereditary) type Nephrogenic Diabetes Insipidus (NDI). In cases of congenital NDI,

urine cannot be concentrated despite normal secreted and synthesized AVP levels or high plasma concentrations. Mutations on *V2R* gene that cause congenital NDI, can also result in the creation of different phenotypes of receptors. The course and the severity of disease can vary due to incompatible receptor functions caused by different phenotypes of receptors.

The aim of this thesis is to examine the relation between H80Y, V88L, V215M and L219P mutations identified in *V2R* gene, which is known to cause congenital NDI, and V2 receptor functions. The purposes of this examination are to better illuminate the course of disease and to provide information for further research on the treatment.

In accordance with the purpose of this study following procedure is conducted as an experimental research. Relevant mutations mentioned above were produced utilizing site-directed mutagenesis method to mammalian expression vectors containing wild type *V2R* gene. These mammalian expression vectors were transfected to COS-7 cells. Intracellular and cell surface expressions of both wild and mutant types of V2 receptors were determined with the application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments. Levels of cyclic adenosine monophosphate (cyclic AMP, cAMP) synthesized as a response to stimulation of transfected cells with AVP were scanned to observe mutant V2 receptor activity. Positioning of mutant V2 receptors in the cell, and their locations in the endoplasmic reticulum (ER) were observed with the fluorescent imaging method.

As a result, all mutant type V2 receptors studied within the scope of this thesis are observed to demonstrate varying degrees of function loss compared to wild type V2 receptors.

**Keywords:** Diabetes insipidus, AVPR2, V2 receptor, V2R, functional analysis

## TEŞEKKÜR

Milyonlarca harfi, binlerce kelimeyi bir araya getirip okyanuslar oluşturmak ve derinlerinden vurgun yemeden çıkabilmek aldığım desteğin gücündendir. Tez çalışmam boyunca benden desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Oluşturduğum okyanusun derinliklerinde, ruhumun gerçeklerin asitli duygularında erimesine izin vermeyen ve tam o anlarda yanı başımda olup bana elini uzatan hocalarım Dr. Beril ERDEM TUNÇDEMİR, Dr. Sibel KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK, Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER'e,

Okyanusun her mevsiminde, kocaman bir nefesin içinde gezinebildiğim, en nefessiz zamanlarımda bana nefes veren, gerekirse beni yüzeye çeken laboratuvar arkadaşlarım Refika Dilara VAİZOĞLU, Büşra Nur ŞEKER, Hazal TAHRAVİ'ye,

Geri dönmek için sabırsızlandığım, dalışın keyfi ne olursa olsun yaza doğan güneşin duygusunu bir tek onlarla bulduğum Hüseyin Özgür ÖZDEMİREL, Selen SANİN, Okan AKCA'ya,

Bu keşfe anlamını veren, nefes dolusu bir coşkuyla biz diyebildiğim ve bir gün bu gezegeni birlikte cennete çevirebileceğim küçücük, narin ama her şeyden güçlü yüreği ile beni hep besleyen Ezgi SEVİMLİ'ye

Beni önyargılardan, sabitlenmeye meyilli fikirlerden sakınan, her şeyden ayıran, en çok da kendimden koruyan, benim gibi hep yanımda, bambaşka olsa da hissi hep kendim gibi olan daimî kalkanım İbrahim SEVİMLİ'ye,

Derinlerden çıkmamı, sabırla onlara kavuşmamı kalbimin en yakınında bekleyen, daima benim için çok önemli olan annem Müjgan ULUSAL ve babam Ömer ULUSAL'a,

Bu keşiflerin mutlu olmadıktan sonra bir anlamı olmadığını öğreten ve benim mutluluğum olan dostlara,

Her şeyden önce de kendime ve kendimi sorgulamama sebep olan tüm manzaralara, kuytular da ışıkta da parlayan varoluşun her anına,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dilara ULUSAL

Ocak 2021, Ankara

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

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER.....	xi
ÇİZELGELER .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Diabetes insipidus .....	2
2.1.1. Diabetes insipidus Tipleri .....	4
2.1.1.1. Gestasyonel Diabetes insipidus .....	4
2.1.1.2. Primer Polidipsi .....	5
2.1.1.3. Santral Diabetes insipidus.....	6
2.1.1.3.1. Edinilmiş Santral Diabetes insipidus.....	7
2.1.1.3.2. Konjenital (Ailesel) Santral Diabetes Insipidus.....	7
2.1.1.4. Nefrojenik Diabetes insipidus.....	8
2.1.1.4.1. Edinilmiş Nefrojenik Diabetes insipidus .....	9
2.1.1.4.2. Konjenital (Ailesel) Nefrojenik Diabetes insipidus.....	9
2.2. Vücuttaki Su Dengesi .....	12
2.3. G Protein Bağlı Reseptörler .....	15
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	17
3.1. Fonksiyon Analizi Çalışmaları Kapsamında İncelenecek Olan V2R Gen Mutasyonları .....	18

3.2. Site-directed Mutagenез Yöntemi Kullanılarak EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulması .....	18
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi Kullanılarak EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin Elde Edilmesi.....	20
3.2.2. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin ve Vektörlerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi .....	28
3.2.3. Kesim Reaksiyonu Sonrası Vektörler ile İnsert Dizilerin Ligasyonu .....	29
3.3. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin <i>E.coli</i> (DH5 $\alpha$ ) Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesi .....	29
3.4. Elde Edilen Kolonilerden Koloni PZR Yapılması .....	30
3.5. Elde Edilen Bakteri Kültüründen Plazmid DNA'sının İzolasyonu.....	30
3.6. Oluşturulan EGFP Dizisi ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin DNA Dizileme Yöntemi Kullanılarak Doğrulanması.....	31
3.7. EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Yabancı Tip ve Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonu .....	33
3.7.1. COS-7 Hücre Hattının Üretilmesi .....	34
3.7.2. COS-7 Hücre Hattının Pasajlanarak Devamlılığının Sağlanması .....	34
3.7.3. Transfeksiyon için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması .....	36
3.7.4. Hazırlanan İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyon İşlemi...37	
3.8. Yabancı Tip ve Mutant V2 Reseptörlerinin Hücre İçi ve Hücre Yüzeyindeki Miktarlarının Belirlenmesi .....	37
3.8.1. Hücre Yüzey ELISA Deneyi.....	38
3.8.1.1. Hücre Yüzey ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması ...38	
3.8.1.2. Hücre Yüzey ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu38	
3.8.1.3. Hücre Yüzey ELISA Deneyi.....	39
3.8.2. Hücre Total ELISA Deneyi.....	40
3.8.2.1. Hücre Total ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması .....	40
3.8.2.2. Hücre Total ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu..40	
3.8.2.3. Hücre Total ELISA Deneyi.....	41

3.9. Mutant V2 Reseptörlerini İfade Eden COS-7 Hücrelerinin AVP ile Uyarılması Sonucu Cevap Olarak Sentezlenen cAMP Düzeylerinin cAMP Birikim Testi ile Belirlenmesi.....	42
3.9.1. cAMP Birikim Testi için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması.....	43
3.9.2. cAMP Birikim Testi için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu .....	44
3.9.3. Yabancıl Tip ve Mutant V2 Reseptörlerini İçeren COS-7 Hücrelerinin AVP ile Uyarılması.....	44
3.9.4. AVP ile Uyarılan Hücrelerin cAMP Miktarlarının Belirlenmesi için Yapılan AlphaScreen® cAMP Birikim Testi.....	46
3.10. COS-7 Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışması .....	47
3.10.1. Floresan Görüntüleme Çalışması için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması .	48
3.10.2. Floresan Görüntüleme Çalışması için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu .....	48
3.10.3. COS-7 Hücrelerinin ER-İzleyici ile Boyanması.....	49
4. SONUÇLAR.....	50
4.1. Site-directed Mutagenез Yöntemi Kullanılarak EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar .....	50
4.2. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin ve Vektörlerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimine İlişkin Sonuçlar .....	53
4.3. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin <i>E.coli</i> (DH5α) Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesine İlişkin Sonuçlar .....	54
4.4. Oluşturulan EGFP Dizisi ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin DNA Dizileme Yöntemi Kullanılarak Doğrulanmasına İlişkin Sonuçlar.....	55
4.5. Yabancıl Tip ve Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonuna İlişkin Sonuçlar .....	56
4.6. Yabancıl Tip ve Mutant V2 Reseptörlerinin Hücre Yüzeyindeki ve Hücre İçindeki Miktarlarının Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar .....	56
4.6.1. Hücre Yüzey ELISA Deneyine İlişkin Sonuçlar .....	56

4.6.2. Total ELISA Deneyine İlişkin Sonuçlar .....	58
4.7. cAMP Birikim Testine İlişkin Sonuçlar .....	59
4.8. COS-7 Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar .....	60
5. TARTIŞMA .....	63
5.1. H80Y Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	65
5.2. V88L Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	66
5.3. V215M Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	68
5.4. L219P Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	69
6. Kaynaklar .....	71



## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. DI ile ilgili temel bulguların zaman çizelgesi.....	3
Şekil 2.2. Gestasyonel DI patofizyolojisi .....	4
Şekil 2.3. Primer polidipsi patofizyolojisi .....	5
Şekil 2.4. CDI patofizyolojisi .....	6
Şekil 2.5. NDI patofizyolojisi.....	8
Şekil 2.6. V2 reseptörünün ve hastalığa neden olduğu varsayılan 193 mutasyonunun şematik temsili .....	9
Şekil 2.7. AQP2'nin ve hastalığa neden olduğu varsayılan 35 mutasyonunun şematik temsili.....	10
Şekil 2.8. AVP, V2 reseptörü ve AQP2 dahil olmak üzere proteinlerin sentezi ve işlenmesi .....	11
Şekil 2.9. Böbrek toplama kanalında AVP tarafından yönlendirilen suyun geri emiliminin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.10. Tipik bir GPCR yapısı .....	16
Şekil 2.11. G proteini sinyalleşme şeması .....	16
Şekil 3.1. Kullanılan ifade vektörlerine ait harita görüntüleri. ....	19
Şekil 3.2. Her bir mutasyon için tasarlanan primerlerin V2R dizisi üzerindeki yerleşimleri .....	22
Şekil 3.3. Tasarlanan primerlerin ifade vektörleri üzerindeki yerleşimleri .....	23
Şekil 3.4. Tasarlanan primerlerin V2R dizisi üzerindeki şematik gösterimi.....	24
Şekil 3.5. İnsan ve maymun V2 reseptörü homolojisi .....	34
Şekil 3.6. AlphaScreen® cAMP Assay Kit prensibi .....	43
Şekil 4.1. Her bir mutasyonu içeren PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri .....	51
Şekil 4.2. İlgili mutasyonları içeren bütün bir V2R dizisini oluşturmak için yapılan füzyon PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri .....	52
Şekil 4.3. <i>AatIII</i> ve <i>SpeI</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan kesim sonrası ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri .....	53

Şekil 4.4. Gerçekleştirilen koloni PZR sonrası ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri .....	54
Şekil 4.5. EGFP ile işaretlenmiş mutantlar için kromatogram görüntüleri .....	55
Şekil 4.6. pEGFP ile transfeksiyonu gerçekleştirilen COS-7 hücrelerinin 48 saat sonraki görüntüleri .....	56
Şekil 4.7. Mutant V2 reseptörlerine ait hücre yüzey ELISA grafiği .....	57
Şekil 4.8. Mutant V2 reseptörlerine ait Total ELISA grafiği .....	58
Şekil 4.9. cAMP birikim testi sonucu elde edilen doz-cevap eğrisi .....	59
Şekil 4.10. H80Y mutant V2 reseptörünü ifade eden COS-7 hücresi .....	61
Şekil 4.11. V88L mutant V2 reseptörünü ifade eden COS-7 hücresi .....	62
Şekil 5.1. V2 reseptörünün amino asit dizisi .....	63

## ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Mutasyonları oluşturmak amacıyla tasarlanan primer dizileri .....	20
Çizelge 3.2. PZR bileşenleri .....	25
Çizelge 3.3. PZR koşulu .....	25
Çizelge 3.4. Füzyon PZR bileşenleri .....	26
Çizelge 3.5. Füzyon PZR koşulu .....	27
Çizelge 3.6. Vektör ve insert dizilerine ait enzim kesimi içerikleri .....	28
Çizelge 3.7. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri .....	29
Çizelge 3.8. PZR pürifikasyonu bileşenleri .....	31
Çizelge 3.9. PZR pürifikasyonu koşulu .....	32
Çizelge 3.10. Sekans reaksiyonu bileşenleri.....	32
Çizelge 3.11. Sekans reaksiyonu koşulu.....	32
Çizelge 3.12. Deneysel çalışmalarda uygulanan transfeksiyon yöntemleri.....	36
Çizelge 3.13. cAMP ölçümü için standart tüplerinin hazırlanması .....	46
Çizelge 4.1. V2R geni için PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen bant büyüklükleri.....	50
Çizelge 4.2. Hücre yüzey ELISA deneyi sonuçları .....	57
Çizelge 4.3. Total ELISA deneyi sonuçları .....	58
Çizelge 4.4. AVP ile uyarılma sonucu mutant reseptörlere ait $E_{max}$ ve $EC_{50}$ değerleri..	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
°C	Santigrat derece
$\mu$	Mikro
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\infty$	Sonsuz
$\pm$	Artı eksi
®	Tescilli
™	Ticari marka

### Kısaltmalar

A	Adenin
AC	Adenilat siklaz
ACTH	Adrenokortikotropin
ADH	Antidiüretik hormon
AQP2	Akuaporin 2
AQP3	Akuaporin 3

AQP4	Akuaporin 4
as	Antisense (geri) primer
ATP	Adenozin trifosfat
AVP	Arjinin vazopressin
AVPR2	Arjinin vazopressin reseptör 2
bç	Baz çifti
BSA	Bovine serum albümin
C	Sitozin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CDI	Santral diabetes insipidus
cDNA	Komplementer DNA
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
COS7	CV1 Origin SV40
COPII	Kaplama protein kompleksi II
C-terminal	Karboksil terminali
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDAVP	Desmopressin
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DI	Diabetes insipidus
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotit trifosfat

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E.coli	Escheria coli
ECL	Hücre dışı halka
EC <sub>50</sub>	Etki konsantrasyonunun yarı değeri
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent analiz
E <sub>max</sub>	Maksimum etkinlik
ER	Endoplazmik retikulum
F	Forward (ileri) primer
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
G	Guanin
GDP	Guanozin difosfat
GFP	Yeşil floresan proteini (Green Fluorescent Protein)
GPRC	G protein bağlayıcı reseptör
G protein	Guanin nükleotidi bağlayıcı protein
GTP	Guanozin trifosfat
g/L	Gram/Litre
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HA	Hemaglutinasyon
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Hidrojen klorür
HEPES	4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-etansülfonik asit
ICL	Hücre içi halka
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monopotasyum fosfat
L	Litre
LB	Luria Bertani
M	Belirteç
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
NaCl	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
NDI	Nefrojenik diabetes insipidus
nM	Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40 (Oktilfenoksipolietoksiletanol)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
pEGFP	GFP içeren plazmid
pH	Potential of hydrogen
PKA	Protein kinaz A
pLV2R	Vazopressin reseptör 2 kodlayan plazmid
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
QC	Kalite kontrol

R	Reverse (geri) primer
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolution per minute)
s	Sense (ileri) primer
SAP	Shrimp alkalın fosfataz
SD	Standart sapma (standart deviasyon)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOC	Super optimal broth
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
T	Timin
TE	Tris EDTA
TM	Transmembran
TMD	Transmembran domeyni
U	Ünite
UV	Ultra viyole
V1a	Arjinin vazopressin reseptör 1a
V1b	Arjinin vazopressin reseptör 1b
V2R	Arjinin vazopressin reseptör 2
WT	Yabanıl tip



# 1. GİRİŞ

Vücuttaki su dengesinin sürdürülmesi memeli yaşamında önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle sıkı bir şekilde hormon kontrolü altındadır. Vücuttaki su dengesinin sağlanabilmesi için su alımı ile su kaybının denge içinde olması gerekir. Hipotalamus vücuttaki su miktarının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu düzenlemeyi ya susama hissi yaratıp su içilmesini sağlayarak ya da idrarla su atılımını denetleyerek yapmaktadır. Hipotalamus tarafından salgılanan arjinin vazopressin (antidiüretik hormon, ADH, AVP) böbreklerde suyun geri emilimini sağlamaktadır. Böylece vücuttaki su miktarının korunması ve düzenlenmesine yardım etmektedir.

Diabetes insipidus (DI), susuzluk hissine bağlı aşırı miktarda su içme (polidipsi) ve fazla miktarda idrara çıkma (poliüri) gibi belirtileri olan, metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın en belirgin semptomu düşük yoğunlukta aşırı idrar oluşumudur. Normal bir insanın günlük idrar miktarı 1-1,5 litre olarak hesaplanırken, DI hastalarında bu miktarın günde 30 litreye kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir. Hastalar fazla miktarda su içerek vücudun kaybettiği suyu yerine koymaya çalışsa bile, yine de vücutta su miktarının düzenlenmesi gerçekleştirilememektedir. Bu hastalık sonucu, vücuttaki su dengesi bozulur ve kaybedilen suyun idrardan geri alımı düzgün bir şekilde gerçekleştirilemez. İnsanlar için %10'luk bir su kaybı hayati tehlikeye sebep olmaktadır.

Kalıtsal Nefrojenik Diabetes insipidus hastalığı (NDI), *V2R* veya *AQP2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan DI tipidir. *V2R* genini kodlayan dizide, NDI'ya neden olan 200'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. *V2R* geninin kodladığı V2 reseptörü bir G-protein bağlı reseptördür (GPCR) ve içerdikleri mutasyonlar da birçok konformasyonel hastalığa neden olmaktadır. Bu mutant V2 reseptörlerinin büyük bir kısmı doğru bir şekilde katlanamamakta ve hücre kalite kontrol (QC) sistemi tarafından tanınarak, genellikle Endoplazmik retikulumda (ER) takılı kalarak, hücre yüzeyine ulaşamamaktadırlar. Reseptör proteinler kalite kontrol sisteminde takılı kaldıkları zaman fonksiyon kaybına uğradıkları gözlenmektedir. Gerçekleşen mutasyonun tipine ve yerleşimine göre farklı reseptör fonksiyonları gözlemlenmektedir. Bu nedenle olası bir mutasyonun fonksiyonunun anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

Yapılan tez çalışması kapsamında, *V2R* geninde tanımlanan H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonlarına sahip V2 reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

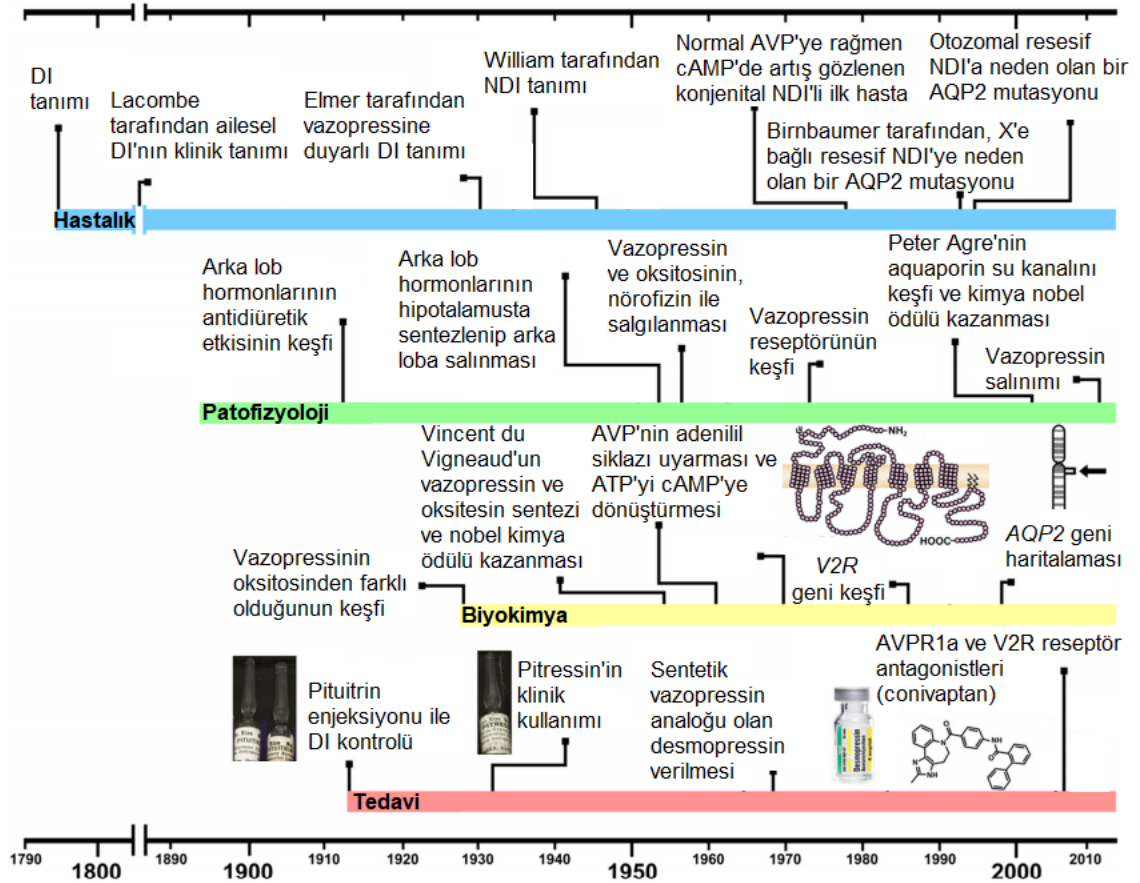
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diabetes insipidus

Su metabolizmasındaki önemli bir bozukluk sonucu oluşa Diabetes insipidus (DI); 25.000-30.000 bireyde 1 görülen kalıtsal bir hastalıktır. Bu hastalık böbrekler yoluyla aşırı miktarda su kaybı ile karakterize edilmektedir. Böbrek, idrarı konsantre edemez ve günde 3 litreyi aşan idrar çıkışı olarak tanımlanan poliüri ve aşırı idrar çıkışını telafi etmek için normalden fazla su içme durumu olan polidipsi ile sonuçlanır. Hastalar günde 18 litreye kadar idrar üretebilirler ve sürekli su alımına ihtiyaç duyarlar [1]. Poliüri ve hipostenüri (idraraın özgül ağırlığının azalması) ile birlikte polidipsi, hastanın susuz kalması durumunda dehidratasyon, hipernatremi ve hacim azalmasına neden olmaktadır [2]. Hastalığın görülme sıklığı ile cinsiyet ve yaş gibi faktörler arasında herhangi bir bağlantı bildirilmemiştir. Belirtiler açısından benzerlik göstermelerine rağmen Diabetes mellitus'tan (DM) farklı olarak hastaların idrarı fazla miktarda glukoz gibi çözünen madde içermez. Bu yüzden DI hastalarının idrarı tatsız ve düşük sodyum konsantrasyonuna sahiptir.

DI ilk olarak 18. yüzyılda, 3 yaşından itibaren günde iki kova su tüketen Fransız bir kadın ve 31 yaşında susuzluk ve aşırı idrar çıkışı gösteren İngiliz bir işçi üzerinde yapılan incelemeler sayesinde literatürde yer almıştır [3]. Bu hastalıkla ilgili ilk çalışmalar 1841 yılında DI'lu sekiz hasta bireyin olduğu bir aile üzerinde gerçekleştirilmiştir [4], 1892 yılında ise DI'un kalıtsal bir hastalık olduğu saptanmıştır [5]. 20. yüzyılın başlarında hipofiz bezinin işlevi ve DI'un doğası net olarak bilinmemektedir. Yapılan klinik ve patolojik gözlemler ile arjinin vazopressinin (antidiüretik hormon, ADH, AVP) hipofizin orta lobunda üretildiği varsayılırken, çoğu araştırmacı da DI'un bir böbrek hastalığı olduğunu düşünmüştür. Bu yüzden hipofiz ile DI arasında bir ilişki olduğu fikri ileri sürülmüştür. Trendelenburg, yaptığı çalışmalarla hipotalamusun AVP içerdiğini göstermiştir [6]. İlk olarak AVP'nin hipofizin arka lobundan hipotalamusa taşındığı hipotezini öne sürmüştür. Ancak hipofiz bezinin ameliyatla çıkarılması işlemi olan hipofizektomiden sonra bile hipotalamusta yüksek konsantrasyonlarda AVP gözlemlenmiştir. Böylece hipotalamusun, hipofiz arka lob hormonlarını üretebildiğini açıklamıştır [6]. DI'lu bazı hastalarda AVP'nin hiçbir etkisinin olmadığını kaydedilmesinin ardından 1945 yılında İsveç'te Forssmann ve ABD'de Waring tarafından yapılan bağımsız çalışmalarla iki farklı DI türünün var olduğu anlaşılmıştır [7]. Vincent

du Vigneaud ve arkadaşları, oksitosin ve vazopressin sentezi üzerinde çalışmışlardır ve 1955 yılında du Vigneaud, oksitosin ve vazopressin üzerine yaptığı çalışmalar sayesinde Nobel Kimya Ödülü'nü almıştır. Son altmış yılda vazopressin hormonunun yapısı, taşınması, reseptörleri ve etkilerinin genetik kontrolü açıklığa kavuşturulmuştur. Knoers, arjinin vazopressin reseptörü 2'nin (V2 reseptörü, V2R, AVPR2) lokasyonunu belirlemiştir [8]. Mariel Birnbaumer tarafından V2 reseptörü için gen ve cDNA izole edilmiştir [9]. Daha sonraki çalışmalar bu hastalığın V2 reseptöründeki genetik kusurlardan da kaynaklanabileceğini ortaya çıkarmıştır. Birnbaumer ve ekibi 1992-1994 yılları arasında yaptıkları çalışmalarla V2 reseptörü genindeki ilk mutasyonları tespit ederek mutasyona uğramış V2 reseptörünün X'e bağlı NDI'nin nedeni olduğuna dair biyokimyasal kanıtları ortaya koymuştur [10], [11]. Genetik dalındaki ilerlemeler, diğer DI tiplerini ayrıntılı olarak karakterize etmeyi mümkün kılmıştır [7] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. DI ile ilgili temel bulguların zaman çizelgesi. [12] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

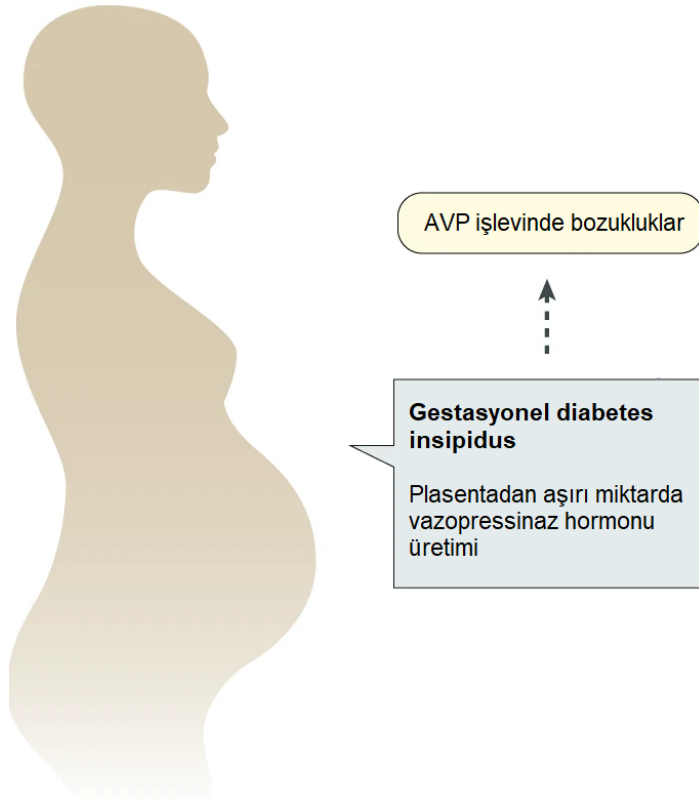
## 2.1.1. Diabetes insipidus Tipleri

Bugüne kadar dört farklı tipte DI tanımlanmıştır [13]. Bunlar:

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

### 2.1.1.1. Gestasyonel Diabetes insipidus

Gestasyonel DI, genellikle hamileliğin üçüncü veya dördüncü trimesterinde görülen bir DI tipidir (Şekil 2.2). Hamilelik sırasında plasenta tarafından üretilen ve AVP yıkımını sağlayan vazopressinaz diğer bir adıyla sistil aminopeptidaz enzimi, annedeki AVP işlevinin bozulmasına yol açmaktadır. Böylelikle vazopressinaz enzimi AVP ve oksitosini hızla inaktive eder. Sonuçta AVP metabolizmasında bozukluklar meydana gelmektedir [14]. Bu durum vücuttaki su metabolizmasında bir dengesizliğe sebep olur ve poliüri ile polidipsi gibi semptomlar gözlemlenir. Bu tip DI, doğumdan sonraki 4-6 hafta içerisinde kendiliğinden geçmektedir.

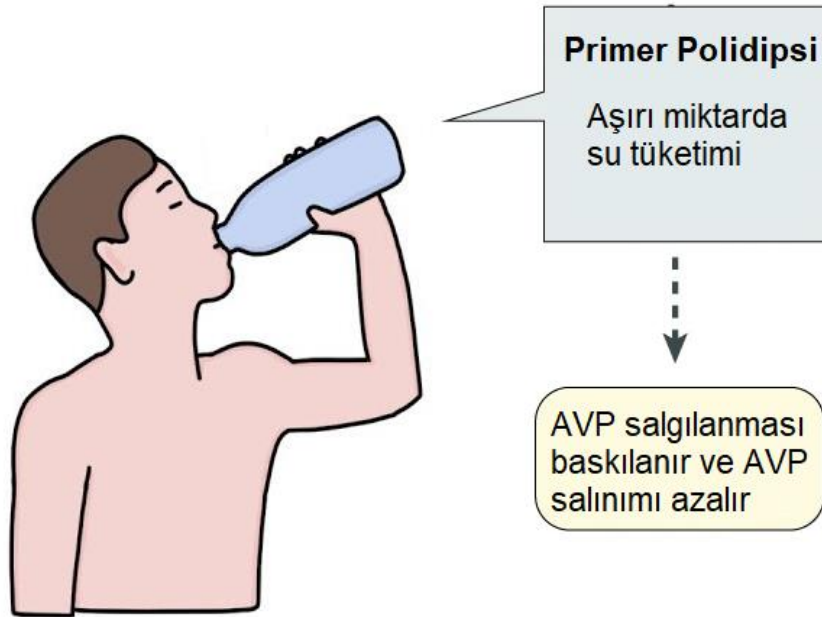


Şekil 2.2. Gestasyonel DI patofizyolojisi. [15] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

### 2.1.1.2. Primer Polidipsi

Aşırı miktarlarda su tüketimi nedeniyle AVP salgılanması baskılanır ve idrar çıkışında artış gözlenir. Buna bağlı olarak susuzluk ve sıvı alımında anormal bir artış ortaya çıkar (Şekil 2.3). Genellikle psikolojik nedenlidir. Bunun yanı sıra enfeksiyon, menenjit, granümatöz hastalıklar ve ağız kuruluğu yapan ilaçlar gibi çeşitli etkenler sonucunda da meydana geldiği bildirilmiştir [16]. Primer polidipsi hastaları, içtikleri su miktarına bağlı olarak bu miktarı idrarla atabilirler ve hiponatremi geliştirmezler. Hastalık nedenine bağlı olarak iki alt tipe ayrılmaktadır. Bunlar:

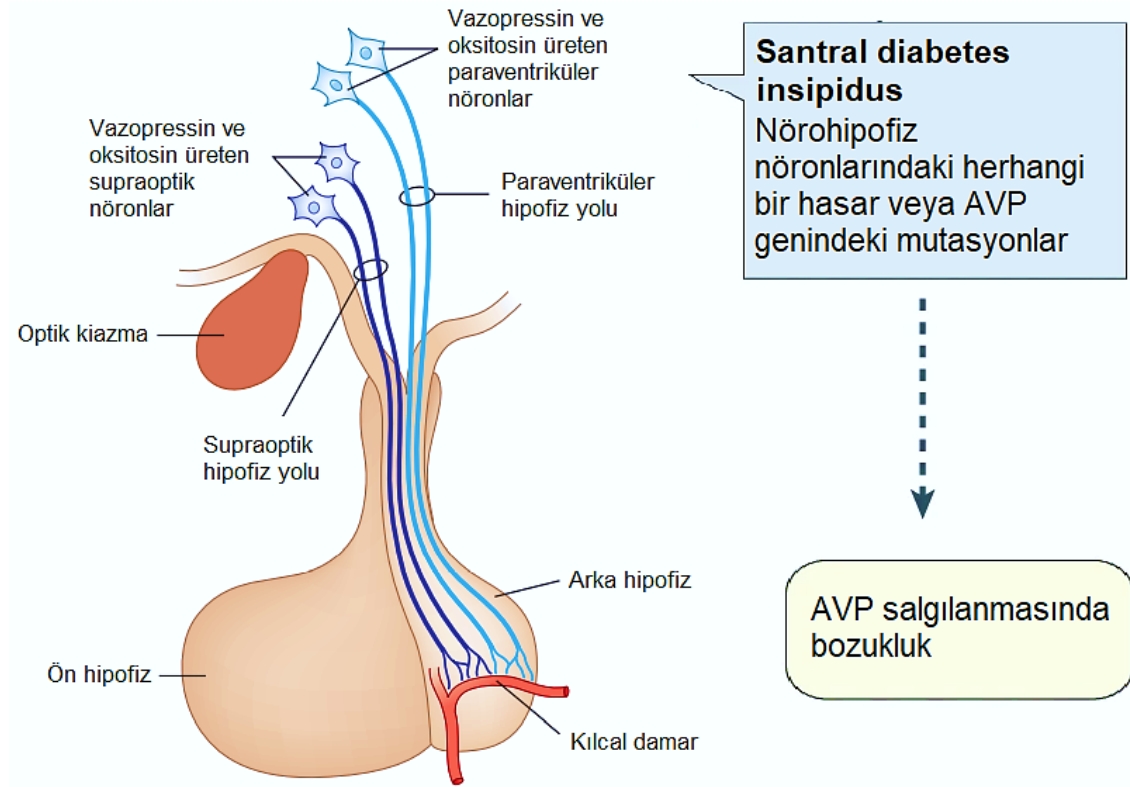
1. Dipsojenik DI: Hipotalamustaki susuzluk merkezinde bulunan bir hasara bağlı olarak gelişir. Susuzluk mekanizması aşırı aktif hale gelir ve bunun sonucunda çok fazla miktarda sıvı alımı gözlemlenir [17].
2. Psikojenik DI: Psikiyatrik veya nörogelişimsel bozukluklardan kaynaklanan DI tipidir. Kullanılan psikiyatrik ilaçların ağız kuruluğuna sebep olmasıyla sıvı alımı miktarında artış gözlemlenir. Buna bağlı olarak seyreltik bir idrar oluşur [17].



Şekil 2.3. Primer polidipsi patofizyolojisi. [15] numaralı kaynaktan ve zerofinals.com internet sitesinden değiştirilerek alınmıştır (Erişim tarihi: 5 Ocak 2021).

### 2.1.1.3. Santral Diabetes insipidus

Santral Diabetes insipidus (Nörojenik, Nörohipofizyal, Hipotalemik, Kraniyal, Vazopressine duyarlı, CDI), AVP yapımındaki veya salınımındaki herhangi bir bozukluktan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.4). AVP, hipotalamus tarafından sentezlenen bir peptit hormonudur. AVP sentezindeki veya salınımındaki bozukluğa bağlı olarak antidiüretik aktivitede yetersizlik meydana gelir. Otozomal dominant, otozomal resesif veya X'e bağlı resesif olarak aktarılır [18]. DI vakalarının %90'ını oluşturur ve en sık rastlanan tipidir. Herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. Genellikle her iki cinsiyeti de eşit miktarda etkiler [19]. Ortaya çıkış nedenine göre iki farklı tipi bulunmaktadır [20]. Bunlar; edinilmiş CDI ve konjenital CDI'dır.



Şekil 2.4. CDI patofizyolojisi. [15], [21] numaralı kaynaklardan değiştirilerek alınmıştır.

### **2.1.1.3.1. Edinilmiş Santral Dabetes insipidus**

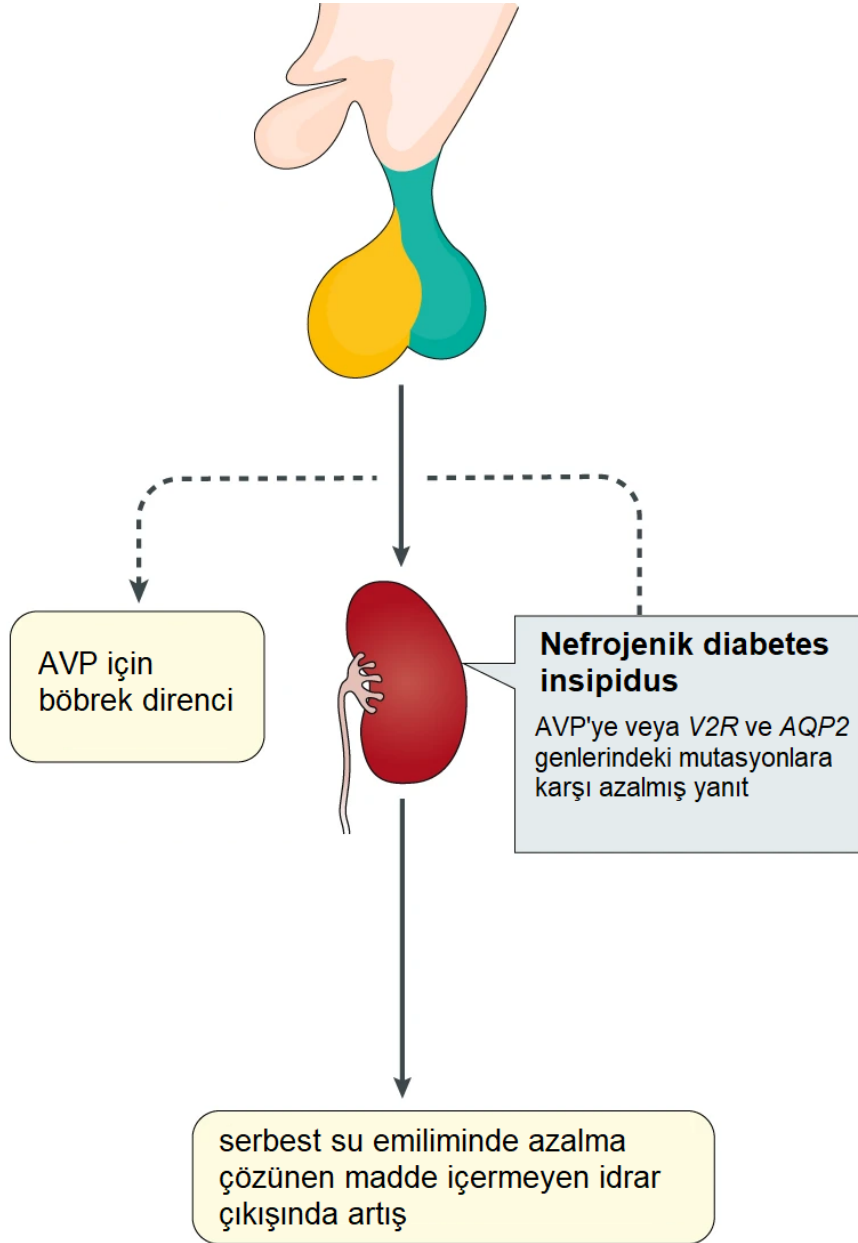
Edinilmiş CDI, kafa travmaları, beyin tümörleri, cerrahi nedenler gibi faktörlere bağlı olarak meydana gelmektedir. Supraoptik veya paraventriküler çekirdekler veya supraoptiko-hipofizeal yolun üst kısmı dahil olmak üzere AVP sekresyonunda yer alan bölgelere verilen hasardan kaynaklanabilir [12]. Genellikle AVP hormonunun sentezlendiği magnoselüler nöronlarda meydana gelen hasarlardan kaynaklanmaktadır [22]. Bu bölgede gerçekleştirilen cerrahi operasyonlar veya meydana gelen tümörler de CDI'ya yol açabilirler. Ayrıca AVP hormonunun salgılanmasını ve susama hissini kontrol eden ozmoreseptörlerdeki hasarlar da AVP salgılanmasının bozulmasına yol açar ve bunun sonunda CDI gelişir. İnflamasyon, menenjit, ensefalit ve vasküler hastalıklardan da kaynaklanabilmektedir [22], [23].

### **2.1.1.3.2. Konjenital (Ailesel) Santral Diabetes Insipidus**

CDI'nın kalıtsal tipidir. Ailesel Nörohipofizyal Diabetes insipidus olarak da adlandırılmaktadır. AVP, yukarıda da bahsedildiği gibi yalnızca dokuz amino asit içeren küçük bir peptid hormondur. Ondan sadece iki amino asitle farklılık gösteren oksitosine yakından benzer [24]. CDI, AVP'nin sentezini, taşınmasını ve salınmasını engelleyen herhangi bir durumdan kaynaklanır [16]. Fizyolojik koşullar altında AVP'nin sentezi ve salınımı, plazma ozmolalitesi veya serum sodyum konsantrasyonu ile düzenlenir. AVP nöron sisteminin ozmoregülasyonu o kadar hassastır ki, serum sodyum konsantrasyonundaki %1-2'lik artış bile, AVP geninin transkripsiyonunu ve AVP hormonunun salınımını önemli ölçüde uyarır [25]. AVP, kromozom 20'nin (20p13) kısa kolunda bulunan AVP geni tarafından kodlanır [26]. AVP geni üç eksondan ve iki introndan oluşur. Birinci ekzon sinyal peptidi, ikinci ekzon, yüksek oranda korunmuş merkezi bölgeyi ve üçüncü ekzon ise, kopeptin olarak bilinen glikopeptidi kodlamaktadır [18], [27]. AVP geninde ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda da CDI meydana gelmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla CDI ile ilişkilendirilmiş 75 tane mutasyon tanımlanmıştır ve bu mutasyonların çoğunluğu tek baz değişiklikleri sonucunda oluşmuştur.

#### 2.1.1.4. Nefrojenik Diabetes insipidus

Edinilebilen veya kalıtsal olabilen NDI, normal şekilde salgılanan ve sentezlenen AVP varlığına veya yüksek plazma konsantrasyonlarına rağmen idrarı konsantre edememe ile karakterizedir [28] (Şekil 2.5). Hipostenüri ile poliüri ve polidipsi, hastalığın ana klinik belirtileridir [29]. Ortaya çıkış nedenine göre iki farklı tipi bulunmaktadır. Bunlar; edinilmiş NDI ve konjenital NDI'dır.



Şekil 2.5. NDI patofizyolojisi. [15] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

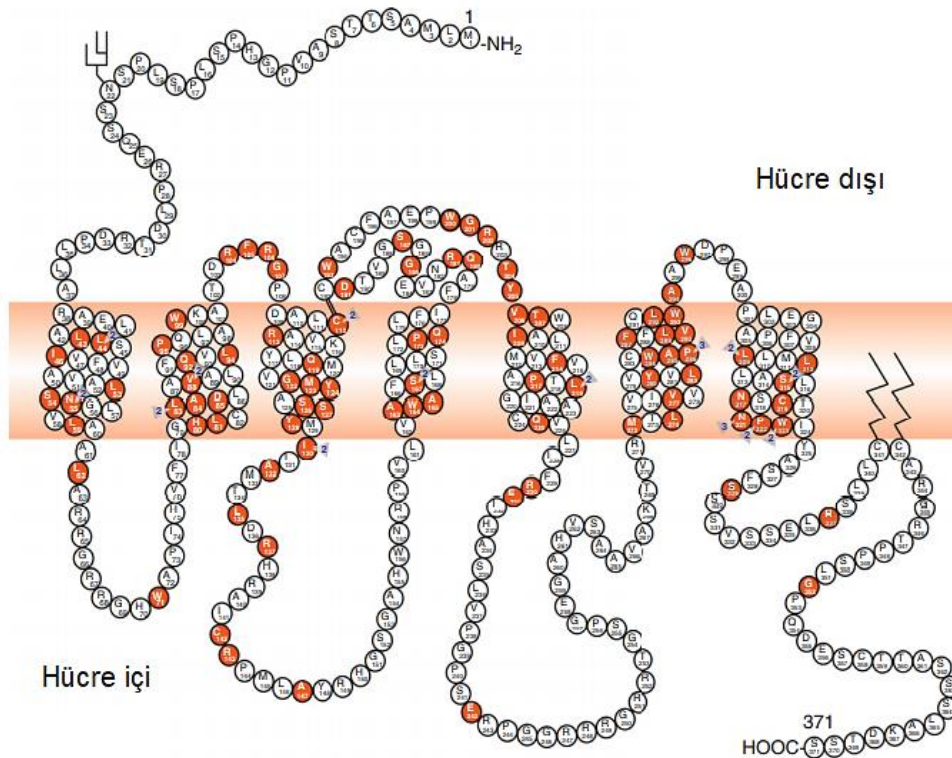


#### 2.1.1.4.1. Edinilmiş Nefrojenik Diabetes insipidus

Edinilmiş NDI'nin çeşitli nedenleri arasında çok çeşitli renal hastalıklar, hipokalemi, hiperkalsemi veya lityum alımı, sidofovir ve foscarnet gibi antiviral ilaçlar yer alır. En dikkate değer örnek lityumdur [12], [28].

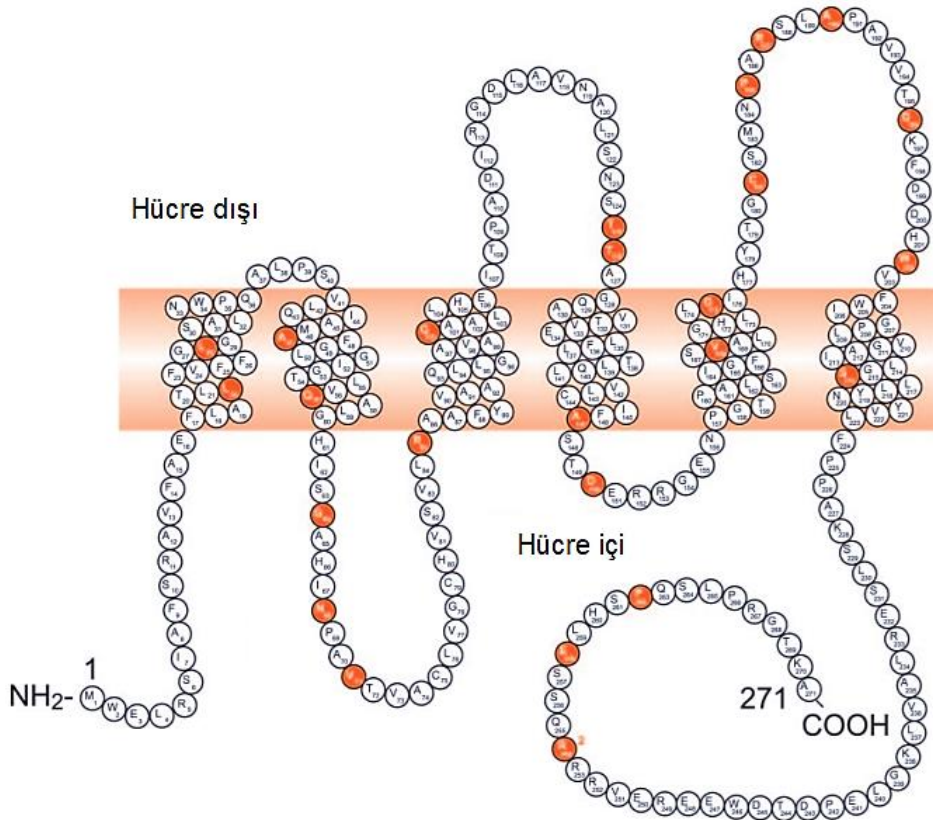
#### 2.1.1.4.2. Konjenital (Ailesel) Nefrojenik Diabetes insipidus

Konjenital nefrojenik diyabet insipiduslu hastaların yaklaşık %90'ı, V2 reseptörünü kodlayan *V2R* geninde X'e bağlı çekinik hasta formuna sahip mutasyonlar taşımaktadır [30], [31]. Bugüne kadar, *V2R* geninde 200'den fazla hastalığa neden olduğu varsayılan mutasyon bildirilmiş ve bunların bazıları fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir. Mutasyonlar tüm gende yayılmıştır ancak hücre dışı veya hücre içi domeynlere kıyasla transmembran domeyninde yaklaşık iki kat daha fazla mutasyon meydana gelir [32]. X kromozomu (Xq28) üzerinde *V2R* geninin üç eksonu ve iki küçük intronu vardır [9], [33]. cDNA dizisi, GPCR ailesine ait yedi transmembran, dört hücre dışı ve dört sitoplazmik bölgeye sahip olan 371 amino asitlik bir polipeptidi oluşturur [29] (Şekil 2.6). V2 reseptörü, GPCR süper ailesi içindeki rodopsin ailesinin 701 üyesinden biridir [34].



Şekil 2.6. V2 reseptörünün ve hastalığa neden olduğu varsayılan 193 mutasyonunun şematik temsili. [29] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

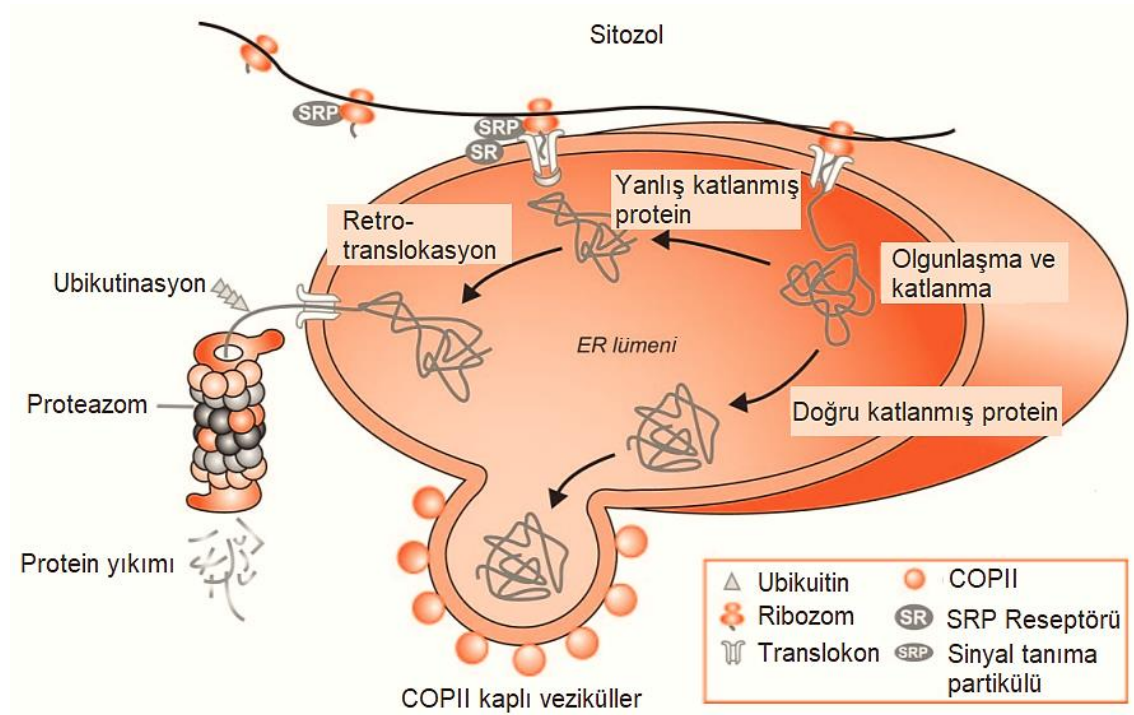
NDI hastalarının geri kalan %10'unun ise esas olarak 12q13 kromozom bölgesinde bulunan ve vazopressine duyarlı su kanalını kodlayan aquaporin-2 genindeki (*AQP2*) mutasyonlardan kaynaklandığı ve otozomal dominant veya resesif kalıtıma sahip olduğu bildirilmiştir [35], [36] (Şekil 2.7). İnsan *AQP2* geni dört ekson ve üç introna sahiptir [37]. *AQP2*, renal toplama kanallarında vazopressin tarafından düzenlenen su kanalıdır.



Şekil 2.7. *AQP2*'nin ve hastalığa neden olduğu varsayılan 35 mutasyonunun şematik temsili. [38] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

İncelenen ailelerin <%10'unda, konjenital NDI, otozomal resesif veya otozomal dominant kalıtım şekline sahiptir. *In vitro* çalışıldığında, çoğu *V2R* mutasyonu, hücre içinde hapsolan ve plazma zarına ulaşamayan reseptörlerle sonuçlanır. Birkaç mutant reseptör hücre yüzeyine ulaşır ancak AVP hormonuna bağlanamaz veya bir hücre içi cAMP sinyalinin uygun şekilde oluşmasını sağlayamaz. Mutant reseptörler, kusurlu hücre içi taşınmaya sahiptir. Doğru şekilde katlanamayan mutant proteinler başlangıçta ER içerisinde tutulur ve daha sonra sıklıkla bozunur. Otozomal resesif NDI'den sorumlu

*AQP2* mutasyonları, yanlış katlanmış mutant proteinlerin yanlış yönlendirilmesiyle karakterize edilir ve ER’de hapsolür [39], [40]. (Şekil 2.8). Bu durum, immünofloresans deneyleri gerçekleştirilerek doğrulanabilir [38]. Mutant protein ER’den nihai hedefine ulaşabilirse, bu mutant proteinler yeterince işlevsel olabilirler. Bu amaçla farmakolojik şaperonlar kullanmak olası bir terapötik yaklaşımdır [41], [42]. Kimyasal veya farmakolojik şaperonların, mutant *AQP2* ve V2 reseptör proteinlerinin hücre içi tutulmasını tersine çevirdiği bulunmuştur.



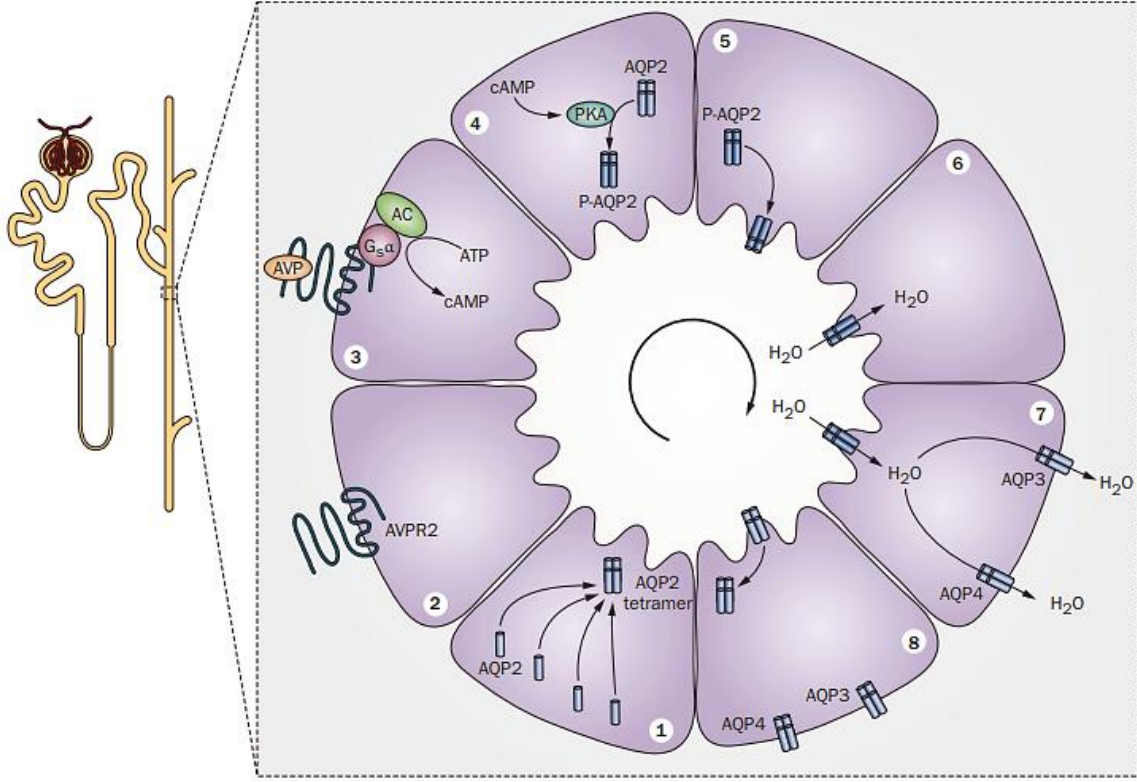
Şekil 2.8. AVP, V2 reseptörü ve *AQP2* dahil olmak üzere proteinlerin sentezi ve işlenmesi. Proteinleri sentezleyen ribozomlar, bir sinyal tanıma peptidi (SRP) ve SRP reseptörü (SR) aracılığıyla ER’in sitozolik yüzüne bağlanır. Peptit, bir translokon yoluyla membrandan geçer. Vezikülleri oluşturmak için ER’yi sıkıştıran kaplama proteini olan COPII çukurlar meydana getirir. Çukurlar vasıtasıyla oluşturulan COPII kaplı veziküllerden Golgi aparatına çıkış için doğru katlanma sağlanabilir. Yanlış katlanmış proteinler başlangıçta ER’de tutulabilir, ancak sonunda ubiquitin-proteazom sistemi tarafından yıkılır. [38], [43] numaralı kaynaklardan değiştirilerek alınmıştır.

## 2.2. Vücuttaki Su Dengesi

Su, hücreyel homeostaz ve yaşam için gereklidir. Su dengesinin düzenlenmesi, sağlığını ve yaşamın sürdürülmesi için gereklidir. Ortalama olarak, hareketsiz bir yetişkinin günde 1,5 litre su içmesi gerekir, çünkü su vücut hidrasyonu için gerekli olan tek sıvı besindir [44]. Vücudun su dengesi, susuzluk ve böbreklerden idrar olarak su atımı ile uyarılan sıvı alımı ile kontrol edilir. Su ve mineral dengesini korumak, bu bilgiyi işleyen beyindeki merkezlere sinirsel yollarla bağlanan vücuttaki farklı bölgelerdeki hassas koordinasyonu gerektirir. Ayrıca bu merkezler, diürez ve kan basıncının ayarlanması için üretilen humoral faktörlere (nörohormonlar) duyarlıdır. Sıvı dengesinin bileşenlerinin çoğu, vücut suyunun durumuna yanıt veren homeostatik mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Bir su açığı, hücre dışı bölmedeki iyonik konsantrasyonda bir artışa neden olur ve hücre içi bölmeden suyu alarak hücrelerin küçülmesine neden olur. Bu küçülme, iki tür beyin sensörü tarafından tespit edilir; biri içmeyi kontrol eder. Diğeri ise daha küçük hacimde daha konsantre idrar üretmek için böbreklere esas olarak AVP yoluyla bir mesaj göndererek idrar atılımını kontrol eder. Böbrekler bu nedenle sıvı dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar [45].

Su kayıpları, su alımını aştığında hipotalamik osmoreseptörlerin aktivasyonu ile, arka hipofiz bezinden AVP salgılanmasına neden olur. AVP, susuzluk hissini ortaya çıkarır [44]. AVP'nin baskılayıcı ve antidiüretik etkileri iyi bir şekilde belgelenmiştir. AVP üretiminin ana bölgesi hipotalamustur ve hipotalamustan gelen yollar, AVP'nin depolandığı nörohipofiz olarak da adlandırılan arka hipofizde sonlanır. AVP salgılanması için en hassas uyarı serum ozmolalitesidir. Küçük bir peptit olan AVP, glomerülden kolaylıkla filtrelenir. Böbrekte metabolize olmaz ve değişmeden idrarla atılır. AVP'nin birincil rolü, böbrek tarafından suyun ve çözünen maddelerin atılımının düzenlenmesidir. Bununla birlikte, bu hormon, kan basıncı kontrolü, trombosit agregasyonu, hücre kasılması, hücre proliferasyonu, adrenokortikotropin (ACTH) salımı, adrenaller tarafından aldosteron salgılanması ve pıhtılaşma gibi bir dizi başka fizyolojik fonksiyonda da aktif olarak rol oynayan bir peptittir [30], [31].

Sağlıklı bireylerde, sodyum klorürün hücre dışı konsantrasyonundaki bir artış veya kan basıncında bir azalma, ozmoreseptörü aktive eder ve bir sinyal oluşturulur. Bu sinyal depolarizasyona neden olur ve ekzositoz yoluyla, nörohipofizde depolanan AVP kan dolaşımına salınır. AVP, öncelikle beyinde ve daha sonra çevresinde bulunan reseptörleri aracılığıyla etki eder. Bu reseptörler V1a, V1b ve V2 olarak adlandırılır. V1a reseptörleri, damarların düz kas hücrelerinin yanı sıra beyin, adrenal korteks, yağ dokusu ve hepatositler dahil olmak üzere birçok dokuda mevcuttur. V1b reseptörleri esas olarak ön hipofizde, adrenal medullada, Langerhans adacık hücrelerinde ve beyaz adipoz dokusunda bulunur. V2 reseptörleri böbrekte, toplama kanalının bazolateral membranında ve alveolar epitel hücrelerinde bulunur [46]. AVP böbreklerdeki toplama kanallarının bazolateral membranında bulunan GPCR ailesinden olan V2 reseptörlerine bağlanır. AVP'nin V2 reseptörlerine bağlanması, cAMP konsantrasyonunu artırır ve protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder, bu da AQP2 aktivasyonuna yol açar. AQP2 tetramerinin dört monomerinden en az üçünün fosforilasyonu gerçekleşir. Bu fosforilasyon adımı, hücre içi cAMP konsantrasyonunun yükselmesi üzerine AQP2 içeren veziküllerin plazma membranına hareketi için gereklidir. AQP2 reseptörleri toplama kanallarının apikal membranına yerleşerek membranı suya geçirgen hale getirir. Bunun sonucunda renal toplama kanallarında su geçirgenliği artar [47]. Suyun geri emilimi sağlanarak plazma hacmi ve idrar ozmolalitesi korunur [12]. Nihayetinde, yeterli su yeniden emildiğinde, AVP konsantrasyonu azalır ve AQP2'ler, apikal membrandan hücre içine geri dönerler ve bu da suyun yeniden emiliminde bir azalmaya yol açar [35] (Şekil 2.9).

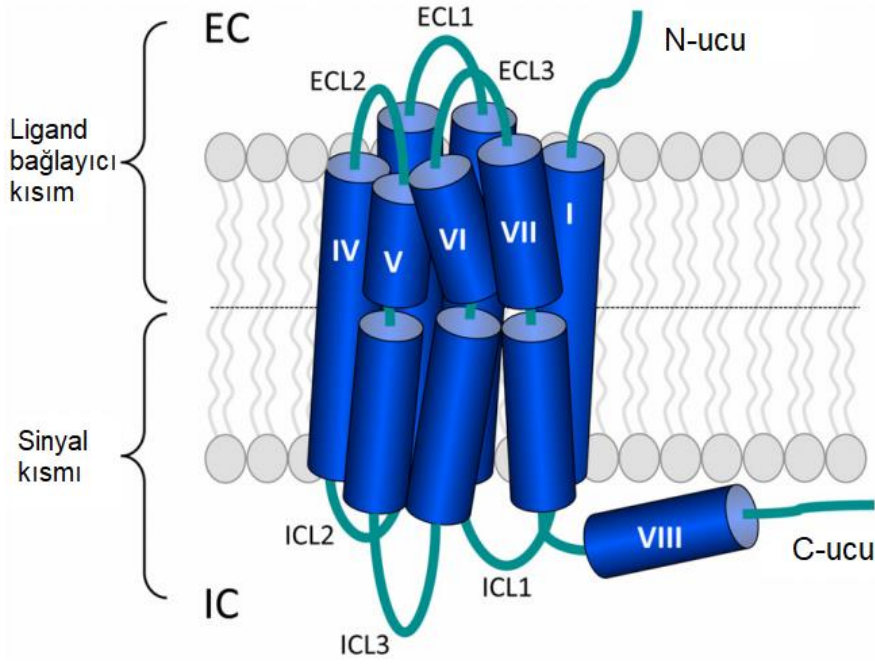


Şekil 2.9. Böbrek toplama kanalında AVP tarafından yönlendirilen suyun geri emiliminin şematik gösterimi. (1) AQP2, fosforlanmamış tetramerleri oluşturur. (2) V2 reseptörü, bir GPCR'dir. (3) AVP'nin bağlanması, G proteininin aktivasyonuna yol açar ve bu da adenilil siklazı aktive eder. (4) Adenilil siklaz, ATP'yi cAMP'ye dönüştürür. cAMP'deki artış, protein kinaz A yolağının aktivasyonuna yol açar ve bu, AQP2'nin fosforilasyonu ile sonuçlanır. (5) Fosforile AQP2, lümen tarafına bakan apikal membrana hızla yerleşir. (6) Daha sonra su, ana hücreye girer. (7) Bazolateral membranda su, hücreyi AQP3 ve AQP4 yoluyla terk eder. (8) AQP2 defosforillenir ve sitozolik bölmelere geri yönlendirilir. [13] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

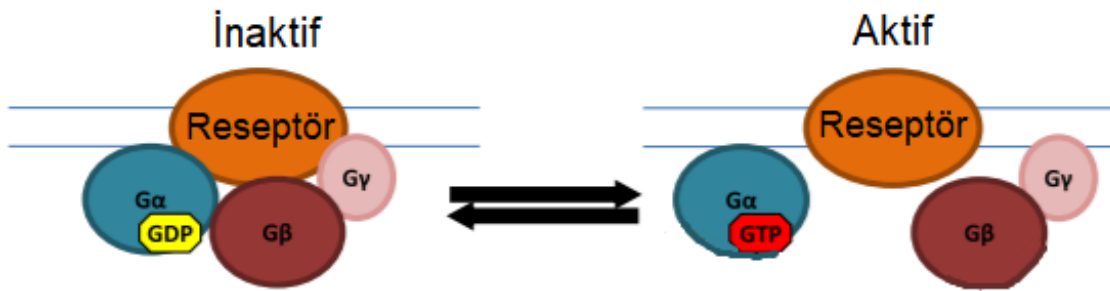
### 2.3. G Protein Bağlı Reseptörler

GPCR'ler, guanidin nükleotidlerini bağlayan bir yapı gösterirler. İntegral membran reseptör aileleri arasında yer alan G protein bağlı reseptörler (GPCR'ler), en büyük membran reseptörleri ailesini oluşturur ve hücrel iletişimde anahtar rol üstlenirler. GPCR'ler hemen hemen her fizyolojik fonksiyonu kontrol etmede önemli rol oynarlar. Yapılan çalışmalar, GPCR'lerin birçok patofizyolojik süreçte de yer aldığını göstermektedir. Neredeyse tüm ökaryotik organizmalarda, mayalarda, bitkilerde, protozoada ve metazoada bulunurlar. Çok sayıda hastalığın tedavisinde önemli ilaç hedefleri olarak görev alırlar. Günümüzde kullanılan ilaçların %60'ından fazlasının hedefi halindedirler. GPCR'ler 3 tane hücre dışı, 3 tane de hücre içi halka tarafından birbirine bağlanan 7 tane  $\alpha$ - heliksin bağlanması ile oluşur ve bunlardan %80'i membrana gömülü durumdadır (Şekil 2.10). GPCR süper ailesinin ortak yapısı olan 7-transmembran-domeyn (7TMD) evrimsel olarak uzun zamandır korunmaktadır [48]. GPCR'lerdeki mutasyonlar da bazı hastalıklara sebep olabilmektedir. Bugüne kadar >30 tek genle kontrol edilen hastalığın GPCR'lerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı tespit edilmiştir [49]. Bu hastalıklar arasında NDI'da yer almaktadır. Brian Kobilka ile Robert Lefkowitz GPCR'lerin fonksiyonu üzerine yaptıkları çalışmalar sonucunda 2012 yılında Kimya dalında Nobel ödülünü almaya hak kazanmışlardır.

GPCR'lerin ana işlevi; hücre dışı uyarınları, hücre içi yanıtlara dönüştürerek hücrelerin çevrelerine yanıt vermesini sağlamaktır. Uyarıcı bir ligandın (yani agonistin) bağlanması üzerine, GPCR'ler heterotrimerik GTP bağlayıcı proteinlerin aktivasyonuna yol açan konformasyonel değişikliklere uğrar. G proteinleri;  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt biriminden oluşur. Aktif olmayan durumda  $G\alpha$ , GDP'ye bağlıdır (Şekil 2.11). Bununla birlikte, bir GPCR tarafından etkinleştirildiğinde GDP, GTP ile değiştirilir. Sonuç olarak, G proteini GPCR'den ayrılır ve  $G\alpha$  ve  $G\beta\gamma$  alt birimleri ikinci haberciler üreten proteinleri aktive ederek transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve sonunda hücrel tepkilere yol açar [50].



Şekil 2.10. Tipik bir GPCR yapısı. Üç hücre dışı (ECL1-3), üç hücre içi (ICL1-3), Amino ucu (N-ucu) ve karboksil ucu (C-ucu) gösterilmiştir. Tüm GPCR'ler, yedi transmembran (TM) alanı ile hücre membranından geçen uzun bir polipeptit amino asit zincirinden oluşur. Bu TM alanları, hidrofobik kalıntılardan oluşan  $\alpha$ -sarmallar halinde düzenlenir. Reseptör proteininin N-ucu hücrenin dışındadır ve C-ucu iç taraftadır. Bu konfigürasyonla üç hücre dışı döngü (ECL) ve üç hücre içi döngü (ICL) oluşturulur. [51] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 2.11. G proteini sinyalleşme şeması. G proteininin alfa, beta ve gama alt birimleri gösterilmiştir.  $G\alpha$ -GDP ve  $G\beta\gamma$ 'den oluşan inaktif heterotrimer, reseptörle birleşir. Reseptörün aktivasyonu, GTP için GDP'nin  $G\alpha$  alt birimi tarafından değişimini,  $G\alpha$ 'nın  $G\beta\gamma$ 'dan ayrılmasını ve aktif sinyal iletimini uyarır. Sinyal sonlandırma, GTP hidrolizi ile olur ve kompleks, inaktif yapıya geri döner. [52] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan tez çalışması ile NDI hastalığı ile ilişkilendirilen H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonlarının V2 reseptörü fonksiyonu üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar ile belirtilen bu mutasyonların reseptör yapısını fonksiyonel olarak ne şekilde değiştirdiğinin açıklanması, bu değişikliklerin hastalığın seyrine nasıl etkilerinin olduğunun anlaşılması ve benzer metabolizma hastalıkları için literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Bu amaç ve hedefler doğrultusunda yapılan deneysel çalışmalar:

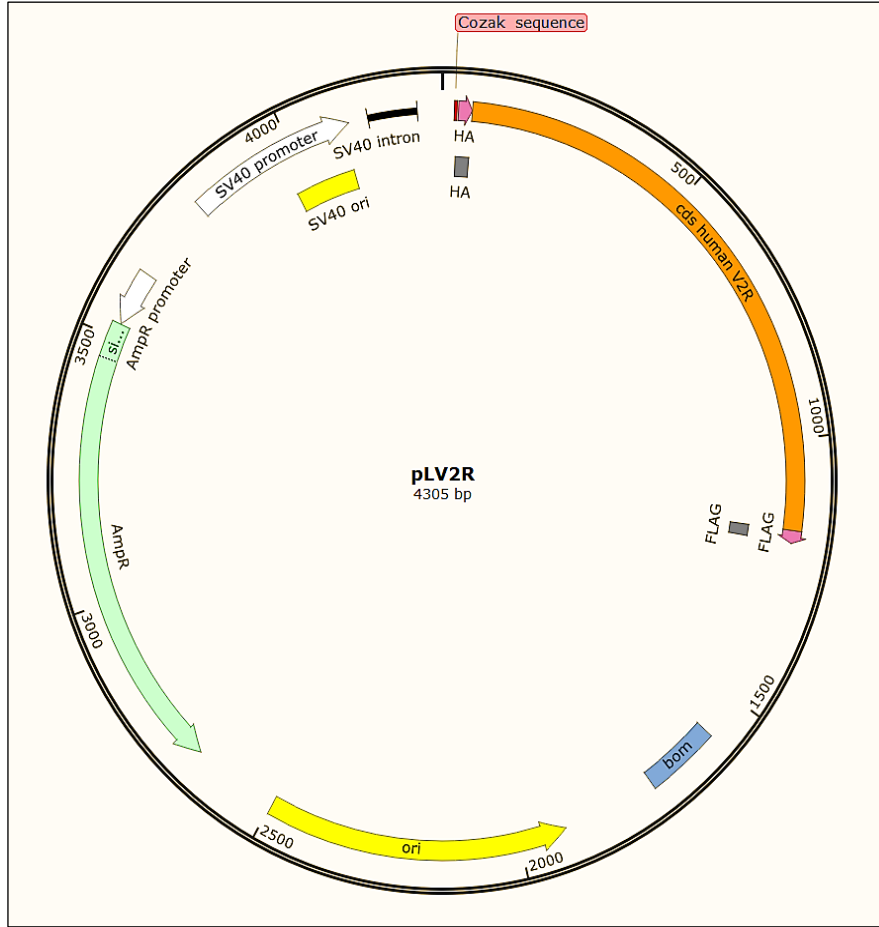
1. Site-directed mutagenesis yöntemi kullanılarak Arttırılmış Yeşil Floresan Proteini (EGFP) ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş mutant *V2R* gen dizilerini içeren ifade vektörlerinin oluşturulması,
2. Oluşturulan EGFP ile işaretli ve işaretsiz mutant *V2R* gen dizilerini içeren ifade vektörlerinin *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) kompetan hücrelerine transformasyonunun yapılması,
3. Oluşturulan ifade vektörlerindeki mutant *V2R* gen dizilerinin DNA dizileme yöntemi kullanılarak doğrulanması,
4. EGFP ile işaretli ve işaretsiz yabancı tip ve mutant *V2R* gen dizilerini içeren ifade vektörlerinin COS-7 hücrelerine transfeksiyonunun gerçekleştirilmesi,
5. ELISA deneyleri ile yabancı tip ve mutant V2 reseptörlerinin hücre içindeki ve hücre yüzeyindeki ifadelerinin belirlenmesi,
6. cAMP birikim testi yöntemi kullanılarak mutant V2 reseptörlerini ifade eden hücrelerin AVP ile uyarılması sonucu sentezlenen cAMP düzeylerinin proje kapsamında grubumuz tarafından yapılan çalışmalarla belirlenmesi,
7. COS-7 hücrelerinde ifade olan EGFP ile işaretlenmiş yabancı tip ve mutant V2 reseptörlerinin floresan görüntüleme çalışmalarıdır.

### **3.1. Fonksiyon Analizi Çalışmaları Kapsamında İncelenecek Olan V2R Gen Mutasyonları**

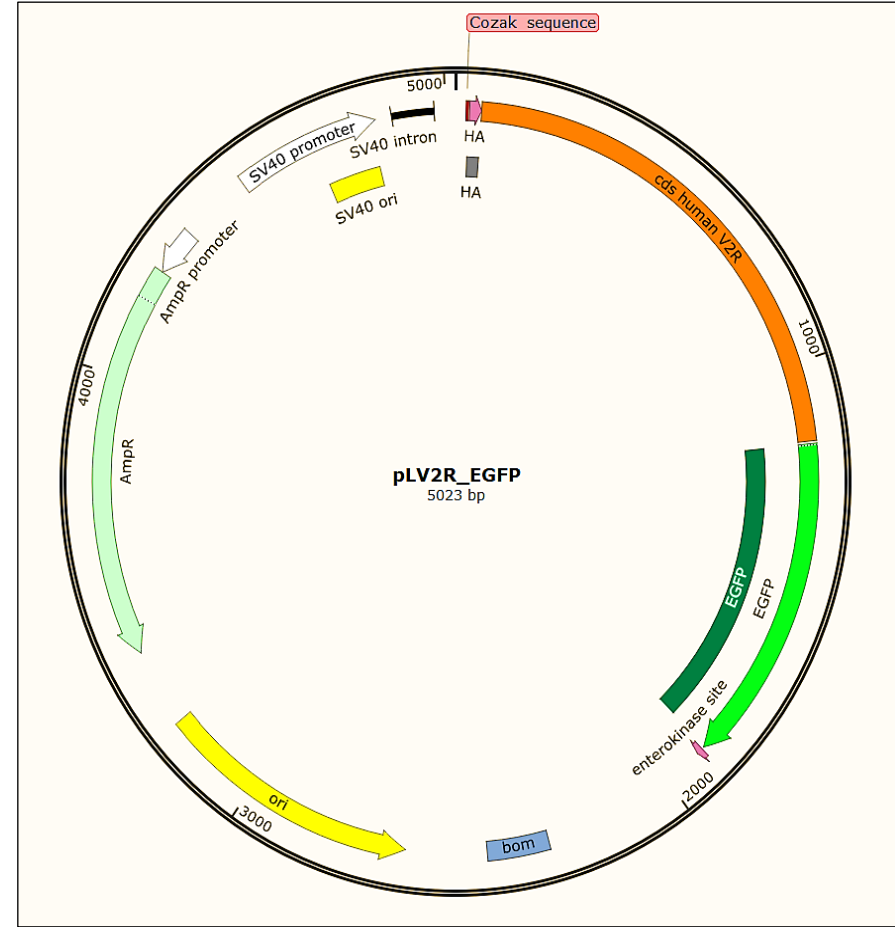
Tez çalışması kapsamında kullanılacak olan mutasyonlar, grubumuz tarafından önceden yapılan çalışmalar sayesinde tespit edilmiştir. 2010 yılında grubumuz tarafından başlatılan ve halen devam etmekte olan DI hastalığının moleküler patolojisini anlamaya yönelik çalışmalar kapsamında bu tez çalışmasında V2R geninde tespit edilen H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonlarının fonksiyon analizleri Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FBA-2017-14395 Nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir [53], [54].

### **3.2. Site-directed Mutagenез Yöntemi Kullanılarak EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulması**

Site-directed mutagenез yöntemi, bilinen bir dizide mutasyona özgü mismatch primerler kullanılarak spesifik ve hedefli değişiklikler yaratmayı sağlayan, genellikle PZR tabanlı çalışmalara dayanarak gerçekleştirilen *in vitro* bir yöntemdir. EGFP dizisini içermeyen mutant V2R dizilerini oluşturmak için insan V2R gen dizisini içeren memeli ifade vektörü olan pLV2R kullanılmıştır. EGFP dizisini içeren mutant V2R dizilerini oluşturmak için insan V2R gen dizisini ve EGFP dizisini içeren memeli ifade vektörü olan pLV2R\_EGFP kullanılmıştır (Şekil 3.1). EGFP içermeyen V2R gen dizisi ELISA ve cAMP deneylerinde kullanılırken EGFP içeren V2R gen dizisi ise sadece floresan görüntüleme çalışmalarında kullanılmıştır. EGFP içermeyen V2R dizisine ait sonuçlar proje kapsamındaki “In Vitro Şartlarda Mutant AVPR2 Proteinlerinin Yarı Ömür ve Glikozilasyon Özelliklerinin Araştırılması” isimli tez çalışmasında verilmiştir [54]. Yabancıl tip ve mutant pLV2R ve pLV2R\_EGFP ifade vektörlerinin N ucu Haemagglutinin (HA) işareti, C ucu ise FLAG işareti taşımaktadır. Aynı zamanda bu ifade vektörleri transformasyon gerçekleştirildikten sonra LB agar plaklarda üreme seçiciliği sağlamak amacıyla ampisilin antibiyotiğine direnç geni içermektedir.



a



b

Şekil 3.1. Kullanılan ifade vektörlerine ait harita görüntüleri.

a: pLV2R ifade vektörüne ait harita görüntüsü, b: pLV2R\_EGFP ifade vektörüne ait harita görüntüsü.

(V2R: AVPR2 geni, EGFP: GFP dizisi, AmpR: ampisilin direnç geni, V2R'nin 5' ucunda yer alan gri kutu HA işareti, 3' ucunda yer alan gri kutu FLAG işareti)

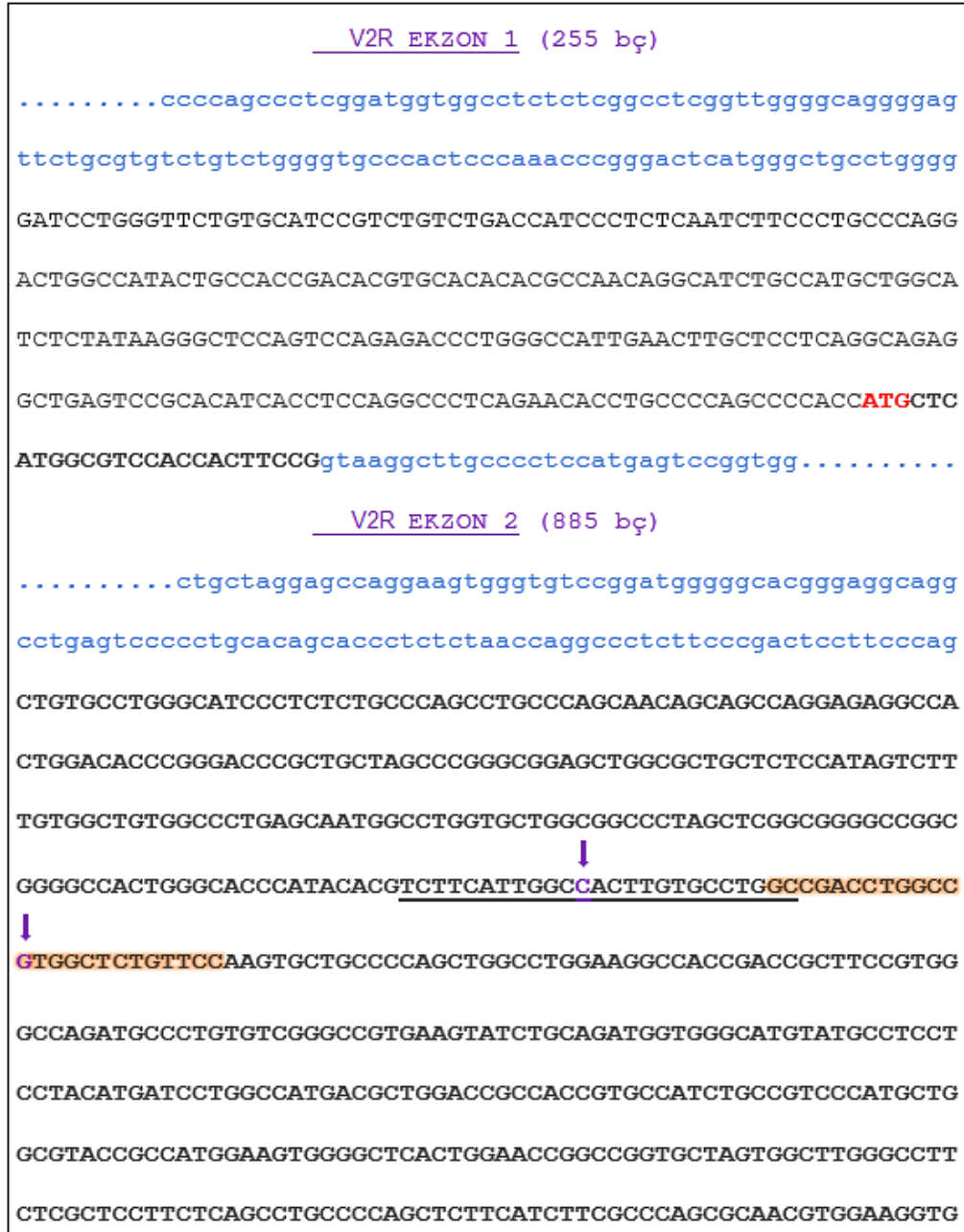
### 3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi Kullanılarak EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin Elde Edilmesi

EGFP ile işaretli ve işaretsiz mutant V2R gen dizilerini elde etmek amacıyla ilk olarak mutant nükleotidi içeren ve mutasyonun yer aldığı bölgeyi de kapsayan ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. PZR’de kullanılmak üzere ilgili mutasyona göre tasarlanan ileri ve geri primerler Çizelge 3.1 ile gösterilmiştir. İlgili mutasyonu oluşturmak amacıyla bu primerler kullanılarak iki ayrı PZR gerçekleştirilmelidir. Mutant bir V2R gen bölgesi elde etmek için; V2R geninin 5’ ucunda yer alan ileri primer (cozak-HA F) ile ilgili mutasyonu içine alan geri primer reaksiyona alınmıştır. Aynı şekilde, ilgili mutasyonu içine alan ileri primer ile V2R geninin 3’ ucunda yer alan geri primer (pL-FLAG R) kullanılarak ayrı bir reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Böylece mutasyonun olduğu noktayı içeren 5’ bölge ve 3’ bölge ayrı ayrı elde edilmiştir. Bir sonraki aşamada, bu iki ayrı reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, dış primerlerin kullanıldığı başka bir PZR sayesinde ilgili mutasyonu içeren tam bir V2R dizisi oluşturmayı sağlar.

Çizelge 3.1. Mutasyonları oluşturmak amacıyla tasarlanan primer dizileri (F: ileri primer dizisi, R: geri primer dizisi).

Primer adı	Primer dizisi
Cozak-HA F	5’-ccaccATGTACCCCTACGACGTC-3’
H80Y F	5’-TCTTCATTGGCtACTTGTGCCTGGC-3’
H80Y R	5’-GCCAGGCACAAGTaGCCAATGAAGA-3’
V88L F	5’-GCCGACCTGGCCtTGGCTCTGTTCC-3’
V88L R	5’-GGAACAGAGCCAaGGCCAGGTCGGC-3’
V215M F	5’-TGATGGTGTTCaTGGCACCTACCC-3’
V215M R	5’-GGGTAGGTGCCAtGAACACCATCA-3’
L219P F	5’-TGGCACCTACCCcGGGTATCGCCGC-3’
L219P R	5’-GCGGCGATACCCgGGGTAGGTGCCA-3’
pL-FLAG R	5’-TCATGTCTGGATCCACTAGTTCActtatcgtcatcgtc-3’

V2R geni üzerinde site-directed mutagenез yöntemi kullanılarak oluşturulan H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonları için tasarlanan primerlerin V2R gen dizisi üzerindeki yerleşimleri Şekil 3.2’de, pLV2R ve pLV2R\_EGFP ifade vektörleri üzerindeki yerleşimleri Şekil 3.3’te, gen dizisi üzerindeki şematik gösterimleri ise Şekil 3.4’te verilmiştir.

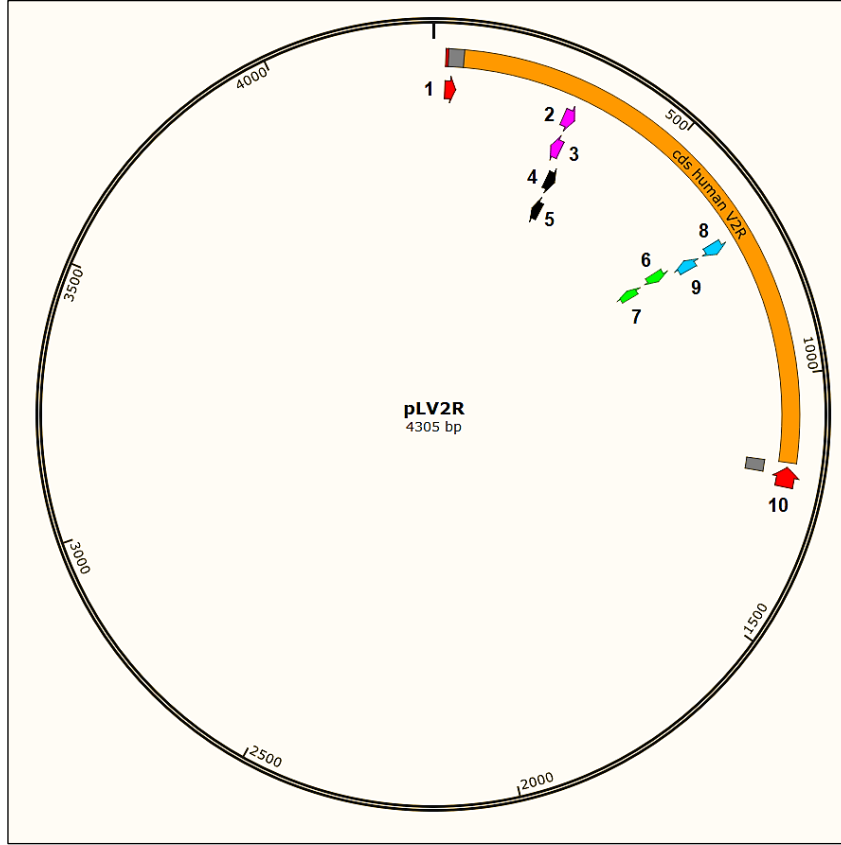


```

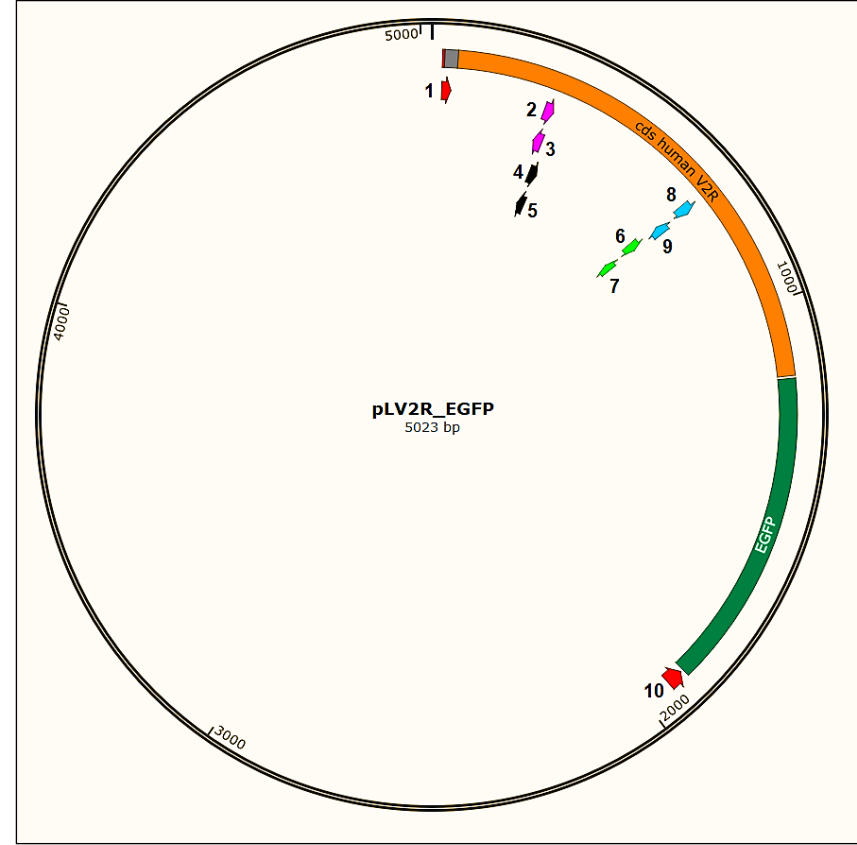
GCAGCGGGGTCACTGACTGCTGGGCCTGCTTTGCGGAGCCCTGGGGCCGTCGCACCTAT
GTCACCTGGATTGCCCTGATGGTGTTCGTGGCACCTACCCGGGTATCGCCGCCTGCCA
GGTGCTCATCTTCCGGGAGATTCATGCCAGTCTGGTGCCAGGGCCATCAGAGAGGCCTG
GGGGGCGCCGCAGGGGACGCCGGACAGGCAGCCCCGGTGAGGGAGCCCACGTGTCAGCA
GCTGTGGCCAAGACTGTGAGGATGACGCTAGTGATTGTGGTCTGTCTATGTGCTGTGCTG
GGCACCTTCTTCTGCTGCAGCTGTGGGCCGCTGGGACCCGGAGGCACCTCTGGAAG
gtgggtgtagccgtggctagggctgacggggccacttgggcttggccgcatgccctgt
gccccaccagccatcctgaaccaacctagatcctccacctccacagg.....
      V2R EKZON 3 (664 bç)
.....gtgccccaccagccatcctgaaccaacctagatcctccacctccacag
GGGCGCCCTTTGTGCTACTCATGTTGCTGGCCAGCCTCAACAGCTGCACCAACCCCTGG
ATCTATGCATCTTTCAGCAGCAGCGTGTCTCAGAGCTGCGAAGCTTGCTCTGCTGTGC
CCGGGGACGCACCCACCCAGCCTGGGTCCCAAGATGAGTCCTGCACCACCGCCAGCT
CCTCCCTGGCCAAGGACACTTCATCGTAGGAGCTGTTGGGTGTCTTGCCTCTAGAGGC
TTTGAGAAGCTCAGCTGCCTTCTGCGGCTGGTCTGCGGAGCCACTGGGAGGGGGACCC
GTGGAGAATTGGCCAGAGCCTGTGGCCCCGAGGCTGGGACACTGTGTGGCCCTGGACAA
GCCACAGCCCCTGCCTGGGTCTCCACATCCCAGCTGTATGAGGAGAGCTTCAGGCCCC
AGGACTGTGGGGGCCCCCTCAGGTCAGCTCACTGAGCTGGGTGTAGGAGGGGCTGCAGCA
GAGGCCTGAGGAGTGGCAGGAAAGAGGGAGCAGGTGCCCCAGGTGAGACAGCGGTCCC
AGGGGCCTGAAAAGGAAGGACCAGGCTGGGGCCAGGGACCTTCTGTCTCCGCCTTTC
TAATCCCTCCCTCCTCATTTCTCTCCCTAATAAAAAATTGGAGCTCATTTTCCACATGGCA
AGGGGTCTCCTTGGAatccgggtaacgggtgggtgtggaggcagcacagagacatacacag
actccccacacacacccacagtcacgtgcacagctctggaatccatggc.....

```

Şekil 3.2. Her bir mutasyon için tasarlanan primerlerin V2R dizisi üzerindeki yerleşimleri. Başlangıç ve bitiş kodonları kırmızı renk ile, intronik bağlantı bölgeleri ise mavi renk ile gösterilmiştir. Mor renkli oklarla işaretlenmiş yerler ise sırasıyla H80Y (CAC → TAC), V88L (GTG → TTG), V215M (GTG → ATG) ve L219P (CTG → CCG) mutasyonlarını göstermektedir. [55] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.



a



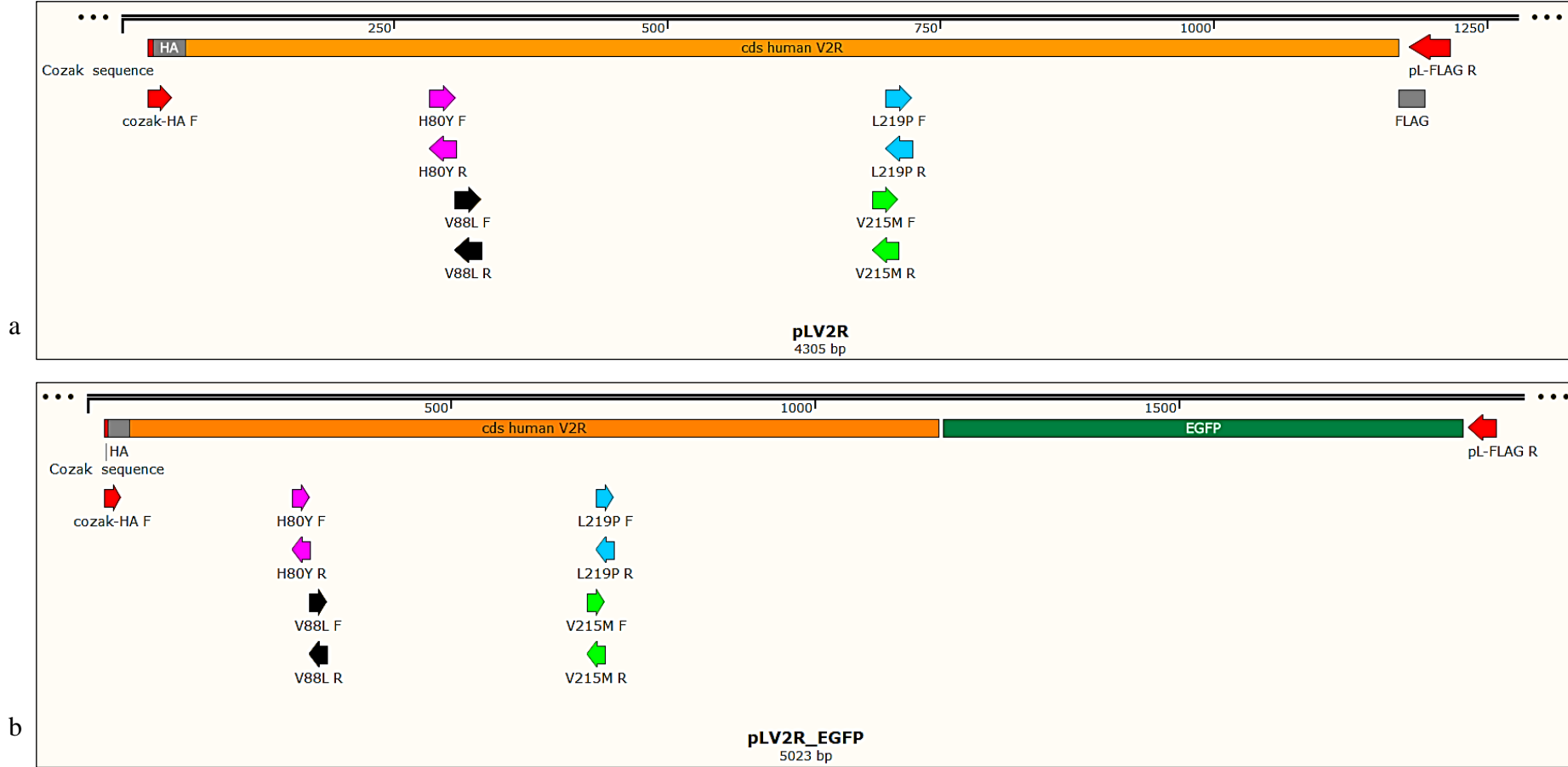
b

Şekil 3.3. Tasarlanan primerlerin ifade vektörleri üzerindeki yerleşimleri.

a: pLV2R vektörüne ait harita görüntüsü üzerindeki yerleşimleri, b: pLV2R\_EGFP vektörüne ait harita görüntüsü üzerindeki yerleşimleri.

(V2R: *AVPR2* geni, EGFP: GFP dizisi, F: ileri primer dizisi, R: geri primer dizisi)

(Dizi üzerinde numaralandırılan primerler sırasıyla; 1: cozak-HA F, 2: H80Y F, 3: H80Y R, 4: V88L F, 5: V88L R, 6: V215M F, 7: V215M R, 8: L219P F, 9: L219P R, 10: pL-FLAG R)



Şekil 3.4. Tasarlanan primerlerin *V2R* dizisi üzerindeki şematik gösterimi.

a: pLV2R vektöründeki *V2R* dizisi üzerindeki yerleşimleri, b: pLV2R\_EGFP vektöründeki *V2R* dizisi üzerindeki yerleşimleri.

(*V2R*: *AVPR2* geni, EGFP: GFP dizisi, F: ileri primer dizisi, R: geri primer dizisi)



Mutasyonları oluşturmak üzere her iki bölge için de gerçekleştirilen PZR bileşenleri Çizelge 3.2’de, PZR koşulu ise Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.2. PZR bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılan miktar
400 ng/μl DNA (pLV2R veya pLV2R_EGFP ifade vektörü)	2 μl
5X MyTaq™ tampon (Bioline)	5 μl
Dış ileri primer veya dış geri primer (10 μM)	1 μl
İlgili mutasyonun ileri primeri veya ilgili mutasyonun geri primeri (10 μM)	1 μl
MyTaq™ DNA polimeraz (Bioline) (5 U/μl)	0,5 μl
Steril distile su	15,5 μl
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 μl</b>

Çizelge 3.3. PZR koşulu.

Reaksiyon koşulu	
95°C	1 dakika
95°C	15 saniye
60°C	15 saniye
72°C	30 saniye
72°C	1 dakika
10°C	∞

30 döngü

PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jelde doğrulanan PZR ürünleri Invisorb® Fragment CleanUp kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Böylece birleşme reaksiyonunda kullanılacak olan kısa PZR ürünleri olan PZR ürünü 1 ve PZR ürünü 2 elde edilmiştir. PZR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan deneysel yöntem aşağıda verildiği gibidir.

1. PZR ürünlerinin üzerine 250 µl Bağlanma Tamponu eklenmiştir ve pipetlenerek iyice karıştırılmıştır.
2. Kolonlar toplama tüplerine yerleştirilmiştir ve örneklerin tamamı kolonlara aktarılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
3. 13.000 rpm'de 4 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
4. Kolonlar dikkatli bir şekilde yeni 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır.
5. Kolonların merkezine en az 10 µl Elüsyon Tamponu eklenmiştir ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
6. 11.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
7. Kolonlar çıkartılmıştır ve DNA -20°C'de saklanmıştır.

Ardından mutant *V2R* gen bölgesinin tamamını oluşturmak amacıyla her iki PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak *V2R* geninin 5' ucunda yer alan ileri primer (cozak-HA F), 3' ucunda yer alan geri primer (pL-FLAG R) ve Phusion High-Fidelity (HF) Master Karışım (New England Biolabs®) ile reaksiyona alınmıştır. Phusion DNA Polimeraz enziminin hata oranı *Taq* DNA Polimeraz enzimine göre 50 kat daha düşüktür. Bu nedenle, uzun ve zor amplifikasyonları gerçekleştirmek amacıyla kullanılır. Phusion Master Karışım içeriğinde Phusion DNA Polimeraz, deoksiribonükleotitler ve reaksiyon tamponu yer almaktadır. Gerçekleştirilen reaksiyona ait bileşenler Çizelge 3.4'te, reaksiyonunun koşulu ise Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Füzyon PZR bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılan miktar
DNA kalıbı (PZR ürünü 1)	2 µl
DNA kalıbı (PZR ürünü 2)	2 µl
Dış ileri primer (cozak-HA F) (10 µM)	1 µl
Dış geri primer (pL-FLAG R) (10 µM)	1 µl
2X Phusion High-Fidelity Master Karışım	25 µl
DMSO (%100)	1,5 µl
Steril distile su	17,5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

Çizelge 3.5. Füzyon PZR koşulu.

Reaksiyon koşulu	
98°C	30 saniye
98°C	10 saniye
60°C	30 saniye
72°C	1 dakika
72°C	10 dakika
10°C	∞

} 34 döngü

Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Doğrulanmış mutant diziyi içeren V2R ürünleri Invisorb® Fragment CleanUp kiti kullanılarak jelden saflaştırılmıştır. Uygulanan kit yöntemi aşağıda verildiği gibidir.

1. İstenilen ürünü içeren bant bölgeleri %0,8-2'lik agaroz jelden kesilerek alınmıştır ve 2 ml'lik tüplere konulmuştur. Ağırlıkları kontrol edilmiştir.
2. 150 mg'a kadar olan jel parçaları için 500 µl Jel Çözücü S, 150 mg-300 mg arasında olan jel parçaları için 1 ml Jel Çözücü S eklenmiştir.
3. Agaroz jel parçaları tamamen çözünene kadar 50°C'de 10 dakika vorteksenerek inkübe edilmiştir.
4. 500 µl reaksiyon hacmine 250 µl Bağlanma Arttırıcı Solüsyon, 1 ml reaksiyon hacmine 500 µl Bağlanma Arttırıcı Solüsyon eklenmiştir ve süspansiyon pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
5. Kolonlar toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
6. Kolonların üzerine 800 µl örnek aktarılmıştır ve 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Altta kalan süzüntüler uzaklaştırılmıştır. Eğer hacim 800 µl'den fazla ise kalan örnekler kolona yeniden aktarılmıştır ve santrifüj basamağı tekrarlanmıştır.
7. Kolonlara 500 µl Yıkama Solüsyonu (etanol eklenmiş) ilave edilmiştir. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Altta kalan süzüntü uzaklaştırılmıştır.
8. Kalan etanolü uzaklaştırmak amacıyla 13.000 rpm'de 4 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır.

9. Kolonlar yeni 1,5 ml'lik tüplere yerleştirilmiştir. En az 20 µl olacak şekilde Elüsyon Tamponu eklenmiştir.
10. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon sağlanmıştır. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir.
11. Kolonlar çıkartılmıştır ve DNA -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.2. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin ve Vektörlerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi

Elde edilen EGFP içeren mutant V2R dizileri pLV2R\_EGFP vektörü içerisine, EGFP içermeyen mutant V2R dizileri ise pLV2R vektörü içerisine *AatII* ve *SpeI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak aktarılmıştır. Hem vektörlerin hem de mutant PZR ürünlerinin (insert) *AatII* ve *SpeI* enzimleri ile kesim reaksiyonları Çizelge 3.6'da belirtildiği gibi hazırlanmıştır ve 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.6. Vektör ve insert dizilerine ait enzim kesimi içerikleri.

Enzim kesimi içerikleri	Vektör (pLV2R veya pLV2R_EGFP)	İnsert (Mutant V2R dizileri)
DNA	7 µl	43 µl
10X Cut Smart Tampon (NEB®)	5 µl	5 µl
5 U/µl <i>AatII</i> (NEB®)	0,5 µl	0,5 µl
5 U/µl <i>SpeI</i> (NEB®)	0,5 µl	0,5 µl
1 U/µl FAST Alkalın Fosfataz	1 µl	-
Steril distile su	35 µl	-
<b>Toplam hacim</b>	50 µl	50 µl

Kesim işleminin ardından enzim inaktivasyonunu sağlamak amacıyla kesim ürünleri 80°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler %1'lik agaroz jele yüklenerek yürütülmüştür. Doğrulanmış kesim ürünü bantları jelden kesilerek alınmış ve Invisorb® Fragment CleanUp kiti kullanılarak jelden saflaştırılmıştır. Jelden saflaştırma yöntemi sayfa 27'de anlatılmıştır.

### 3.2.3. Kesim Reaksiyonu Sonrası Vektörler ile İnsert Dizilerin Ligasyonu

Kesim reaksiyonuna tabi tutulan vektör ile her bir mutanta ait insert dizileri Çizelge 3.7’de belirtildiği gibi ligasyon reaksiyonuna sokulmuştur. Ligasyon, oda ısısında 15-20 dakika boyunca inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılan miktar
10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Thermo Fisher Scientific)	2 µl
5 U/µl T4 DNA Ligaz (Thermo Fisher Scientific)	1 µl
Vektör (pLV2R veya pLV2R_EGFP vektör kesim ürünü)	1 µl
İnsert (Mutant V2R dizisi kesim ürünü)	16 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

Ligasyon işleminin ardından her bir örnek *E.coli* bakteri hücrelerine transforme edilmiştir.

### 3.3. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin *E.coli* (DH5a) Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesi

İlgili ifade vektörleri *E. coli* (DH5a) hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon için kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Transforme edilmek istenen ligasyon ürünlerinin tamamı, 100 µl *E.coli* (DH5a) kompetan hücrelerine eklenmiştir ve iyice pipetlenerek karıştırılmıştır.
2. 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
3. 42°C’de 45 saniye süresince ısı şokuna uğratılmıştır.
4. Örnekler tekrar buz üzerine alınarak 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
5. Örneklerin üzerine 250 µl besin açısından zenginleştirilmiş olan Super Optimal Broth (SOC) besiyeri eklenmiştir.
6. 1 saat boyunca 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonrası örnekler ampisilinli LB agar plaklarına ekilmiştir ve gece boyu inkübasyona bırakılarak çoğaltılmışlardır.

pLV2R ve pLV2R\_EGFP ifade vektörlerinde seçici olarak ampisiline direnç geni bulunduğundan dolayı LB agar plakları hazırlanırken besiyerine 75 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde ampisilin antibiyotiği eklenmiştir.

### **3.4. Elde Edilen Kolonilerden Koloni PZR Yapılması**

Ampisilinli LB agar plaklarında üreyen bakterilerden tek bir koloni seçilerek 100 µl'lik ampisilinli LB broth besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekimin ardından örnekler 37°C'lik çalkalamalı etüvde 2 saatlik inkübasyona bırakılarak çoğaltılmışlardır. İnkübasyonun ardından elde edilen bakteri kültürlerinin kalıp DNA olarak kullanıldığı koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR uzun amplifikasyonları gerçekleştirmek amacıyla tercih edilen Phusion Master Karışım ile gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen reaksiyona ait bileşenler Çizelge 3.4'te, reaksiyonunun koşulu ise Çizelge 3.5'te verildiği gibidir. Yapılan koloni PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir ve doğrulanan PZR ürünlerinin pürifikasyonunun yapılması aşamasına geçilmiştir. Ayrıca PZR ürünleri agaroz jelde kontrol edildikten sonra çoğaltılmalarını sağlamak amacıyla 100 µl ampisilinli LB broth besiyerindeki bakteri kültürlerinden 2ml'lik ampisilinli LB broth besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekimin ardından gece boyu inkübasyona bırakılarak çoğaltılmışlardır.

### **3.5. Elde Edilen Bakteri Kültüründen Plazmid DNA'sının İzolasyonu**

Ertesi gün 2 ml'lik ampisilinli LB broth besiyerinde hazırlanan bakteri kültürlerinden Invisorb® Spin Plasmid Mini Two kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kit yöntemi aşağıda verilmiştir.

1. Gecelik bakteri kültürleri 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
2. Örnekler 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatantlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
4. Peletlerin üzerine 250 µl Solüsyon A eklenmiştir ve pipetlenerek veya vortekslenerek iyice karıştırılmıştır.
5. 250 µl Solüsyon B ilave edilmiştir. Tüpler 5 kez alt üst edilerek dikkatlice karıştırılmıştır. Bu aşamanın 5 dakikadan daha uzun sürmemesine dikkat edilmiştir.
6. 250 µl Solüsyon C eklenmiştir. Tüp 4-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır, vorteks yapılmamıştır.
7. Örnekler 13.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sırasında kolonlar toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
8. Süpernatantlar kolonlara aktarılmıştır. 1 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.

9. 11.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Süzüntüler uzaklaştırılmıştır.
10. Kolonların üzerine 750 µl Yıkama Solüsyonu (etanol eklenmiş) konulmuştur.
11. Örnekler 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süzüntü uzaklaştırılmıştır.
12. Kalan etanolü uzaklaştırmak amacıyla örnekler 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Kolonlar yeni 1,5 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
14. Kolonların ortasına 50-100 µl Elüsyon Tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
15. 11.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj gerçekleştirilmiştir.
16. Kolonlar çıkartılmıştır ve DNA -20°C'de saklanmıştır.

Böylece mutant *V2R* dizisini içeren plazmidlerden fazla miktarda elde edilmiştir.

### **3.6. Oluşturulan EGFP Dizisi ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant *V2R* Gen Dizilerinin DNA Dizileme Yöntemi Kullanılarak Doğrulanması**

Plazmid DNA'larının içerisinde bulunan mutant *V2R* gen dizilimi ve istenilen mutasyon dışında başka bir mutasyonun oluşup oluşmadığı Sanger DNA dizileme yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda agaroz jelde kontrol edilen koloni PZR ürünlerinin temizlenmesini sağlayan pürifikasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından örnekler -20°C'de saklanabilmektedir. PZR pürifikasyonu için gerekli olan reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.8'de, reaksiyon koşulu ise Çizelge 3.9'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.8. PZR pürifikasyonu bileşenleri.

<b>Reaksiyon bileşenleri</b>	<b>Kullanılan miktar</b>
PZR ürünü	4 µl
Ekzonükleaz I NEB® (10 U/µl)	0,2 µl
Shrimp Alkalen Fosfataz NEB® (2 U/µl)	0,4 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>4,6 µl</b>

Çizelge 3.9. PZR pürifikasyonu koşulu.

Reaksiyon koşulu	
37°C	20 dakika
80°C	20 dakika
95°C	2 dakika

Temizlenen örnekler sekans reaksiyonuna alınmıştır. Sekans reaksiyonu için BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Sekans reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.10’de, reaksiyon koşulu ise Çizelge 3.11’te verilmiştir.

Çizelge 3.10. Sekans reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılan miktar
Temizlenmiş PZR ürünü	1,5 µl
BigDye Master Mix	0,6 µl
10X BigDye sekans tamponu	0,95 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
Steril distile su	6,45 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µl</b>

Çizelge 3.11. Sekans reaksiyonu koşulu.

Reaksiyon koşulu	
96°C	1 dakika
96°C	10 saniye
50°C	5 saniye
60°C	60 dakika
10°C	∞

} 24 döngü



Sekans reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin temizlenmesi için sekans pürifikasyonu yapılmıştır. Uygulanan yöntem aşağıdaki gibidir.

1. Her bir örnek tüpü içerisine 2 µl 3M Sodyum Asetat eklenmiştir.
2. 50 µl soğutulmuş %100'lük etanol ilave edilmiştir. Örnekler iyice karıştırılarak 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır.
3. Tüpler -20°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonrası 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmıştır.
5. Üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
6. Pelet üzerine 250 µl soğutulmuş %70'lik etanol eklenmiştir.
7. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirmiştir.
8. Üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
9. Pelet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
10. Etanol'ün tamamen uzaklaştığından emin olduktan sonra pelet 20 µl formamid ile çözdürülmüştür ve vortekslenmiştir.
11. Spin edilerek sekans tüplerine alınmıştır.
12. Örnekler 95°C'de 5 dakika boyunca denatüre edilmiştir.
13. Denatürasyon sonrası -20°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir.
14. Hazırlanan örnekler Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzer cihazına yüklenmiştir ve kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

DNA dizileme yöntemi kullanılarak kontrolü sağlanan EGFP ile işaretli ve işaretsiz mutant *V2R* gen dizilerini içeren plazmid DNA'ları, fonksiyon analizlerinin başlangıcını oluşturan transfeksiyon işlemlerinde kullanılmıştır.

### **3.7. EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Yabancıl Tip ve Mutant *V2R* Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonu**

EGFP dizisi ile işaretli ve işaretsiz yabancıl tip ve mutant *V2R* gen dizisini içeren ifade vektörleri transfeksiyon yöntemi kullanılarak COS-7 (ATCC® CRL-1651™) hücrelerine aktarılmıştır. Bu tez çalışmasında COS-7 hücre hattının kullanılmasının sebebi bu hücre hattının fonksiyon analizi çalışmalarında sıklıkla tercih edilmesidir. COS-7 hücre hattı maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek dokusundan alınıp farklılaştırılmıştır ve içerisinde maymuna ait *V2R* geni bulunmaktadır. Maymun *V2R* geninin meydana getirdiği 254 amino asit uzunluğundaki bu reseptör, insan *V2R* geninin meydana getirdiği

371 amino asit uzunluğundaki reseptör ile %97 oranında benzerlik göstermektedir (Şekil 3.5). COS-7 hücreleri morfolojik olarak fibroblast benzeri bir yapıdadır. Ayrıca bu hücre hattı yüzeye tutunma (adherent), hızlı üreme ve yüksek transfeksiyon etkinliği özellikleri göstermektedir. COS kısaltması, orijini CV-1 hücresi olan ve T antijenini kodlayan SV40 genetik materyali taşıyan anlamına gelmektedir.

1	MLMASTTSVAVPGHPSLPSLPSNSSQERPLDTRDPLLRARAEALLSIVFVAVALSNGLVLAALARRGRRGHWAPIHVFIGH	80	insan
1	-----PIHVFIGH	8	maymun
81	LCLADLAVALFQVLPQLAWKATDRFRGPDALCRAVKYLMVGMVYASSYMIAMTLDRHRAICRPMLAYRHGSGAHWNRPV	160	insan
9	LCLADLAVALFQVLPQLAWKATDRFRGPDALCRAVKYLMVGMVYASSYMIAMTLDRHRAICRPMLAYRHGGGAHWNRPV	88	maymun
161	LVAWAFSLLLSLPQLFIFAQRNVEGGSGVTDWCWACFAEPWGRRTYVTWIALMVFVAPT LGIAACQVLI FRIH ASLVPGP	240	insan
89	LVAWAFSLLLSLPQLFIFAQRNVGGSGVTDWCWASFVEPWGRRTYVTWIALMVFVAPT LGIAACQVLI FRIH TSLVPGP	168	maymun
241	SERPGRRRRRRTGSPGEGAHVSAAVAKTVRMTLVIVVVVYLCWAPFFLVQLWAANDPEAPLEGAPFVLLMLLASLNSCT	320	insan
169	SERPGRRRRRRTGNPSEGARVSAAVAKTVRMTLVIVVVVYLCWAPFFLVQLWAANDPEAPLEGAPFVLLMLLASLNSCT	248	maymun
321	NPWIYASFSSSVSSELRSLCCARGRTPPSLGPQDESCCTASSSLAKDTSS	371	insan
249	NPWIYA-----	254	maymun

Şekil 3.5. İnsan ve maymun V2 reseptörü homolojisi. [56] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

### 3.7.1. COS-7 Hücre Hattının Üretilmesi

COS-7 hücreleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco™) besiyeri içerisinde 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda üretilmiştir. Bu hücreler, ihtiyaç duyulan hücre miktarına göre 25 cm<sup>2</sup> veya 75 cm<sup>2</sup> lik hücre kültür kaplarında belirtilen koşullarda 3 gün inkübe edilerek çoğaltılmıştır.

### 3.7.2. COS-7 Hücre Hattının Pasajlanarak Devamlılığının Sağlanması

COS-7 hücreleri; kanser hücreleri dışındaki diğer hücreler gibi temas halinde olduklarında ve üremeleri için yeterli alan kalmadığında hücre proliferasyonunu durdurma eğilimi gösterirler. Bu nedenle pasajlama işleminin yapılması gerekmektedir. Pasajlama işlemine başlamadan önce hücrelerin buldukları kültür kabının yüzeyini kaplama (konfluent olma) durumları ışık mikroskobu ile belirlenmiştir. %80-95 oranında konfluent olan hücrelerin pasajlanması verilen deneysel yöntem izlenerek yapılmıştır.

1. Konfluent olan hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla ilk olarak ortamdaki besiyeri hücrelerin zarar görmemesine dikkat edilerek uzaklaştırılmıştır.
2. 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı için 3 ml 1X DPBS, (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı için 6 ml 1X DPBS eklenmiştir. Hücrelere zarar vermemek amacıyla hücre yüzeyine direkt bırakılmamasına dikkat edilmiştir.
3. Ortamdaki 1X DPBS uzaklaştırılmıştır. Böylece ölü hücreler ve besiyeri artıkları ortamdaki arındırılmıştır.
4. Hücrelerin yüzeyden kalkması için 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına 0,5 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına ise 1 ml %0,25 Tripsin-EDTA eklenmiştir. EDTA, aktiviteyi arttırmak, hücre yüzeyinden kalsiyum ve magnezyumu çıkarmak için ayrıca hücrelerin birbirlerine yapışmasını önlemek için tripsin solüsyonlarına eklenir.
5. Tripsin-EDTA'nın kültür kabı yüzeyine yayılması sağlanmıştır ve 2 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelerin yüzeyden kalkma durumu kontrol edilmiştir. Kısa inkübasyon süresi hücrelerin kalkması için yeterli olamazken, uzun inkübasyon süresi hücrelerin Tripsin-EDTA'dan zarar görmesine neden olur. Bu nedenle inkübasyon süresi önemlidir.
6. Bu sırada yeni bir kültür kabı alınarak üzerine yeni pasaj numarası, pasajlama işleminin tarihi, pasajı yapan kişinin adı, hücrenin ismi yazılmıştır ve 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı için 4,5 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı için 13,5 ml DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) konulmuştur.
7. Hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandıktan sonra Tripsin-EDTA'nın etkisini nötralize etmek amacıyla 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına 5 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına ise 15 ml DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenmiştir.
8. Hücreler, besiyerinin aşırı köpürmemesine özen gösterilerek pipetlenmiş ve homojen hale getirilmiştir.
9. 1 ml besiyerindeki hücre sayısı Thoma camı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sayı, deneye göre istenilen hücre sayısının hesaplanmasında kullanılmıştır.
10. Uygun miktarda DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenerek hazırlanan 25 cm<sup>2</sup>'lik yeni kültür kabına 0,5 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına ise 1,5 ml hücre karışımından eklenmiştir.
11. Hazırlanan yeni kültür kapları ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.7.3. Transfeksiyon için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması

Yapılacak deneye göre gerekli olan hücre sayısı konsantrasyonunu elde etmek amacıyla Thoma camı kullanılarak sayısı hesaplanan hücreler ile DMEM besiyeri (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) uygun miktarlarda süspansiyon edilmiştir. Elde edilen hücreler, ilgili deneye göre kuyucuklara ekilmiştir. Transfeksiyon işleminin yapılabilmesi için, hücrelerin kuyucuk içerisinde sağlıklı görünmesi, homojen olarak dağılmış olması ve %80-95 oranında konfluent olması gerekmektedir. O nedenle transfeksiyon işlemine geçmeden önce bu şartların sağlanıp sağlanmadığı ertesi gün ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir.

Transfeksiyon; yabancı bir genin ökaryotik hücre içerisine aktarılmasını ve hücrenin genomu ile birleşmesi sonucunda hücrede genetik değişiklik oluşturulmasını sağlayan moleküler bir tekniktir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmalarında, hücre hatları ve transfekte edilmesi zor hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerin transfeksiyonu için ideal olan TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific) transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Bu transfeksiyon ajanı çeşitli hücre tiplerinde yüksek transfeksiyon verimliliği gösterir, kullanımı kolaydır, çoğu hücre hattında optimizasyon gerektirmez ve minimal derecede sitotoksikite gösterir. Her bir deney için uygulanan transfeksiyon yöntemleri Çizelge 3.12’te verilmiştir.

Çizelge 3.12. Deneysel çalışmalarda uygulanan transfeksiyon yöntemleri.

Deneysel çalışma	Hücre kültür kabı	Hücre sayısı (hücre/kuyu)	Transfeksiyon yöntemi		
			DNA	Transfeksiyon ajanı	Besiyeri (serumsuz)
Yüzey ELISA	48 kuyu	40.000	700 ng	0,7 µl	70 µl
Total ELISA	6 kuyu	400.000	250 ng	0,8 µl	12,5 µl
cAMP birikim testi	96 kuyu	15.000	400 ng	0,3 µl	40 µl
Floresan görüntüleme	48 kuyu	40.000	700 ng	0,7 µl	70 µl

### **3.7.4. Hazırlanan İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyon İşlemi**

Ekimi gerçekleştirilip ertesi gün kuyucuk içerisindeki homojenliği, sağlıklı ve konfluent olma koşulları kontrol edilen hücelere yabancı tip ve mutant ifade vektörleri deneylere uygun olarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyon etkinliğini kontrol edebilmek amacıyla arttırılmış yeşil floresan proteinini ifade eden pEGFP vektörünün de hücreye eş zamanlı transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işlemine ait yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Çizelge 3.12’de deneyler için belirtilen miktarda DNA, uygun miktarda serumsuz DMEM içerisinde pipetleme yapılarak çözdürülmüştür. Bu işlem her bir DNA için ayrı bir tüpte gerçekleştirilmiştir.
2. DNA-DMEM karışımı içerisinde Çizelge 3.12’de deneyler için belirtilen miktarda TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) eklenmiştir ve iyice pipetleme yapılmıştır. Her bir mutasyon için gerekli olan kuyucuk miktarına göre transfeksiyon karışımı hazırlanmıştır.
3. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
4. Hazırlanan DNA-DMEM-Turbofect™ karışımı homojen bir şekilde ve damlalar halinde hücrelerin üzerine nazikçe bırakılmıştır.
5. Hazırlanan kuyulu plaklar, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C’lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
6. Yabancı tip ve mutant DNA’ların, COS-7 hücrelerinde yabancı tip ve mutant V2R olarak ifade edilmesi için transfeksiyondan sonra 48-72 saat beklenmiştir ve transfeksiyon etkinliği EVOS FLoid Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) ile kontrol edilmiştir.

### **3.8. Yabancı Tip ve Mutant V2 Reseptörlerinin Hücre İçi ve Hücre Yüzeyindeki Miktarlarının Belirlenmesi**

Yabancı tip ve mutant V2R’leri transfeksiyonla içine alan ve bunları ifade eden COS-7 hücreleri içindeki ve yüzeyindeki reseptör ifadelerinin belirlenmesi amacıyla enzim-bağlı immünosorbent analiz (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) moleküler tekniği uygulanmıştır. Hücre yüzey ELISA çalışmalarında yabancı tip ve mutant V2 reseptörlerinin N ucunda yer alan HA işaretinden yararlanılmış olup total ELISA çalışmalarında ise hem N ucundaki HA işareti hem de C ucundaki FLAG işareti kullanılmıştır [49], [57], [58].

### **3.8.1. Hücre Yüzey ELISA Deneyi**

N ucunda HA-işareti taşıyan V2 reseptörlerinin hücre yüzeyindeki ifadeleri, hücre yüzey ELISA deneyi ile belirlenmiştir.

#### **3.8.1.1. Hücre Yüzey ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması**

Hücre yüzey ELISA deneyini uygulamak için COS-7 hücreleri aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

1. Thoma camı kullanılarak 1 ml besiyeri içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra istenilen konsantrasyonda hücre elde etmek için hücre süspansiyonuna DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenmiştir.
2. Hücre yüzey ELISA deneyi için COS-7 hücreleri 40.000 hücre/kuyu olacak şekilde 48 kuyulu plağa ekilmiştir.
3. 48 kuyulu plağa ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün transfeksiyon için kullanılmıştır.

#### **3.8.1.2. Hücre Yüzey ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu**

Hücre yüzey ELISA deneyini uygulamak için COS-7 hücrelerinin transfeksiyonu aşağıda verilen şekilde yapılmıştır.

1. 48 kuyulu plağa 40.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün ışık mikroskobu kullanılarak kontrol edilmiştir. Transfeksiyon için uygun şartların sağlandığı doğrulanmış ve transfeksiyon işlemine başlanmıştır.
2. 48 kuyulu plak için tek bir kuyuya;

70 µl serumsuz Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

700 ng DNA

0,7 µl Turbofect™ transfeksiyon ajanı eklenmiştir.

Bunun için, DMEM ile DNA bir tüpte pipetleme yapılarak hazırlanmıştır. Bu karışıma DNA eklenmiştir. DNA'nın transfeksiyon ajanı ile etkileşime girmesi için iyice pipetleme yapılmıştır. Her bir mutasyon için kaç tane kuyu kullanmak gerekiyorsa transfeksiyon karışımı ona göre hazırlanmıştır.

3. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin 20 dakikadan daha az veya çok olmamasına dikkat edilmiştir.

4. İnkübasyonun ardından transfeksiyon karışımı COS-7 hücrelerinin bulunduğu kuyulara eklenmiştir.
5. Yabancı tip ve mutant DNA'ların COS-7 hücrelerinde yabancı tip ve mutant V2 reseptörleri olarak ifade edilmesi için transfeksiyondan sonra 48-72 saat beklenmiştir.
6. Transfeksiyon etkinliği EVOS FLoid Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) ile kontrol edilmiştir.

### **3.8.1.3. Hücre Yüzey ELISA Deneyi**

Transfeksiyondan 72 saat sonra N ucunda HA-işareti taşıyan yabancı ve mutant V2 reseptörlerinin hücre yüzeyindeki ifade düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan hücre yüzey ELISA deneyi için izlenen deneysel yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Kuyulardaki besiyeri hücrelere zarar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
2. Hücreler 3 defa 200 µl 1X DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkanmıştır.
3. Hücreler 30 dakika boyunca %4 formaldehit içeren 250 µl 1X DPBS ile fikse edilmiştir.
4. 3 defa 200 µl 1X DPBS yıkanmıştır.
5. DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) ile 37°C'de 1 saat boyunca bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.
6. Hücreler 200 µl 1X DPBS ile yıkanmıştır.
7. 2 saat boyunca hücreler 100 µl peroksidaz işaretli monoklonal anti-HA antikor (3F10; Roche, 1:1000 oranında DMEM içerisinde seyreltilmiş) ile 37°C'de inkübe edilmiştir.
8. Bağlanmamış antikorun uzaklaştırmak amacıyla hücreler 200 µl 1X DPBS ile yıkanmıştır.
9. Substrat reaksiyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve o-Fenilendiamin (0,1 mol/L fosfat/sitrat tamponu, pH 5.0 içerisinde her birinden 2,5 mmol/L olacak şekilde) ile gerçekleştirilmiştir.
10. 15-30 dakikalık inkübasyon sonrası enzimatik reaksiyon 1 mol/L HCl ile durdurulmuştur ve renk oluşumu 492 nm'de EnSight™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer) kullanılarak ölçülmüştür.
11. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism Software programı ile analiz edilmiştir.

### **3.8.2. Hücre Total ELISA Deneyi**

N ucu HA işaretli, C ucu FLAG işaretli mutant V2 reseptörlerinin hücre içerisindeki toplam ifadesi ELISA deneyi ile belirlenmiştir.

#### **3.8.2.1. Hücre Total ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması**

Hücre total ELISA deneyini uygulamak için COS-7 hücreleri aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

1. Thoma camı kullanılarak 1 ml besiyeri içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra istenilen konsantrasyonda hücre elde etmek için hücre süspansiyonuna DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenmiştir.
2. Total ELISA deneyi için COS-7 hücreleri 400.000 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu plağa ekilmiştir.
3. 6 kuyulu plağa ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün transfeksiyon için kullanılmıştır.

#### **3.8.2.2. Hücre Total ELISA Deneyi için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu**

Total ELISA deneyini uygulamak için COS-7 hücrelerinin transfeksiyonu aşağıda verilen şekilde yapılmıştır.

1. 6 kuyulu plağa 400.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün ışık mikroskobu kullanılarak kontrol edilmiştir. Transfeksiyon için uygun şartların sağlandığı doğrulanmış ve transfeksiyon işlemine başlanmıştır.
2. 6 kuyulu plak için tek bir kuyuya;

12,5 µl serumsuz Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

250 ng DNA

0,8 µl Turbofect™ transfeksiyon ajanı eklenmiştir.

Bunun için, DMEM ile DNA bir tüpte pipetleme yapılarak hazırlanmıştır. Bu karışıma DNA eklenmiştir. DNA'nın transfeksiyon ajanı ile etkileşime girmesi için iyice pipetleme yapılmıştır. Her bir mutasyon için kaç tane kuyu kullanmak gerekiyorsa transfeksiyon karışımı ona göre hazırlanmıştır.

3. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin 20 dakikadan daha az veya çok olmamasına dikkat edilmiştir.
4. İnkübasyonun ardından transfeksiyon karışımı COS-7 hücrelerinin bulunduğu kuyulara eklenmiştir.



5. Yabancı tip ve mutant DNA'ların COS-7 hücrelerinde yabancı tip ve mutant V2 reseptörleri olarak ifade edilmesi için transfeksiyondan sonra 48-72 saat beklenmiştir.
6. Transfeksiyon etkinliği EVOS FLoid Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) ile kontrol edilmiştir.

### 3.8.2.3. Hücre Total ELISA Deneyi

Transfeksiyondan 72 saat sonra N ucu HA işaretli, C ucu FLAG işaretli yabancı ve mutant V2 reseptörlerinin hücre içindeki toplam ifadesi total ELISA deneyleri ile belirlenmiştir. İzlenen deneysel yöntem aşağıdaki gibidir.

1. Kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve hücreler 2 ml 1X DPBS ile yıkanmıştır.
2. 2 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek hücreler yüzeyden kazınmıştır ve 2 ml'lik tüpe aktararak 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Su uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin üzerine 150 µl lizis tamponu eklenmiştir.

#### Lizis tamponu

10 mM Tris/HCl, pH: 7,5

150 mM NaCl

1 mM DTT

1 mM EDTA

%1 Na-desoxycholate

%1 PMSF

0,2 mM NP-40

10 g/L aprotinin

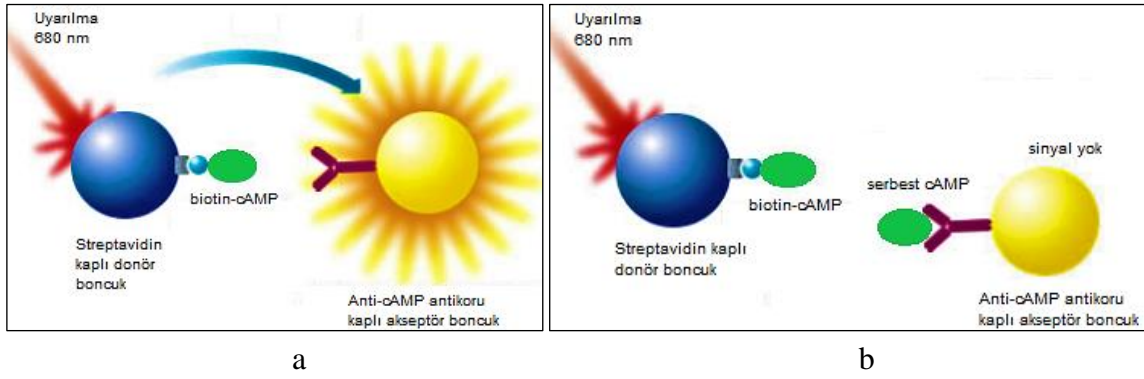
4. Gece boyunca 4°C'de rotasyon yaptırılarak inkübe edilmiştir. Buna ek olarak özel tabanla kaplı 96 kuyulu plağa 100 µl anti-FLAG antikor (1B10; Abbkine) eklenmiştir ve 5 dakika boyunca çalkalanmıştır. Ardından plak gece boyu 4°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ertesi sabah plak içeriği boşaltılarak 100 µl 1X PBS-T (%0.05 Tween-20 içeren 1X PBS) ile 3 defa yıkanmıştır.

6. Plağa 200 µl DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenmiştir ve 1 saat boyunca 37°C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir.
7. Plak 1X PBS-T ile 3 defa yıkanmıştır.
8. Rotasyondan alınan hücelere 300 µl 1X PBS-T eklenmiştir ve iyice çözümleri sağlanmıştır. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde kuyulara 100 µl örnek eklenmiştir.
9. Plak 2 saat boyunca 37°C'de çalkanarak inkübe edilmiştir.
10. Hücreler 1X PBS-T ile 3 defa yıkanmıştır.
11. 100 µl peroksidaz işaretli anti-HA antikor (3F10; Roche, %10 FBS içeren DMEM içerisinde 1:1000 konsantrasyonda olacak şekilde) eklenmiştir. 1 saat boyunca 37°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.
12. Bağlanmamış antikorunu uzaklaştırmak amacıyla hücreler 1X PBS-T ile 3 defa yıkanmıştır.
13. 150 µl substrat solüsyonu (0,1 mol/L fosfat/sitrat tamponu, pH: 5.0 içerisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve o-Fenilendiamin 2,5 mmol/L olacak şekilde) eklenmiştir. 15-25 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.
14. Reaksiyonu durdurmak için 50 µl 1M HCl eklenmiştir.
15. Ölçüm 492 nm'de EnSight™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer) kullanılarak ölçülmüştür.
16. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism Software programı ile analiz edilmiştir.

### **3.9. Mutant V2 Reseptörlerini İfade Eden COS-7 Hücrelerinin AVP ile Uyarılması Sonucu Cevap Olarak Sentezlenen cAMP Düzeylerinin cAMP Birikim Testi ile Belirlenmesi**

cAMP (3'-5'-siklik adenozin monofosfat) en önemli ikinci habercilerden biridir. Bu tez çalışmasından ayrı olarak proje kapsamında grubumuz tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, AVP ile uyarılan yabancıl tip ve mutant V2 reseptörlerini içeren hücrelerdeki cAMP miktarı AlphaScreen® cAMP Assay Kit (PerkinElmer) ile belirlenmiştir. Bu kitin çalışma prensibi G protein bağlı reseptörler (GPCR'ler) tarafından adenilat siklaz (AC) aktivitesindeki değişimlere ve bu değişimlere cevap olarak üretilen cAMP miktarlarının ölçülmesine dayanır. Hücre tarafından üretilen cAMP ile ortama dışarıdan eklenen biotin işaretli cAMP (biotin-cAMP) arasındaki yarış bu yöntemin temelini oluşturur. Bu yöntemde, ortamdaki cAMP ister hücre tarafından üretilmiş cAMP

olsun ister dışarıdan eklenen biotin-cAMP olsun streptavidin kaplı donör boncuk tarafından yakalanır ve anti-cAMP monoklonal antikor (mAb) kaplı akseptör boncuğa bağlanır. Anti-cAMP antikorunu, biotin-cAMP'ye bağlandığında donör ve akseptör boncukları birbirine yakın hale getirir ve 680 nm'de uyarılma sonucu donör boncuklar tarafından enerji transferi gerçekleştirilir. Bunun sonucunda akseptör boncuk ışımaya yapar. Serbest cAMP'nin yokluğunda maksimum sinyal elde edilir. Hücreler uyarıldığında ve serbest cAMP üretildiğinde ise akseptör boncuklara bağlanmak için serbest cAMP ile biotin-cAMP yarışa girer. Yarışı serbest cAMP kazanır. Sonuçta akseptör boncuğa bağlı olan hücrenin ürettiği cAMP, donör boncuk tarafından yakalanamayacağı için boncuklar arası uzaklık artar ve akseptör boncuk tarafından meydana gelen ışımaya azalır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. AlphaScreen® cAMP Assay Kit prensibi.

a: Serbest cAMP yokluğundaki reaksiyon şeması, b: Serbest cAMP varlığındaki reaksiyon şeması. [59] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır.

### 3.9.1. cAMP Birikim Testi için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması

cAMP birikim testini uygulamak için COS-7 hücreleri aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

1. Thoma camı kullanılarak 1 ml besiyeri içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra istenilen konsantrasyonda hücre elde etmek için hücre süspansiyonuna DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenmiştir.
2. cAMP birikim testi için COS-7 hücreleri 15.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plağa ekilmiştir.
3. 96 kuyulu plağa ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün transfeksiyon için kullanılmıştır.

### 3.9.2. cAMP Birikim Testi için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu

cAMP birikim testini uygulamak için COS-7 hücrelerinin transfeksiyonu aşağıda verilen şekilde yapılmıştır.

1. 96 kuyulu plağa 15.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün ışık mikroskobu kullanılarak kontrol edilmiştir. Transfeksiyon için uygun şartların sağlandığı doğrulanmış ve transfeksiyon işlemine başlanmıştır.

2. 96 kuyulu plak için tek bir kuyuya;

40 µl serumsuz Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

400 ng DNA

0,3 µl Turbofect™ transfeksiyon ajanı eklenmiştir.

Bunun için, Turbofect™ ile DNA bir tüpte pipetleme yapılarak hazırlanmıştır. Bu karışıma DNA eklenmiştir. DNA'nın transfeksiyon ajanı ile etkileşime girmesi için iyice pipetleme yapılmıştır. Her bir mutasyon için kaç tane kuyu kullanmak gerekiyorsa transfeksiyon karışımı ona göre hazırlanmıştır.

3. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin 20 dakikadan daha az veya çok olmamasına dikkat edilmiştir.
4. İnkübasyonun ardından transfeksiyon karışımı COS-7 hücrelerinin bulunduğu kuyulara eklenmiştir.
5. Yabancı tip ve mutant DNA'ların COS-7 hücrelerinde yabancı tip ve mutant V2 reseptörleri olarak ifade edilmesi için transfeksiyondan sonra 48-72 saat beklenmiştir.
6. Transfeksiyon etkinliği EVOS FLoid Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) ile kontrol edilmiştir.

### 3.9.3. Yabancı Tip ve Mutant V2 Reseptörlerini İçeren COS-7 Hücrelerinin AVP ile Uyarılması

Yabancı tip ve mutant V2R'leri transfeksiyonla içine alan ve bunları reseptör olarak ifade eden COS-7 hücrelerindeki cAMP birikimini ölçmek için hücreler AVP ile uyarılmıştır. Yabancı tip ve mutant V2 reseptörlerini içeren COS-7 hücrelerinin hangi AVP konsantrasyonunda ne kadar cAMP ürettiğini bulmak için 100 pM ile 10 µM aralığında 7 farklı AVP konsantrasyonu kullanılmıştır.

AVP ile uyarma işlemleri bu tez çalışmasından ayrı olarak proje kapsamında grubumuz tarafından gerçekleştirilmiştir. Hücreleri AVP ile uyarma işlemi aşağıdaki gibidir.

1. Transfeksiyondan 72 saat sonra kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve her bir kuyuya 50 µl Stimülasyon Tamponu eklenmiştir.

Stimülasyon Tamponu (10 ml)

50 µl 1 M HEPES

10 µl 500 mM IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthine)

0.01 g BSA

Son hacim 1X HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile tamamlanmıştır.

1X HBSS Tamponu

441 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

338 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>

137.93 mM NaCl

5.33 mM KCl

1.26 mM CaCl<sub>2</sub>

493 µM MgCl<sub>2</sub>

407 mM MgSO<sub>4</sub>

5.56 mM Glukoz

2. Hücreler 20 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası her bir kuyuya değişen konsantrasyonlarda 50 µl AVP eklenmiştir (Stimülasyon Tamponu içerisinde 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM ve 0 AVP).
4. Hücreler 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası AVP ortamdan uzaklaştırılmıştır ve hücreler 50 µl soğuk Lizis Tamponu ile muamele edilmiştir. Plaklar 5 dakika boyunca 500-600 rpm'de çalkalanmıştır ve deney süresince buz üzerinde bekletilmiştir.

Lizis Tamponu (10 ml)

50 µl 1M HEPES, pH: 7,4

0.01 g BSA

30 µl Tween-20

Son hacim dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır.

- Her bir kuyudaki hücre lizatından 5 µl alınıp 384 kuyulu mikroplakaya aktarılmıştır.

### 3.9.4. AVP ile Uyarılan Hücrelerin cAMP Miktarlarının Belirlenmesi için Yapılan AlphaScreen® cAMP Birikim Testi

- Örnekte bulunan cAMP değerini hesaplamak için 12 farklı konsantrasyonda cAMP içeren standart hazırlanmıştır. Standart hazırlamak için Çizelge 3.13 kullanılmıştır.

Çizelge 3.13. cAMP ölçümü için standart tüplerinin hazırlanması.

Seyreltme	Son Konsantrasyon (M)	Seyreltme Hacmi	Stimülasyon Tamponu
1	1 X 10 <sup>-6</sup>	50 µM cAMP stoktan 5 µl	45 µl
2	3 X 10 <sup>-7</sup>	1. tüpten 15 µl	35 µl
3	1 X 10 <sup>-7</sup>	2. tüpten 15 µl	30 µl
4	3 X 10 <sup>-8</sup>	3. tüpten 15 µl	35 µl
5	1 X 10 <sup>-8</sup>	4. tüpten 15 µl	30 µl
6	3 X 10 <sup>-9</sup>	5. tüpten 15 µl	35 µl
7	1 X 10 <sup>-9</sup>	6. tüpten 15 µl	30 µl
8	3 X 10 <sup>-10</sup>	7. tüpten 15 µl	35 µl
9	1 X 10 <sup>-10</sup>	8. tüpten 15 µl	30 µl
10	3 X 10 <sup>-11</sup>	9. tüpten 15 µl	35 µl
11	1 X 10 <sup>-11</sup>	10. tüpten 15 µl	30 µl
12	0	-	35 µl

2. Hazırlanan cAMP standartlarından üçlü tekrar olacak şekilde 5 µl alınıp 384 kuyulu mikropalakaya aktarılmıştır.
3. Akseptör ve donör boncuklar kullanılarak gerçekleştirilen deneyin bu aşamasından itibaren tüm işlemler karanlık odada yapılmıştır. Ayrıca 384 kuyulu mikropalkanın üzeri tüm inkübasyon süreleri boyunca buharlaşmayı ve ışık ile teması önlemek amacıyla yapışkan kaplama filmi ile kaplanmıştır.
4. Akseptör ve donör boncuk karışımları aşağıda verilen şekillerde hazırlanmıştır.  
Akseptör boncuk → 1:50 seyreltilip Stimülasyon Tamponu içerisinde hazırlanmıştır.  
Donör boncuk → 1:150 oranında seyreltilmiştir, 1:24 oranında biotin işaretli cAMP seyreltilmiştir ve Lizis Tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
5. Akseptör boncuk karışımından standartlar da dahil olmak üzere her bir kuyuya 5 µl eklenmiştir ve 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir.
6. Donör boncuk karışımından her bir kuyuya 15 µl eklenmiştir ve 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonrası plaka, EnSight™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer) cihazına yerleştirilerek ışımaya miktarları ölçülmüştür.
8. Elde edilen ışımaya değerlerine göre cAMP miktarları Microsoft Excel programında hesaplanmıştır.
9. Elde edilen veriler GraphPad Prism Software programı kullanılarak her bir mutant reseptöre ait  $E_{max}$  ve  $EC_{50}$  değerleri analiz edilmiştir.

### **3.10. COS-7 Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışması**

Mutant V2 reseptörlerinin, literatüre bakıldığında ER ya da Golgi aygıtındaki kontrol mekanizmalarında takılı kaldıkları ve hücre yüzeyine ulaşamadıkları bilgisi elde edilmektedir [40]. Bu amaç doğrultusunda yapılan tez çalışmasında yer alan mutasyonları içeren reseptörlerin ER'de takılı kalıp kalmadığını göstermek amacıyla floresan görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. EGFP dizisi ile işaretlenen yabancı tip ve mutant reseptörler COS-7 hücre hattı kullanılarak görüntülenmiştir.

### **3.10.1. Floresan Görüntüleme Çalışması için COS-7 Hücrelerinin Hazırlanması**

Floresan görüntüleme çalışmaları için COS-7 hücreleri aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

1. Thoma camı kullanılarak 1 ml besiyeri içindeki hücre sayısı belirlendikten sonra istenilen konsantrasyonda hücre elde etmek için hücre süspansiyonuna DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenmiştir.
2. Floresan görüntüleme çalışmaları için COS-7 hücreleri 40.000 hücre/kuyu olacak şekilde 48 kuyulu plağa ekilmiştir.
3. 48 kuyulu plağa ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün transfeksiyon için kullanılmıştır.

### **3.10.2. Floresan Görüntüleme Çalışması için COS-7 Hücrelerinin Transfeksiyonu**

Floresan görüntüleme çalışması için COS-7 hücrelerinin transfeksiyonu aşağıda verilen şekilde yapılmıştır.

1. 48 kuyulu plağa 40.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen COS-7 hücreleri ertesi gün ışık mikroskobu kullanılarak kontrol edilmiştir. Transfeksiyon için uygun şartların sağlandığı doğrulanmış ve transfeksiyon işlemine başlanmıştır.
2. 48 kuyulu plak için tek bir kuyuya;

70 µl serumsuz Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

700 ng DNA

0,7 µl Turbofect™ transfeksiyon ajanı eklenmiştir.

Bunun için, DMEM ile DNA bir tüpte pipetleme yapılarak hazırlanmıştır. Bu karışıma DNA eklenmiştir. DNA'nın transfeksiyon ajanı ile etkileşime girmesi için iyice pipetleme yapılmıştır. Her bir mutasyon için kaç tane kuyu kullanmak gerekiyorsa transfeksiyon karışımı ona göre hazırlanmıştır.

3. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin 20 dakikadan daha az veya çok olmamasına dikkat edilmiştir.
4. İnkübasyonun ardından transfeksiyon karışımı COS-7 hücrelerinin bulunduğu kuyulara eklenmiştir.



5. Yabancı tip ve mutant DNA'ların COS-7 hücrelerinde yabancı tip ve mutant V2 reseptörleri olarak ifade edilmesi için transfeksiyondan sonra 48-72 saat beklenmiştir.
6. Transfeksiyon etkinliği EVOS FLoid Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) ile kontrol edilmiştir.

### **3.10.3. COS-7 Hücrelerinin ER-İzleyici ile Boyanması**

Yabancı ve mutant V2 reseptörlerinin ER'de takılı kalıp kalmadığını göstermek amacıyla COS-7 hücreleri ER-izleyici boya ile boyanmıştır. İzlenen deneysel yöntem aşağıdaki gibidir.

1. Transfeksiyondan 72 saat sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır.
2. Hücreler 1X DPBS ile bir kez yıkanmıştır.
3. 250 µl %4 formaldehit içeren 1X DPBS eklenmiştir.
4. Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletilerek fiksasyon sağlanmıştır.
5. Hücreler 1X DPBS ile bir kez yıkanmıştır.
6. Bu aşamadan sonraki bütün işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.
7. Hücelere 250 µl 1X DPBS içerisinde hazırlanmış 1 µM ER-TrackerTMRed (BODIPY® TR Glibenclamide) içeren boya eklenmiştir.
8. 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
9. Boya uzaklaştırılmıştır.
10. Hücrelerin üzerine 250 µl 1X DPBS-T (%0,05 Tween-20 içeren 1X DPBS) eklenmiştir.
11. Hücreler buz üzerinde 10 dakika boyunca inkübe edilerek geçirgen hale gelmeleri sağlanmıştır.
12. Hücreler 1X DPBS ile bir kez yıkanmıştır.
13. 250 µl 1X DPBS içerisinde hazırlanmış 1 µM DAPI (Sigma Aldrich) ile 5 dakika inkübe edilerek hücreler boyanmıştır.
14. Hücreler 1X DPBS ile 2 defa yıkanmıştır.
15. Hücrelerin üzerine 250 µl 1X DPBS eklenmiştir.
16. EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) ile görüntüleme yapılmıştır.

## 4. SONUÇLAR

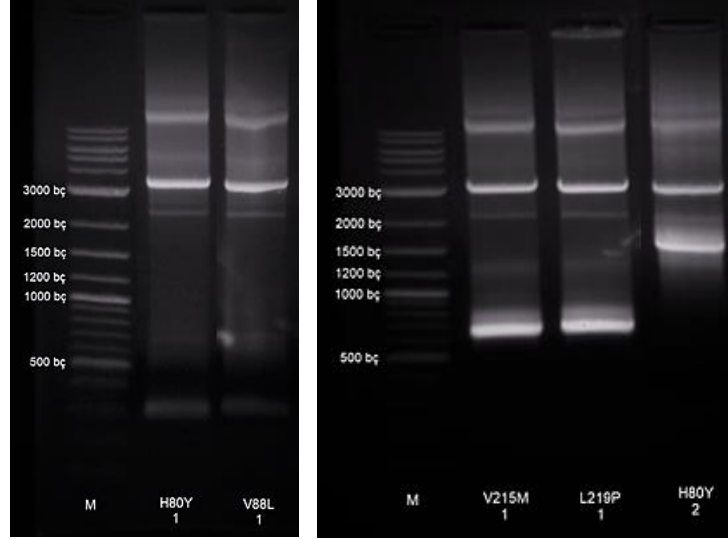
### 4.1. Site-directed Mutagenез Yöntemi Kullanılarak EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar

Site-directed mutagenез yöntemi kullanılarak EGFP ile işaretli olmayan mutant V2R gen dizilerini içeren ifade vektörlerinin oluşturulmasına ait sonuçlar bu proje kapsamında yapılan diğer bir tez çalışmasında gösterilmiştir [54]. Bu tez çalışmasında ise site-directed mutagenез yöntemi kullanılarak EGFP ile işaretleme yapılmış V2R gen dizilerini içeren ifade vektörlerinin oluşturulmasına ilişkin sonuçlar yer almaktadır. İki tez çalışmasında da V2R gen dizisi, site-directed mutagenез yöntemi kullanılarak aynı primerlerle çalışılmıştır.

Mutant bir V2R gen bölgesi elde etmek için; dış ileri primer (cozak-HA F) ile ilgili mutasyonu içine alan geri primer kullanılarak PZR ürünleri 1 elde edilmiştir. Aynı şekilde ilgili mutasyonu içine alan ileri primer ile dış geri primer (pL-FLAG R) kullanılarak PZR ürünleri 2 elde edilmiştir. PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir. Elde edilen bant büyüklüklerine ilişkin bilgiler Çizelge 4.1'de verilmiştir. PZR ürünleri 1 ile PZR ürünleri 2'nin %1'lik agaroz jel görüntüleri ise Şekil 4.1'de verilmiştir.

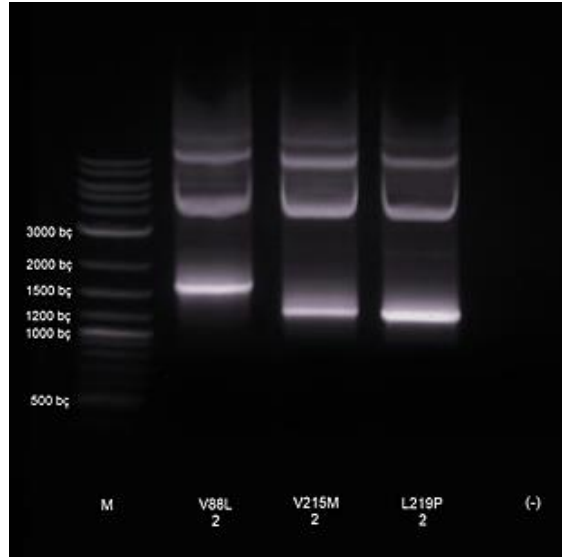
Çizelge 4.1. V2R geni için PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen bant büyüklükleri (bç: baz çifti).

Kullanılan Primerler	pLV2R vektörü		pLV2R_EGFP vektörü	
	cozak-HA F	pL-FLAG R	cozak-HA F	pL-FLAG R
H80Y F	-	934 bç	-	1652 bç
H80Y R	283 bç	-	283 bç	-
V88L F	-	911 bç	-	1629 bç
V88L R	306 bç	-	306 bç	-
V215M F	-	529 bç	-	1247 bç
V215M R	687 bç	-	687 bç	-
L219P F	-	517 bç	-	1235 bç
L219P R	700 bç	-	700 bç	-



a

b



c

Şekil 4.1. Her bir mutasyonu içeren PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri (M: belirteç, (-): negatif kontrol, bç: baz çifti).

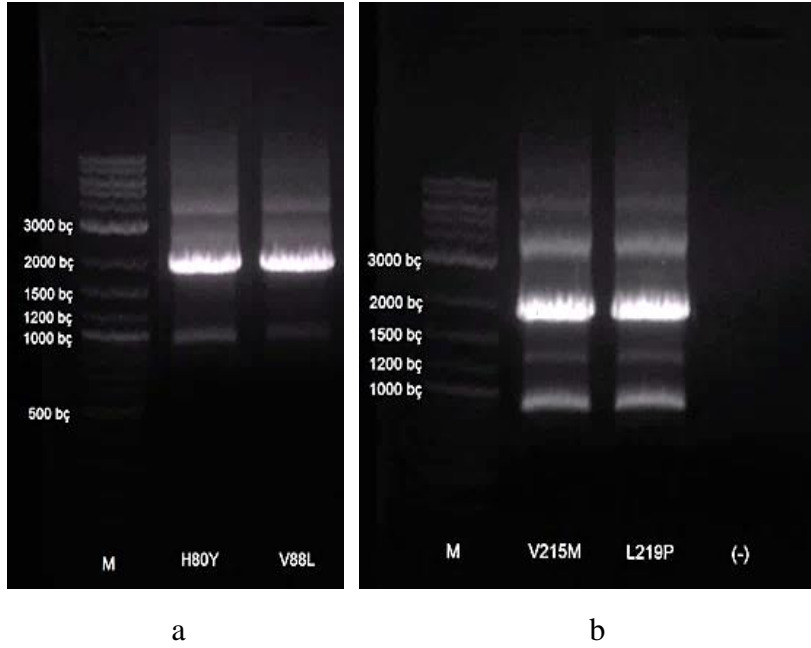
a: H80Y ve V88L mutasyonlarına ait PZR ürünleri 1,

b: V215M ve L219P mutasyonlarına ait PZR ürünleri 1 ve H80Y mutasyonuna ait PZR ürünü 2,

c: V88L, V215M ve L219P mutasyonlarına ait PZR ürünleri 2.

İlgili bantlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

PZR ürünleri 1 ve PZR ürünleri 2'nin kalıp olarak kullanıldığı, bütün bir V2R dizisi oluşturmak için yapılan füzyon PZR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü, Şekil 4.2'de verilmiştir. Mutasyonlar için jelden 1935 bç uzunluğundaki bantlar kesilip alınarak izole edilmiştir ve kesim reaksiyonları için kullanılmıştır.



Şekil 4.2. İlgili mutasyonları içeren bütün bir V2R dizisini oluşturmak için yapılan füzyon PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri (M: belirteç, (-): negatif kontrol, bç: baz çifti).

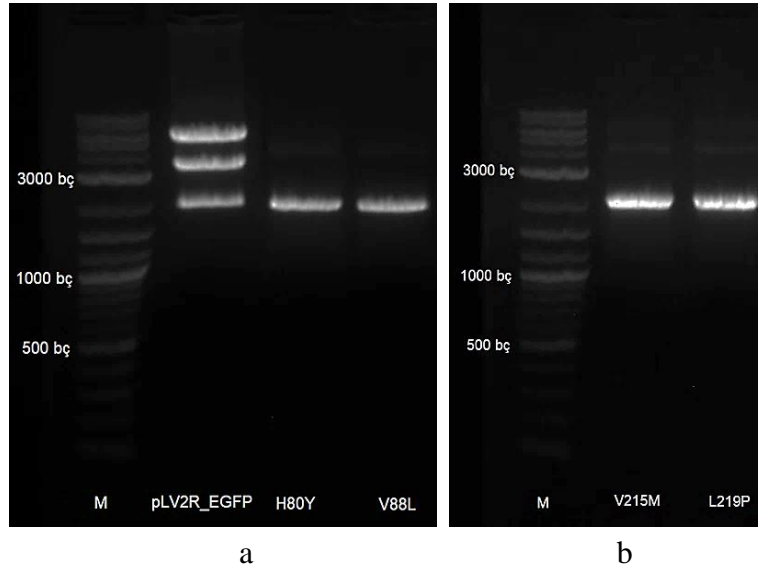
a: H80Y ve V88L mutasyonlarına ait görüntü,

b: V215M ve L219P mutasyonlarına ait görüntü.

1935 bç uzunluğundaki bantlar jelden kesilip alınarak izole edilmiştir.

#### 4.2. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin ve Vektörlerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimine İlişkin Sonuçlar

EGFP ile işaretlemesi yapılmış mutant V2R gen dizilerinin ve pLV2R\_EGFP vektörünün *AatII* ve *SpeI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrası %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Jelden pLV2R\_EGFP vektörü için 3150 bç uzunluğundaki bant, mutasyonlar içinse 1873 bç uzunluğundaki bantlar alınarak izole edilmiştir ve ligasyon aşamasında kullanılmışlardır.



Şekil 4.3. *AatII* ve *SpeI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan kesim sonrası ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri (M: belirteç, bç: baz çifti).

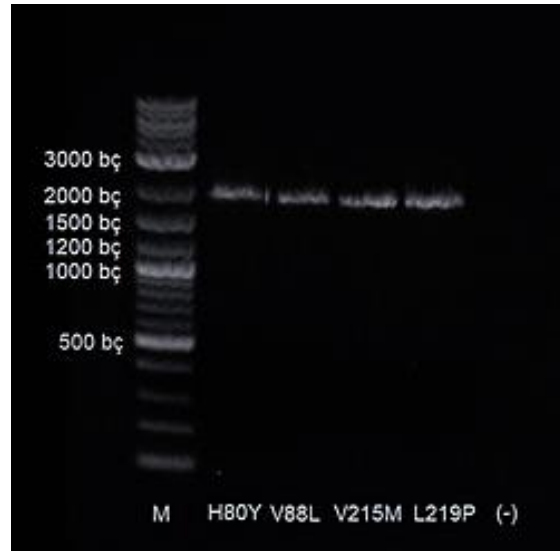
a: pLV2R\_EGFP vektörü ve H80Y ve V88L mutantlarının uzun PZR ürünlerinin kesimi,

b: V215M ve L219P mutantlarının uzun PZR ürünlerinin kesimi.

Vektör için 3150 bç uzunluğundaki bant, mutasyonlar içinse 1873 bç uzunluğundaki bantlar jelden kesilerek izole edilmiştir.

### 4.3. Hazırlanan EGFP ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) Kompetan Hücrelerine Transforme Edilmesine İlişkin Sonuçlar

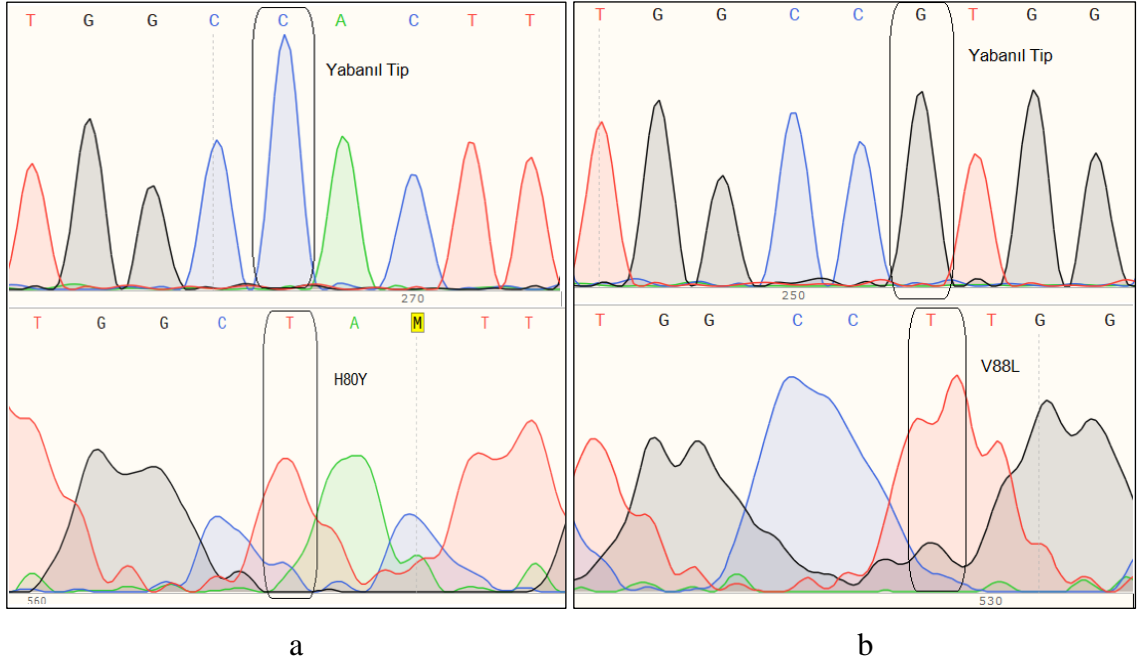
EGFP ile işaretleme yapılmamış ifade vektörlerinin *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası elde edilen koloni görüntüleri proje kapsamında yer alan diğer tez çalışmasında gösterilmiştir [54]. EGFP ile işaretlenen mutant V2R gen dizilerini içeren ifade vektörlerinin *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) kompetan hücrelerine transformasyonu sonrası elde edilen kolonilerden koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR sonrası ürünlerin %1'lik agaroz jelde kontrolü sonrası 1910 bç uzunluğunda bant göstermesi beklenmektedir. Bu uzunlukta bant gözlemlendiğinde *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) kompetan hücrelerinin V2R genini içine aldığı doğrulanması sağlanmış olur. Yapılan koloni PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde kontrol edilmesine ait görüntü Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Gerçekleştirilen koloni PZR sonrası ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri (M: belirteç, (-): negatif kontrol, bç: baz çifti).

#### 4.4. Oluşturulan EGFP Dizisi ile İşaretli ve İşaretsiz Mutant V2R Gen Dizilerinin DNA Dizileme Yöntemi Kullanılarak Doğrulanmasına İlişkin Sonuçlar

EGFP işaretsiz mutant V2R gen dizilerinin DNA dizileme yöntemi kullanılarak doğrulanmasına ilişkin sonuçlar proje kapsamında yer alan diğer tez çalışmasında gösterilmiştir [54]. EGFP işaretli mutant V2R gen dizilerinin DNA dizileme yöntemi kullanılarak doğrulanmasına ilişkin kromatogram görüntüleri ise Şekil 4.5'te verilmiştir.



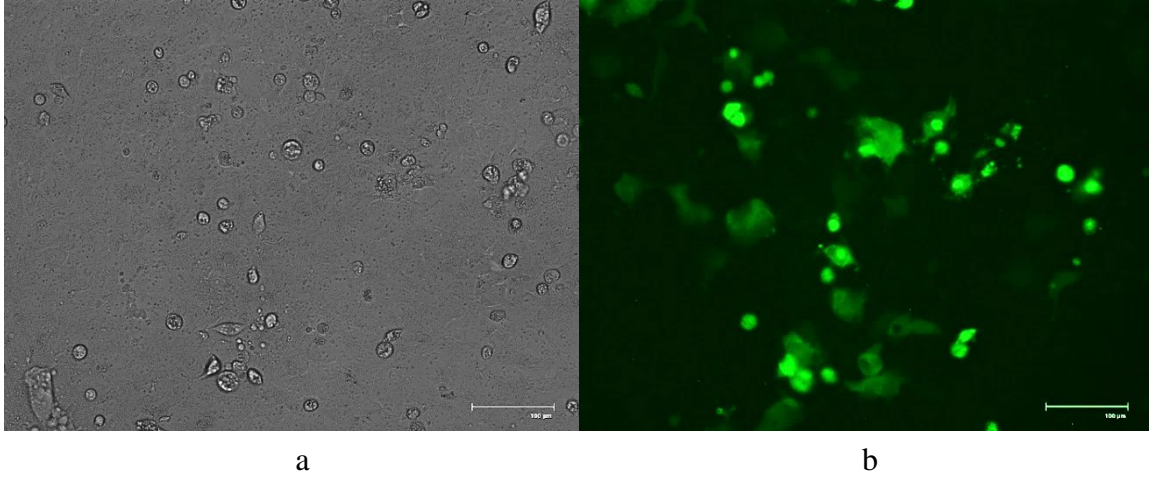
Şekil 4.5. EGFP ile işaretlenmiş mutantlar için kromatogram görüntüleri.

a: H80Y mutanına ait kromatogram görüntüsü (CAC → TAC),

b: V88L mutanına ait kromatogram görüntüsü (GTG → TTG).

#### 4.5. Yabancıl Tip ve Mutant V2R Gen Dizilerini İçeren İfade Vektörlerinin COS-7 Hücrelerine Transfeksiyonuna İlişkin Sonuçlar

ELISA, cAMP birikim testi ve hücre görüntüleme gibi fonksiyon analizi deneyleri için hücreler üzerinde gerçekleştirilen transfeksiyonun etkinliği pEGFP ile gözlenmiştir. Transfeksiyon etkinliğinin gözlemlendiği hücre görüntüleri Şekil 4.6'daki gibidir.



Şekil 4.6. pEGFP ile transfeksiyonu gerçekleştirilen COS-7 hücrelerinin 48 saat sonraki görüntüleri (Birim: 100 µm).

a: normal ışık altındaki görüntüsü, b: floresan ışık altındaki görüntüsü.

Yabancıl tip ve mutant V2 reseptörlerinin hücre yüzeyindeki ve hücre içindeki ifadelerinin belirlenmesi için sırasıyla hücre yüzey ELISA deneyi ve total ELISA deneyi yapılmıştır.

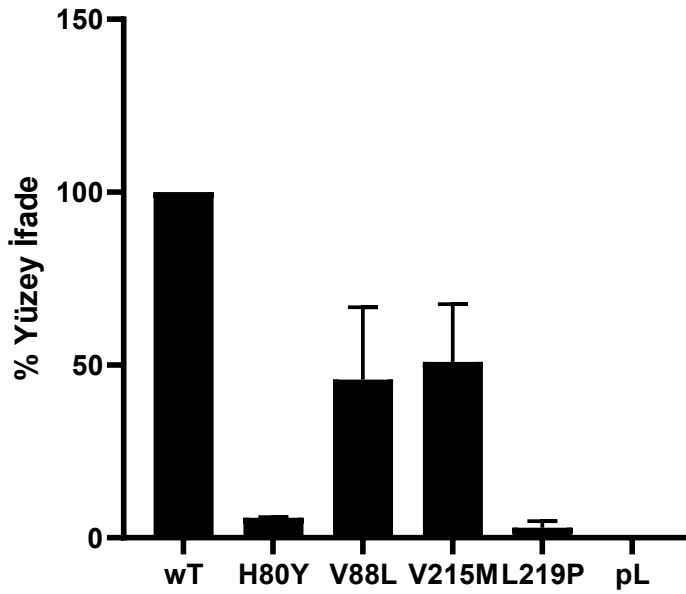
##### 4.6.1. Hücre Yüzey ELISA Deneyine İlişkin Sonuçlar

Hücre yüzey ELISA deneyleri sonucunda elde edilen sonuçlara göre, tüm mutantların hücre yüzeyindeki ifadelerinde azalma belirlenmiştir. En çok etkilenen mutasyonlar sırasıyla L219P ve H80Y'dir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7).



Çizelge 4.2. Hücre yüzey ELISA deneyi sonuçları (SD: Standart sapma, n: tekrar sayısı, WT: yabanıl tip V2 reseptörü, pL: V2R dizisi içermeyen boş vektör).

Hücre Yüzey ELISA (%)			
Reseptörler	Ortalama	SD	n
WT	100	0	4
H80Y	5,8	0,2	3
V88L	45,8	20,9	3
V215M	50,9	16,7	4
L219P	2,7	1,9	4
pL	0	0	4



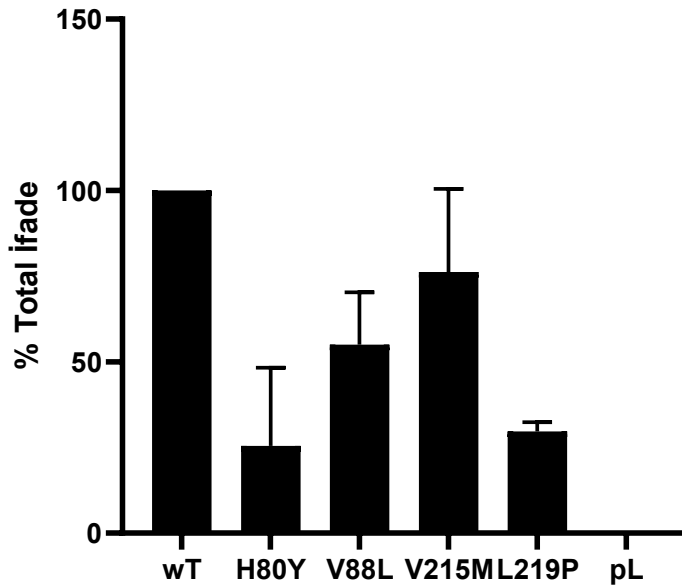
Şekil 4.7. Mutant V2 reseptörlerine ait hücre yüzey ELISA grafiği. Yüzey ifadeleri yabanıl tip reseptörün ifadesi %100 olacak şekilde kabul edilip kıyaslama ile hesaplanmıştır (WT: yabanıl tip V2 reseptörü, pL: V2R dizisi içermeyen boş vektör).

#### 4.6.2. Total ELISA Deneyine İlişkin Sonuçlar

Yapılan total ELISA deneyleri ile elde edilen sonuçlara göre en çok H80Y ve L219P mutant reseptörlerinin hücre içindeki toplam ifadelerinde azalma belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8).

Çizelge 4.3. Total ELISA deneyi sonuçları (SD: Standart sapma, n: tekrar sayısı, WT: yabancı tip V2 reseptörü, pL: V2R dizisi içermeyen boş vektör).

Total ELISA (%)			
Reseptörler	Ortalama	SD	n
WT	100	0	6
H80Y	25,5	22,8	3
V88L	55,0	15,3	3
V215M	76,2	24,3	6
L219P	29,7	2,7	3
pL	0	0	3

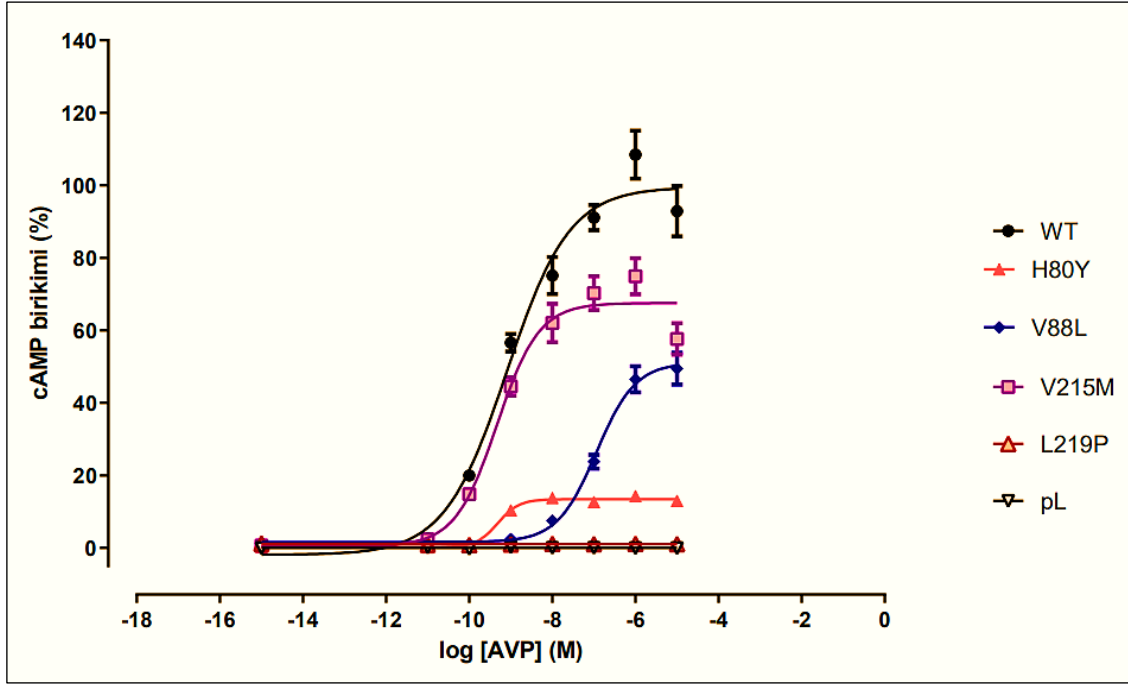


Şekil 4.8. Mutant V2 reseptörlerine ait Total ELISA grafiği. Total ifadeleri yabancı tip reseptörün ifadesi %100 olacak şekilde kabul edilip kıyaslama ile hesaplanmıştır.

(WT: yabancı tip V2 reseptörü, pL: V2R dizisi içermeyen boş vektör)

#### 4.7. cAMP Birikim Testine İlişkin Sonuçlar

AVP ile uyarılan mutant reseptörleri ifade eden hücrelerdeki cAMP miktarı göreceli olarak yabani tip reseptörün verdiği cevap %100 olacak şekilde kabul edilip karşılaştırmalı bir şekilde hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre fonksiyon kaybının en yoğun gözlemlendiği mutant L219P olmuştur. L219P'yi H80Y takip etmektedir (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.4).



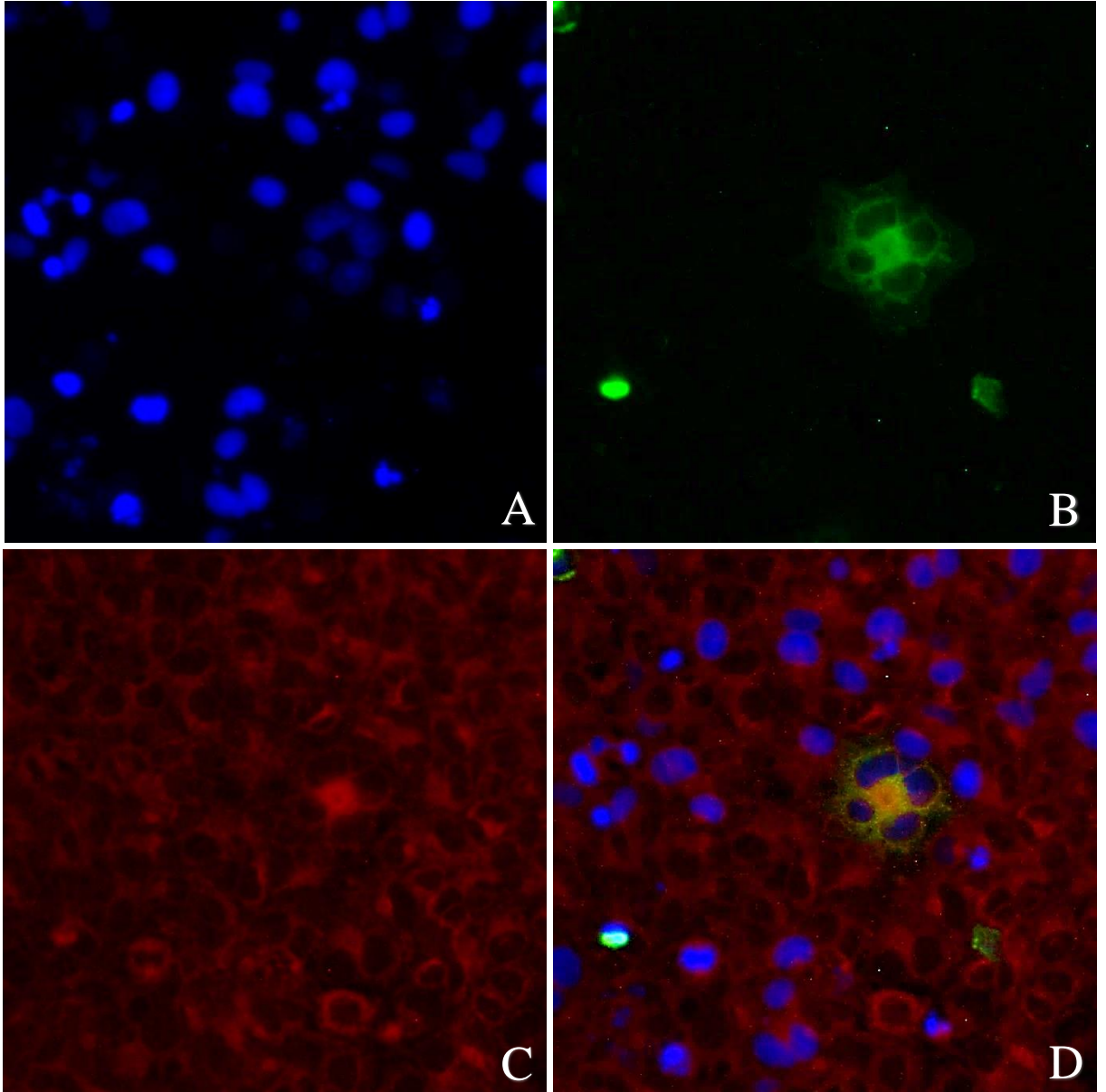
Şekil 4.9. cAMP birikim testi sonucu elde edilen doz-cevap eğrisi (WT: yabani tip V2 reseptörü, pL: V2R dizisi içermeyen boş vektör).

Çizelge 4.4. AVP ile uyarılma sonucu mutant reseptörlere ait  $E_{max}$  ve  $EC_{50}$  değerleri (n=4). L219P ve pL,  $E_{max}$  değeri meydana getiremediği için  $EC_{50}$  değerleri de hesaplanamamıştır (WT: yabanıl tip V2 reseptörü, pL: V2R dizisi içermeyen boş vektör, negatif kontrol, SD: Standart sapma).

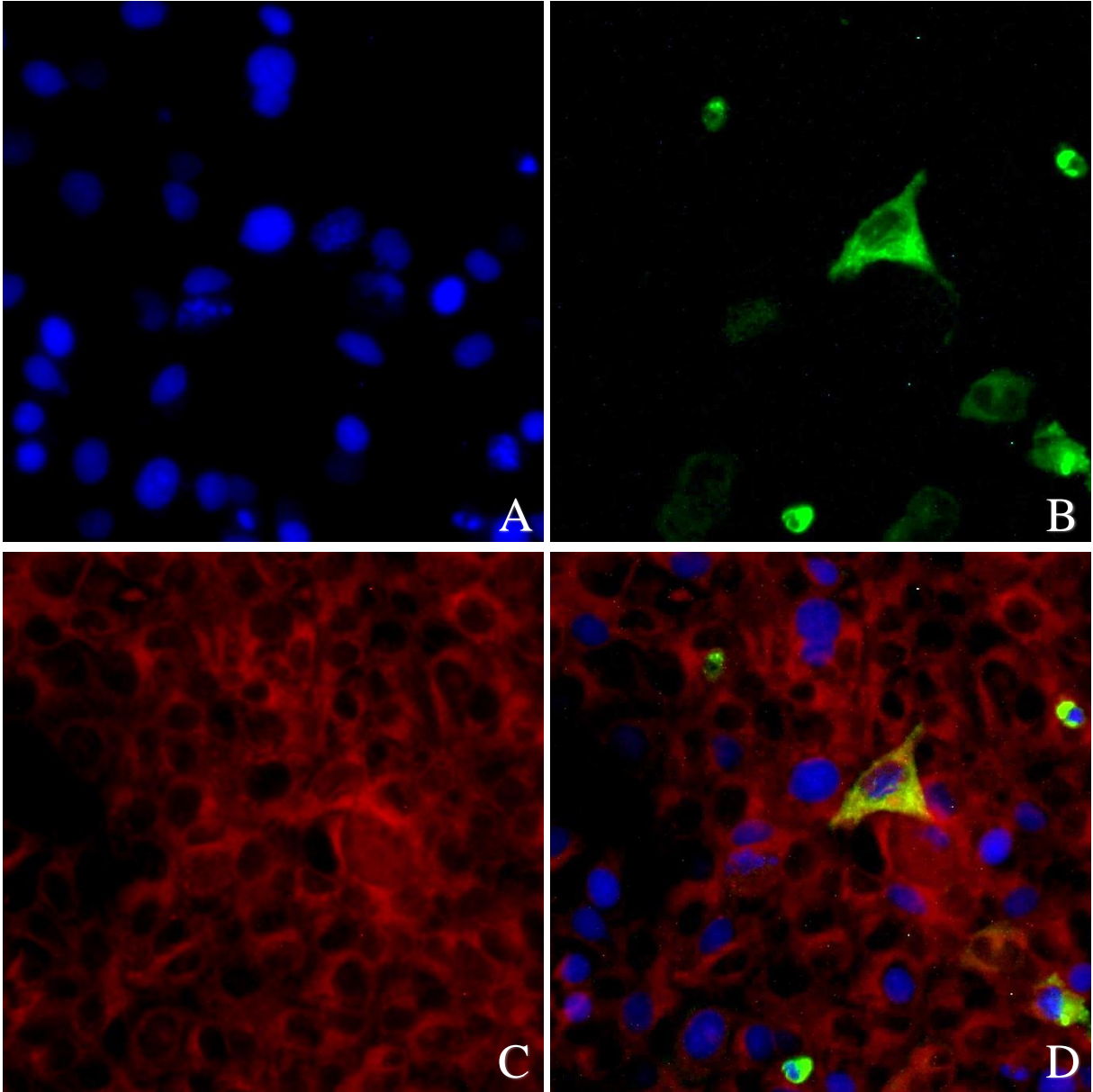
Mutant reseptörler	$E_{max}$ (%)		$EC_{50}$ (nM)	
	Ortalama	SD	Ortalama	SD
WT	100	-	1	0,6
H80Y	13,4	3,7	0,6	0,2
V88L	51,6	16,4	121	28,3
V215M	68,2	13,6	0,6	0,3
L219P	-	-	-	-
pL	-	-	-	-

#### 4.8. COS-7 Hücrelerinin Floresan Görüntüleme Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar

Hücre görüntüleme çalışmaları kapsamında yabanıl tip ve mutant V2 reseptör proteinlerini takip edebilmek amacıyla bu geni içeren dizi EGFP ile işaretlenmiştir. Böylece reseptör protein floresan ışık altında yeşil renkte görüntülenebilmektedir. ER ise kendine özgü ticari izleyici kullanılarak renklendirilmiştir. Bu sayede, H80Y ve V88L mutant reseptörlerinin ER’de takılı kalıp kalmadığı deneysel olarak gösterilmiştir. Yaşanan pandemi sebebi ile V215M ve L219P mutant reseptörleri için hücre görüntüleme deneyleri yapılamamıştır. H80Y ve V88L mutant reseptörlerine ait elde edilen sonuçlar Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’deki gibidir.



Şekil 4.10. H80Y mutant V2 reseptörünü ifade eden COS-7 hücresi. A: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, B: EGFP ile işaretlenmiş V2 reseptörü, C: ER, D: Birleştirilmiş görüntü. Mutant reseptörü ifade eden hücrede, ER'un kırmızı rengi ile mutant reseptörün yeşil renginin çakıştığı bölgeler turuncu/sarı olarak görülmektedir.



Şekil 4.11. V88L mutant V2 reseptörünü ifade eden COS-7 hücresi. A: DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri, B: EGFP ile işaretlenmiş V2 reseptörü, C: ER, D: Birleştirilmiş görüntü. Mutant reseptörü ifade eden hücrede, ER'un kırmızı rengi ile mutant reseptörün yeşil renginin çakıştığı bölgeler turuncu/sarı olarak görülmektedir.



Yukarıda verilen bilgilere ek olarak, bu tez çalışmasından ayrı olarak proje kapsamında grubumuz tarafından gerçekleştirilen cAMP birikim testinde hücrelere uygulanan AVP, maymun *V2R* geninin meydana getirdiği reseptörü uyaramamaktadır. Bunun sebebi, transfeksiyon işleminde COS-7 hücrelerine insan *V2R* geninin aktarılmış olmasıdır. Böylece, insan AVP hormonu ile uyarım yapıldığında maymun *V2R* geninin meydana getirdiği 254 amino asit uzunluğundaki reseptör yerine, insan *V2R* geninin meydana getirdiği 371 amino asit uzunluğundaki reseptör uyarılmaktadır. Bunun sebebi insan AVP hormonunun maymun reseptörünü uyaramamasıdır. Bu nedenle maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek dokusundan alınıp farklılaştırılmış COS-7 hücre hattı, cAMP deneysel çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilir.

Bu tez çalışması dışında proje kapsamında grubumuz tarafından gerçekleştirilen cAMP birikim testi sonucunda elde edilen doz-cevap eğrisi kullanılarak  $E_{max}$  ve  $EC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan  $E_{max}$  değeri, *V2* reseptörünün meydana getirebileceği en yüksek cAMP miktarını belirtirken,  $EC_{50}$  değeri belirli bir süre uygulanan AVP'nin meydana getirdiği bazal cevap ile maksimum cevabın ortasında yer alan bir değerdir. Bu değerler kullanılarak reseptör fonksiyonu analizleri yapmak ve ilaç uygulamaları için bilgiler edinmek mümkündür.

H80Y, V88L, V215M ve L219P mutasyonları için gerçekleştirilen fonksiyonel analizi çalışmaları kapsamında *V2* reseptör fonksiyonu üzerine elde edilen verilerin değerlendirilmesi aşağıda yer almaktadır.



## 5.1. H80Y Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirildiği mutasyonlardan biri olan H80Y mutasyonu 2. transmembran domenynde yer almaktadır ve 80. kodonda yer alan histidin amino asidinin tirozin amino asidine dönüşmesine neden olmaktadır (CAC → TAC). Histidin amino asidi pozitif yüke sahip ve hidrofilik bir amino asittir. Histidin amino asidinin dönüştüğü tirozin amino asidi ise, aromatik, polar olmayan bir amino asittir ve hidrofobik özellik göstermektedir. Bu amino asit değişikliği sonucunda oluşan farklılık, V2 reseptör proteininin hücre içi trafiğini bozabileceğini ve reseptörün membrana doğru bir şekilde yerleşmesinin etkilenebileceğini düşündürmektedir [53]. Bunlara ek olarak, reseptörün katlanması ve doğru konformasyonu alması da etkilenebilir.

1994 yılında yapılan bir çalışma sonucunda 2. transmembran alanda H80R nokta mutasyonu tanımlanmıştır [61]. Bu mutasyon, 80. kodondaki histidin amino asidinin, arjinin amino asidine dönüşümüne neden olmaktadır. Histidin amino asidi, bazik ve pozitif yüklü bir amino asittir. Arjinin amino asidi ise, histidin amino asidinden daha pozitif yüklüdür. Hem arjinin hem de histidin, polar amino asitler olmalarına rağmen, birbirlerinden farklıdır. Arjinin moleküllerinin çoğu, nötr bir ortamda pozitif yüklenirken, histidin moleküllerinin çoğu nötr kalır. Bu fark, reseptör konformasyonunun değişmesine neden olabilir ve fonksiyonel başarısızlıklarına yol açabilir [61].

Yapılan tez kapsamında elde edilen ELISA sonuçlarında (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3), total V2 reseptörü ifadesinin yüksek oranda düştüğü (%25,5) ve yüzeye çok az miktarda V2 reseptör proteininin ulaştığı (%5,8) gözlemlenmiştir. Bu mutantın hücre yüzeyindeki ifadesinin azlığı nedeniyle AVP ile uyarım sonucu, reseptörün oluşturacağı cAMP cevabının da düşük olması beklenmektedir ve cAMP birikim testlerinden elde edilen verilere bakıldığında, AVP ile uyarım sonucu oluşan cAMP  $E_{max}$  cevabı %13,4'tür,  $EC_{50}$  değeri ise 0,6 nM'dır (Çizelge 4.4). Mutant reseptörün yarı yarıya uyarılması için gerekli AVP miktarı yabancı tip reseptörle karşılaştırıldığında, neredeyse yarı yarıya daha düşük bir değere sahiptir (Çizelge 4.4). Yani mutant reseptör görece daha az miktardaki AVP ile uyarılabilmektedir fakat reseptörün bu uyarılmaya karşı verdiği cevap yabancı tipe oranla yaklaşık %85 oranında daha düşüktür.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FBA-2017-14395 numaralı proje kapsamında H80Y mutasyonuna sahip V2 reseptör proteininin yarı ömür ve glikozilasyon deneyleri de yapılmış olup H80Y mutantının ER'de yüksek mannoz yapısında takılı kalarak, Golgi aygıtına ulaşamadığı öngörülmüştür [54]. ER'den taşınmaya direnç gösterdiği düşüncesinden dolayı, H80Y mutant reseptörünün floresan görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan floresan görüntüleme deneyleri sonucunda elde edilen görüntülere bakıldığında, mutant V2 reseptör proteininin ER'de takılı kalabileceği gösterilmiştir (Şekil 4.10).

## **5.2. V88L Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi**

Yapılan tez çalışması kapsamında fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirildiği bir diğer mutasyon V88L mutasyonudur. İlk olarak 2000 yılında tanımlanmıştır [62]. Bu mutasyon, 2. transmembran domeynde yer almaktadır ve 88. kodonda yer alan valin amino asidinin, lösin amino asidine dönüşümüne neden olmaktadır. (GTG → TTG). Hem valin hem de lösin amino asitleri hidrofobik karakterdedir ve benzer dallanma yapılarına sahiplerdir. Benzer amino asitler oldukları için, bu tek nokta mutasyonunun protein yapısını ve reseptörün doğru konformasyonu almasını fazla değiştirmeyeceği öngörülmektedir.

V88L mutantının, kendisi ile aynı kodonda yer alan V88M mutantına benzer bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. V88M mutantı için literatürde yer alan bilgilere bakıldığında, total protein ve hücre yüzey ifadesinin yabancı tipe göre büyük bir farklılık göstermediği sonucu beklenmektedir [63], [64]. V88M ve V88L mutasyonlarına ek olarak 88. kodonda V88N mutasyonu da bulunmaktadır [29], [32]. V88N mutasyonunun fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bu mutasyon, 88. kodondaki valin amino asidinin, asparajin amino asidine dönüşümüne neden olmaktadır. Valin apolar bir amino asit iken asparajin amid grubu nedeniyle polar bir özellik göstermektedir. Bu yapısal farklılık nedeniyle, reseptör konformasyonunun ve fonksiyonunun etkilenebileceği öngörülmektedir. Bu bilgilere dayanarak, 88. kodondaki mutasyonlara bakıldığında reseptör fonksiyonunun amino asit yapısındaki değişimlere göre etkileneceği düşünülmektedir. Bu nedenle, 88. kodondaki mutasyonların V2 reseptör fonksiyonu üzerine etkilerinin araştırılması konjenital NDI hastalığı için literatüre katkı sağlayacaktır.

Bu tez kapsamında yapılan ELISA deneylerine bakıldığında, V88L mutantının hücre yüzey ifadesi %45,8 iken total hücre ifadesi %55'tir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Elde edilen değerlere bakıldığında mutant reseptörünün, V88M mutant reseptörü yabancı tipe yakın değerler göstermemektedir ve düşük protein ifadesi olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda reseptör ifadesinin aydınlatılması amacıyla, proje kapsamında grubumuz tarafından cAMP deneyleri yapılmıştır. Gerçekleştirilen AVP ile uyarım sonucu V88L mutant reseptörünün meydana getirdiği  $E_{max}$  %51,6'dır.  $EC_{50}$  değeri ise 121 nM'dir (Çizelge 4.4). Yani, V88L mutant reseptörünün uyarılması için fazla konsantrasyonda AVP gerekirken, oluşan cAMP cevabı yabancı tipe oranla yarı yarıya daha düşüktür. Her ne kadar amino asit değişiminin yapıdaki hidrofobik durumu değiştirmedeği görülse de mutant reseptörün hücre yüzey ifadesinde yarı yarıya bir düşme meydana getirmiştir. AVP ile uyarılma sonucu verilen maksimum cevabın da yabancı tipe oranla yarı yarıya daha düşük olduğu ve bununla birlikte uyarılması için gerekli AVP miktarının yabancı tipe oranla neredeyse 100 kat daha fazla olduğu göz önünde bulundurulduğunda, aslında bu mutant reseptörün hücre yüzey ifadesinde azlıktan ve konformasyonda meydana gelen değişiklik nedeniyle ligand ile uyarılmasının yeterli olmadığı ve buna bağlı olarak yeterli bir cAMP cevabı oluşturamadığı düşünülmektedir.

Ayrıca yapılan floresan görüntüleme çalışmalarında elde edilen sonuçlara bakıldığında mutant V2 reseptör proteininin bir kısmının ER'de takılı kalabileceği gözlenmektedir (Şekil 4.11). Yapılan bu görüntüleme çalışmaları ve fonksiyonel analizler, proje kapsamında yapılan diğer tez çalışması ile de uyumludur [54]. Elde edilen tüm sonuçlar, V88L mutant reseptörlerinin, H80Y mutant reseptörlerine göre daha işlevsel olduğunu ancak yabancı tip ile karşılaştırıldığında fonksiyon kaybına uğradığını düşündürmektedir.

### 5.3. V215M Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında fonksiyonel analiz çalışmalarının gerçekleştirildiği bir diğer mutasyon V215M mutasyonudur. Bu mutasyon ilk olarak 1998 yılında tanımlanmıştır [65]. Bu mutasyon 215. kodondaki valin amino asidinin, metiyonin amino asidine dönüşmesine neden olmaktadır (GTG → ATG). Her iki amino asit de V88L mutasyonunda olduğu gibi hidrofobik karakterlidir. Bu nedenle V215M mutanti için gerçekleştirilen fonksiyonel analizler sonucunda elde edilen değerlerin V88L mutantına benzer olabileceği düşünülmektedir. Ancak V88L mutasyonu 2. transmembran bölgede bulunurken V215M mutasyonu 5. transmembran domeynde yer almaktadır. Bu farklılık, bu mutasyonların reseptör fonksiyonu üzerindeki etkilerinin değişik seviyelerde olmasına da sebep olabilir. V215M mutanti üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde, amino asit karakterinde büyük değişiklikler bulunmazken transmembran bölgedeki farklılığın, hastalığın moleküler mekanizmasını ve seyrini ne derecede etkilediği hakkında literatüre katkı sağlanabilir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen ELISA deneyine ilişkin sonuçlara bakıldığında, total ifade edilen protein miktarının (Çizelge 4.3) diğer mutantlara oranla yabancı tipe daha yakın olduğu (%76,2) sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca bu mutant reseptörün hücre yüzey ifadesinin (Çizelge 4.2) azaldığı bulunmuştur (%50,9). Literatürde, V215M mutasyonunu içeren V2 reseptör proteininin AVP ile uyarılması sonucu oluşturduğu cevaba bakıldığında sinyal verme kapasitesini koruduğu sonucuna varılmıştır [65]. Bu amaçla, proje kapsamında grubumuz tarafından AVP ile uyarım yapılmıştır ve oluşan cAMP cevabının  $E_{max}$  değeri %68,2 olarak,  $EC_{50}$  değeri ise 0,6 nM olarak bulunmuştur (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.4). Mutant reseptörün yarı yarıya uyarılması için gerekli AVP miktarı yabancı tip reseptöre oranla karşılaştırıldığında neredeyse yarı yarıya daha düşük bir değerdir (Çizelge 4.4). Yani mutant reseptör görece daha az miktardaki AVP ile uyarılabilmektedir fakat reseptörün bu uyarılmaya karşı verdiği cevap yabancı tipe oranla yaklaşık %30 oranında daha düşüktür.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında V215M mutasyonunu içeren V2 reseptör proteinini, tez çalışması kapsamında kullanılan diğer mutantlara göre yabancı tipe en yakın sonuçlar veren mutanttır. Diğer mutant reseptörlere göre daha az fonksiyon kaybına uğradığı düşünülmektedir.

#### 5.4. L219P Mutasyonunun V2 Reseptör Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Yapılan tez çalışmasında fonksiyonel etkilerinin incelendiği bir diğer mutasyon L219P'dir. Bu mutasyon ilk olarak 1997 yılında tanımlanmıştır [66]. Bu mutasyon 5. transmembran bölgede yer almaktadır ve 219. kodondaki lösin amino asidinin, prolin amino asidine dönüşmesine neden olmaktadır (CTG → CCG). Lösin amino asidi polar olmayan bir amino asittir ve hidrofobik özellik gösterir. Prolin amino asidi de lösin gibi non-polardır ancak bulunduğu yerde yapısal esnekliği azaltma özelliğine sahiptir. Bu nedenle protein yapısında katı bir düzenlemeye neden olur. [67], [68]. Lösin amino asidinin, prolin amino asidine dönüşümünün V2 reseptör konformasyonunu olumsuz yönde etkileyeceği öngörülmektedir. Bu bilgilere dayanarak, L219P mutant reseptör proteininin fonksiyonel etkilerinin fazla olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen verilere bakıldığında hücre yüzeyinde ve totalinde ifade olan protein miktarlarının oldukça düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). L219P mutasyonunu içeren V2 reseptör proteininin oluşturduğu hücre yüzey ifadesi %2,7 ve total hücre ifadesi %29,7'dir. Proje kapsamında grubumuz tarafından gerçekleştirilen AVP ile uyarım sonucu herhangi bir cAMP cevabı oluşmamıştır. Bu nedenle herhangi bir  $E_{max}$  ve değeri  $EC_{50}$  değeri hesaplanamamıştır. Diğer mutant reseptörler farklı derecelerde sinyal oluştururken L219P mutasyonunu içeren V2 reseptör proteini, bir sinyal cevabı oluşturamamıştır (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.4). 219. kodonda meydana gelen bu mutasyonun, lösin amino asidini prolin amino asidine dönüştürmesi sonucunda, muhtemelen reseptör yapısında değişiklik meydana gelmiştir. Prolin amino asidinin üç boyutlu yapıya kattığı sabitlik, protein katlanmasını ve reseptörün yüzeye ulaşmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle reseptör fonksiyonunun işlevselliğinin neredeyse sıfırlandığı düşünülmektedir.

Yapılan bu tez çalışması sonucunda elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, yukarıda ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi H80Y, V88L, V215M ve L219P mutant reseptörleri hücre içerisinde yabancıl tipe oranla farklı derecelerde sentezlenmekte ve hücre yüzeyine farklı oranlarda ulaşabilmektedir. Hücre içerisindeki sentezi en düşük olan mutant reseptör L219P'dir. Buna bağlı olarak yüzeye ulaşması etkilenmekte ve reseptörün normal fonksiyonunu yerine getiremediği öngörülmektedir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda, her mutant reseptörün ER'de farklı düzeylerde takılı kaldığı düşünülmektedir. V2 reseptör fonksiyonu için gerçekleştirilen ELISA ve floresan

görüntüleme deneylerine ait sonuçlar, proje kapsamında grubumuz tarafından gerçekleştirilen cAMP, yarı ömür ve glikozilasyon deneyleri sonuçları ile uyum içerisindedir [54].

Genel olarak bakıldığında, V2 reseptör proteini üzerinde farklı amino asit değişimlerine sebep olan ve bu tez çalışması kapsamında incelenen nokta mutasyonları, farklı şekillerde etki mekanizmalarına sahiplerdir. Bu durum, konjenital NDI hastalığı semptomlarını ve bu semptomların şiddetlerini anlamamız için ilave bilgiler sunabilir. Nadir görülen bir hastalık olan konjenital NDI hastalığının doğru teşhisi ve tedavisi oldukça önemlidir. Mutant reseptörler üzerinde yapılan fonksiyon analizi çalışmalarının, hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına ve buna bağlı olarak tanı ve tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Böylece hastaların yaşam kalitesi artırılabilir ayrıca literatüre de katkı sağlanabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] H. A. J. Lu, “Diabetes insipidus.,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 969, pp. 213–225, doi: 10.1007/978-94-024-1057-0\_14, **2017**.
- [2] J. G. Verbalis, “Diabetes insipidus.,” *Endocr. Metab. Disord.*, pp. 177–185, doi: 10.1023/A:1022946220908, **2003**.
- [3] *Medical Facts and Observation*, vol. 2. **1792**.
- [4] L. U. Lacombe, *De la Polydipsie*. **1841**.
- [5] H. C. McIlraith and C. M. Glas, “Notes on some cases of Diabetes insipidus with marked family and hereditary tendencies,” vol. 140, no. 3605, pp. 767–768, doi: 10.1016/S0140-6736(01)87712-6, **1892**.
- [6] P. Trendelenburg, “Anteil der hypophyse und des hypothalamus am experimentellen diabetes insipidus,” vol. 7, no. 36, pp. 1979–1980, **1928**.
- [7] J. Lindholm, “Diabetes insipidus: Historical aspects,” *Pituitary*, vol. 7, no. 1, pp. 33–38, doi: 10.1023/B:PITU.0000044633.52516.e1, **2004**.
- [8] N. Knoers, H. van der Heyden, B. A. van Oost, H. H. Ropers, L. Monnens, and J. Willems, “Nephrogenic diabetes insipidus: close linkage with markers from the distal long arm of the human X chromosome,” *Hum. Genet.*, vol. 80, no. 1, pp. 31–38, doi: 10.1007/BF00451451, **1988**.
- [9] M. Birnbaumer *et al.*, “Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone,” *Nature*, vol. 357, pp. 333–335, **1992**.
- [10] W. Rosenthal *et al.*, “Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus,” *Nature*, vol. 359, pp. 233–235, **1992**.
- [11] W. Rosenthal, A. Antaramian, S. Gilbert, and M. Birnbaumer, “Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 18, pp. 13030–13033, doi: 10.1016/S0021-9258(19)38614-4, **1993**.

- [12] S. Qureshi, S. Galiveeti, D. G. Bichet, and J. Roth, “Diabetes Insipidus: Celebrating a Century of Vasopressin Therapy,” *Endocrinology*, vol. 155, no. 12, pp. 4605–4621, doi: 10.1210/en.2014-1385, **2014**.
- [13] M. Babey, P. Kopp, and G. L. Robertson, “Familial forms of diabetes insipidus: Clinical and molecular characteristics,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 7, no. 12, pp. 701–714, doi: 10.1038/nrendo.2011.100, **2011**.
- [14] J. A. Dürr, “Diabetes Insipidus in Pregnancy,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 9, no. 4, pp. 276–283, doi: 10.1016/S0272-6386(87)80122-1, **1987**.
- [15] M. Christ-Crain *et al.*, “Diabetes insipidus,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 5, no. 1, doi: 10.1038/s41572-019-0103-2, **2019**.
- [16] A. N. Makaryus and S. I. McFarlane, “Diabetes insipidus: Diagnosis and treatment of a complex disease,” *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 73, no. 1, pp. 65–71, doi: 10.3949/ccjm.73.1.65, **2006**.
- [17] M. Abbas, M. Iqbal, M. Iqbal, R. Javaid, and M. Ashraf, “Diabetes insipidus: the basic and clinical review,” *Int. J. Res. Med. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 5–11, doi: 10.18203/2320-6012.ijrms20160002, **2016**.
- [18] N. Di Iorgi *et al.*, “Diabetes insipidus - Diagnosis and management,” *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 77, no. 2, pp. 69–84, doi: 10.1159/000336333, **2012**.
- [19] L. L. I. Feldkamp, E. Kaminsky, T. Kienitz, and M. Quinkler, “Central Diabetes Insipidus Caused by Arginine Vasopressin Gene Mutation: Report of a Novel Mutation and Review of Literature,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 52, no. 11, pp. 796–802, doi: 10.1055/a-1175-1307, **2020**.
- [20] A. Garrahy, C. Moran, and C. J. Thompson, “Diagnosis and management of central diabetes insipidus in adults,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 90, no. 1, pp. 23–30, doi: 10.1111/cen.13866, **2019**.
- [21] I. Introduction, “Posterior Pituitary Hormones,” doi: 10.1016/B978-0-08-091906-5.00004-5, **2015**.
- [22] S. Kalra *et al.*, “Diabetes insipidus: The other diabetes,” *Indian J. Endocrinol. Metab.*, vol. 20, no. 1, pp. 9–21, doi: 10.4103/2230-8210.172273, **2016**.



- [23] J. Buggy and A. K. Jonhson, “Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hypernatremia.,” *Am. J. Physiol.*, vol. 233, no. 1, doi: 10.1152/ajpregu.1977.233.1.r44, **1977**.
- [24] G. P. Mavani, M. V. DeVita, and M. F. Michelis, “A review of the nonpressor and nonantidiuretic actions of the hormone vasopressin,” *Front. Med.*, vol. 2, p. 11, doi: 10.3389/fmed.2015.00019, **2015**.
- [25] H. Arima, Y. Azuma, Y. Morishita, and D. Hagiwara, “Central diabetes insipidus,” *Nagoya J. Med. Sci.*, vol. 78, no. 4, pp. 349–357, doi: 10.18999/nagjms.78.4.349, **2016**.
- [26] H. Land, G. Schütz, H. Schmale, and D. Richter, “Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor,” *Nature*, vol. 295, no. 5847, pp. 299–303, doi: 10.1038/295299a0, **1982**.
- [27] J. H. Christensen *et al.*, “Six novel mutations in the arginine vasopressin gene in 15 kindreds with autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus give further insight into the pathogenesis,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 12, no. 1, pp. 44–51, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201086, **2004**.
- [28] J.-P. Morello and D. G. Bichet, “Nephrogenic Diabetes Insipidus,” *Annu. Rev. Physiol.*, doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.607, **2001**.
- [29] D. G. Bichet, “V2R Mutations and Nephrogenic Diabetes Insipidus,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 89, no. 09, pp. 15–29, doi: 10.1016/S1877-1173(09)89002-9, **2009**.
- [30] M. Thibonnier, P. Coles, A. Thibonnier, and M. Shoham, “The Basic and Clinical Pharmacology of Nonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 41, pp. 175–202, **2001**.
- [31] C. S. Gal, G. Valette, G. Garcia, J. P. Maffrand, and G. Le Fur, “Nonpeptide vasopressin receptor antagonists : development of selective and orally active Via , V2 and V1b receptor ligands,” *Prog. Brain Res.*, vol. 139, pp. 197–210, **2002**.
- [32] D. G. Bichet and 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.*, vol. 30, no. 2, pp. 263–276, doi: 10.1016/j.beem.2016.02.010, **2016**.

- [33] J. A. Visser *et al.*, “Structure and Chromosomal Localization of the Human Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Gene,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 215, no. 3, pp. 1029–1036, doi: 10.1006/bbrc.1995.2567, **1995**.
- [34] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, and H. B. Schiöth, “The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints.,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1256–1272, doi: <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>, **2003**.
- [35] E. Spanakis and E. Milord, “AVPR2 Variants and Mutations in Nephrogenic Diabetes Insipidus: Review and Missense Mutation Significance,” *J. Cell. Physiol.*, no. August, pp. 605–617, doi: 10.1002/jcp.21552, **2008**.
- [36] E. Sağlar, F. Deniz, and B. Erdem, “A large deletion of the AVPR2 gene causing severe nephrogenic diabetes insipidus in a Turkish family,” *Endocrine*, vol. 46, pp. 148–153, doi: 10.1007/s12020-013-0043-7, **2014**.
- [37] S. Sasaki *et al.*, “Cloning, Characterization, and Chromosomal Mapping of Human Aquaporin of Collecting Duct,” vol. 93, no. 3, pp. 1250–1256, doi: 10.1172/JCI117079, **1994**.
- [38] T. M. Fujiwara and D. G. Bichet, “Molecular Biology of Hereditary Diabetes Insipidus,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, pp. 2836–2846, doi: 10.1681/ASN.2005040371, **2005**.
- [39] B. Erdem, E. Sağlar, T. Karaduman, M. Özcan, D. Şahin, and H. Mergen, “Rescue study of trapped AVPR2 mutants with chemicals,” *Endocr. Abstr.*, doi: 10.1530/endoabs.49.GP74, **2017**.
- [40] B. K. Tamarappoo and A. S. Verkman, “Defective Aquaporin-2 Trafficking in Nephrogenic Diabetes Insipidus and Correction by Chemical Chaperones,” *J. Clin. Invest.*, vol. 101, no. 10, pp. 2257–2267, doi: 10.1172/JCI2303, **1998**.
- [41] A. Ulloa-aguirre, J. A. Janovick, S. P. Brothers, and P. M. Conn, “Pharmacologic Rescue of Conformationally-Defective Proteins: Implications for the Treatment of Human Disease,” *Traffic*, vol. 5, pp. 821–837, doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00232.x, **2004**.

- [42] D. Şahin, “Bazı Farmakolojik Şaperonların Mutant AVPR2 Proteinlerinde Gözlenen Fonksiyon Kayıpları Üzerine Etkilerinin Araştırılması,” Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2018**.
- [43] R. J. Kaufman *et al.*, “The Unfolded Protein Response in Nutrient Sensing and Differentiation,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 411–421, doi: 10.1038/nrm829, **2002**.
- [44] E. Jequier and F. Constant, “Water as an essential nutrient : the physiological basis of hydration,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 64, pp. 115–123, doi: 10.1038/ejcn.2009.111, **2010**.
- [45] B. M. Popkin, K. E. D’Anci, and I. H. Rosenberg, “Water, Hydration and Health,” *Nutr. Rev.*, vol. 68, no. 8, pp. 439–458, doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00304.x, **2010**.
- [46] T. aki Koshimizu, K. Nakamura, N. Egashira, M. Hiroyama, H. Nonoguchi, and A. Tanoue, “Vasopressin V1a and V1b receptors: From molecules to physiological systems,” *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 4, pp. 1813–1864, doi: 10.1152/physrev.00035.2011, **2012**.
- [47] K. V. Juul, D. G. Bichet, S. Nielsen, and J. P. Nørgaard, “The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors,” *Am J Physiol Ren. Physiol*, vol. 306, doi: 10.1152/ajprenal.00604.2013, **2014**.
- [48] T. Schöneberg, A. Schulz, H. Biebermann, T. Hermsdorf, H. Römpler, and K. Sangkuhl, “Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 104, no. 3, pp. 173–206, doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.08.008, **2004**.
- [49] I. Bo, H. Krude, K. S. Marenzi, and S. Di Candia, “Functional characterization of novel loss-of-function mutations in the vasopressin type 2 receptor gene causing nephrogenic diabetes insipidus,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, pp. 1521–1528, doi: 10.1093/ndt/gfr487, **2012**.
- [50] W. M. Oldham and H. E. Hamm, “Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 1, pp. 60–71, doi: 10.1038/nrm2299, **2008**.

- [51] S. M. De Munnik, M. J. Smit, R. Leurs, and H. F. Vischer, “Modulation of cellular signaling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors,” vol. 6, pp. 1–28, doi: 10.3389/fphar.2015.00040, **2015**.
- [52] D. Chakravorty and S. M. Assmann, “G protein subunit phosphorylation as a regulatory mechanism in heterotrimeric G protein signaling in mammals, yeast, and plants,” *Biochem. J.*, vol. 475, pp. 3331–3357, doi: 10.1042/BCJ20160819, **2018**.
- [53] A. Ç. Tayfur and T. Karaduman, “A Novel Mutation in the AVPR2 Gene Causing Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus,” vol. 10, no. 4, pp. 350–356, **2018**.
- [54] H. Ö. Özdemirel, “In vitro şartlarda mutant AVPR2 proteinlerinin yarı ömür ve glikozilasyon özelliklerinin araştırılması,” Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2020**.
- [55] “Ensembl.”  
[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000126895;r=X:153902531-153907166](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000126895;r=X:153902531-153907166) (Erişim tarihi: **06 Ocak 2021**).
- [56] “NCBI Protein Blast.” <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Erişim tarihi: **06 Ocak 2021**).
- [57] J. J. M. Jr *et al.*, “Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations,” vol. 124, **1996**.
- [58] T. Schöneberg *et al.*, “V2 Vasopressin Receptor Dysfunction in Nephrogenic Diabetes Insipidus Caused by Different Molecular Mechanisms,” vol. 205, pp. 196–205, **1998**.
- [59] “AlphaScreen cAMP User Manual and Assay Development Guide For Research Use Only.” Available: <https://www.perkinelmer.com/product/alphascreen-camp-detection-kit-1000pts-6760635d>. (Erişim tarihi: **06 Ocak 2021**)
- [60] H. Ro, T. Hermsdorf, D. Thor, W. Busch, and A. Schulz, “Involvement of the V2 Vasopressin Receptor in Adaptation to Limited Water Supply,” vol. 4, no. 5, pp. 1–10, doi: 10.1371/journal.pone.0005573, **2009**.
- [61] H. Yuasa *et al.*, “Novel Mutations in the V2 Vasopressin Receptor Gene in Two Pedigrees with Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 79, no. 2, pp. 361–365, doi: 10.1210/jcem.79.2.8045948, **1994**.

- [62] M. F. Arthus *et al.*, “Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X- linked nephrogenic diabetes insipidus,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 11, no. 6, pp. 1044–1054, **2000**.
- [63] B. Erdem Tuncdemir, H. Mergen, and E. Saglar Ozer, “Evaluation of pharmacochaperone-mediated rescue of mutant V2 receptor proteins,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 865, no. November, p. 172803, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172803, **2019**.
- [64] D. Bockenhauer *et al.*, “Vasopressin type 2 receptor V88M mutation: Molecular basis of partial and complete nephrogenic diabetes insipidus,” *Nephron - Physiol.*, vol. 114, no. 1, doi: 10.1159/000245059, **2010**.
- [65] R. S. Wildin, D. E. Cogdell, and V. Valadez, “AVPR2 variants and V2 vasopressin receptor function in nephrogenic diabetes insipidus,” *Kidney Int.*, vol. 54, no. 6, pp. 1909–1922, doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00214.x, **1998**.
- [66] H. Il Cheong *et al.*, “Six novel mutations in the vasopressin V2 receptor gene causing nephrogenic diabetes insipidus,” *Nephron*, vol. 75, no. 4, pp. 431–437, doi: 10.1159/000189581, **1997**.
- [67] J. H. Robben, N. V. A. M. Knoers, and P. M. T. Deen, “Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model,” *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 289, no. 2 58-2, pp. 265–272, doi: 10.1152/ajprenal.00404.2004, **2005**.
- [68] M. Oueslati *et al.*, “Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V 2 receptor mutant by cell-penetrating peptides,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 28, pp. 20676–20685, doi: 10.1074/jbc.M611530200, **2007**.













