

**NEFROJENİK DİABETES İNSİPIDUS HASTALIĞINA  
SEBEP OLAN MUTANTLAR ÜZERİNDE BAZI  
FARMAKOLOJİK ŞAPERONLARIN ETKİ  
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION of the MECHANISMS to EFFECT of  
SOME PHARMACOLOGICAL CHAPERONES ON  
MUTANTS CAUSED BY NEPHROGENIC DIABETES  
INSIPIDUS DISEASE**

**ELİF MERVE AVCU**

**Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

## ÖZET

# NEFROJENİK DİABETES İNSİPIDUS HASTALIĞINA SEBEP OLAN MUTANTLAR ÜZERİNDE BAZI FARMAKOLOJİK ŞAPERONLARIN ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

**Elif Merve AVCU**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER**

**Ocak 2022, 69 sayfa**

G-protein bağlı reseptörler (GPCR) vücudumuzda birçok fizyolojik sürecin yönetilmesinde görev alan büyük bir integral membran proteini ailesidir. Reseptör üzerindeki amino asit dizilerinde meydana gelen mutasyonlar, reseptörü konformasyonel değişikliğe uğratarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Diabetes insipidus (DI), GPCR ile ilişkili mutasyonlardan kaynaklı gelişebilen bir hastalıktır. DI kendi içinde Santral DI (CDI), Nefrojenik DI (NDI), primer polidipsi ve gebelik sonucu meydana gelen poliüri olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır. X kromozomu üzerinde yer alan *AVPR2* geninde görülen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan NDI, polidipsi ve poliüri ile karakterize olan nadir kalıtsal bir hastalıktır. Bu mutasyonlar proteinlerin yanlış katlanmasına, endoplazmik retikulum (ER) kalite kontrol sistemlerinde takılmasına ve dolayısıyla fonksiyon kaybına neden olabilmektedir.

Bu tezin amacı, NDI'da fonksiyon kaybına neden olduğu önceki çalışmalarla gösterilmiş olan R68W, V162A ve T273M mutant *AVPR2* proteinlerinin üzerinde

YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonlarının uygulanması sonucu bu mutant proteinlerin ER kalite kontrol sisteminden kurtarılıp kurtarılamadığının araştırılmasıdır.

Bu tez kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalarda uygulanan YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonların dozlarının belirlenebilmesi için MTT ve Tripin mavisi yöntemi ile % hücre canlılıkları hesaplanmıştır. Yabani tip ve mutant pLV2R vektörleri COS-1 hücrelerine transfekte edilmiştir. Yabani tip ve mutant AVPR2 genini içeren pLV2R vektörlerinin hücre yüzeyindeki ve hücre içerisindeki total miktarının tayini için hücre yüzey ELISA ve total ELISA yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca mutant reseptörlerin hücre yüzey karakteristiklerinin ölçülmesi için Flow sitometri yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar literatür taraması yapılarak farklı şaperon uygulamaları ile karşılaştırılmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda R68W, V162A ve T273M mutant reseptörleri üzerinde uygulanan YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonların hücre yüzeyindeki ifadelerini mutant proteinlerin tipine göre değişen düzeylerde arttırdığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** GPCR, Diabetes İnsipidus, Nefrojenik Diabetes İnsipidus, AVPR2, farmakolojik şaperon

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION of the MECHANISMS to EFFECT of SOME PHARMACOLOGICAL CHAPERONES ON MUTANTS CAUSED BY NEPHROGENIC DIABETES INSIPIDUS DISEASE**

**Elif Merve AVCU**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER**

**January 2022, 69 pages**

G-protein coupled receptors (GPCRs) are a large family of integral membrane proteins involved in the management of many physiological processes in our body. Mutations in the amino acid sequences on the receptor cause conformational changes in the receptor, leading to the emergence of various diseases. Diabetes insipidus (DI) is a disease that may develop due to mutations associated with GPCR. DI is subdivided into Central DI (CDI), Nephrogenic DI (NDI), primary polydipsia, and pregnancy-induced polyuria. NDI, which is caused by mutations in the AVPR2 gene located on the X chromosome, is a rare inherited disease characterized by polydipsia and polyuria. These mutations may cause proteins to misfold and retain in ER quality control systems, and thus cause loss of function.

The aim of this thesis is to investigate whether these mutant proteins can be rescued from the ER quality control system as a result of the application of YM087 and VPA985 pharmacological chaperones on R68W, V162A and T273M mutant AVPR2 proteins, which have been shown in previous studies to cause loss of function in NDI.

In order to determine the doses of YM087 and VPA985 pharmacological chaperones, which performed in all experimental studies within the scope of this thesis, % cell viability was calculated by MTT and Trypan blue method. Wild-type and mutant pLV2R vectors were transfected into COS-1 cells. Cell surface ELISA and total ELISA methods were performed for the determination of the total amount of pLV2R vectors, containing wild type and mutant AVPR2 gene, on the cell surface and inside the cell. In addition, flow cytometry method was performed to measure the cell surface characteristics of mutant receptors. The results were compared with different chaperone applications by searching the literature.

In the studies carried out within the scope of this thesis, it was observed that YM087 and VPA985 pharmacological chaperones applied on the R68W, V162A and T273M mutant receptors increased their expression on the cell surface at varying levels depending on the type of mutant proteins.

**Keywords:** GPCR, Diabetes Insipidus, Nephrogenic Diabetes Insipidus, AVPR2, pharmacological chaperone

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesi ve bilgi birikimi ile bana yol gösteren, emek ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER'e,

Tez çalışmam boyunca karşılaştığım her sorunda beni sabırla dinleyerek yardımlarını esirgemeyen ve her an desteğini hissettiğim değerli hocam Sayın Dr. Beril ERDEM TUNÇDEMİR'e,

Tez dönemim boyunca iş hayatımda beni anlayışla karşılayan ekip arkadaşlarıma,

Tez dönemimde tanışmış olduğum ve her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Ezel DEMİR ve Ayça BOSTANOĞLU'na,

Tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini bir an olsun esirgemeyen canım aileme,

Özellikle hayat ışığım ve en yakın arkadaşım olan, her zaman arkamda duran canım annem Solmaz AVCU'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**BU TEZ ÇALIŞMASI HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA  
PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ FBA-2020-18843 NUMARALI PROJE  
TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. G Protein Bağlı Reseptörler .....	3
2.2. G Protein Bağlı Reseptör Mutasyonları.....	6
2.3. G Protein Bağlı Reseptör İlişkili Olan Nadir Hastalık Diabetes İnsipidus.....	9
2.3.1. Santral Diabetes İnsipidus.....	10
2.3.1.1. AVP Geni .....	12
2.3.2. Nefrojenik Diabetes İnsipidus.....	14
2.3.2.1. AQP2 Geni.....	17
2.3.2.2. AVPR2 Geni.....	18
2.4. Şaperon Uygulamaları .....	20
2.4.1. Kimyasal Şaperonlar .....	20
2.4.2. Farmakolojik Şaperonlar .....	22
2.4.2.1. Agonistler .....	24
2.4.2.2. Antagonistler .....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. pLV2R İfade Vektörlerinin Çoğaltılması .....	29
3.2. COS-1 Hücrelerinin Kültürasyonu .....	30
3.3. COS-1 Hücrelerinin Transfeksiyonu .....	32
3.4. Farmakolojik Şaperonlar için Uygun Konsantrasyonların Belirlenmesi.....	32



3.4.1. MTT Testi .....	33
3.4.2. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi.....	34
3.5. ELISA Deneyleri ile COS-1 Hücrelerindeki Reseptör İfadesinin Belirlenmesi.....	35
3.5.1. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi .....	35
3.5.2. Total ELISA Yöntemi .....	36
3.6. Flow Sitometri Yöntemi ile COS-1 Hücre Yüzeyindeki Reseptör İfadesinin Belirlenmesi .....	37
3.7. İstatistiksel Yöntemler .....	39
4. SONUÇLAR.....	40
4.1. COS-1 Hücrelerinin Üretilmesi ve Transfeksiyonu.....	40
4.2. MTT Analizi Sonuçları .....	41
4.3. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi Sonuçları .....	43
4.4. Hücre Yüzey ELİSA Yöntemi Sonuçları.....	44
4.5. Total ELİSA Yöntemi Sonuçları .....	46
4.6. Flow Sitometri Yöntemi Sonuçları .....	48
4.7. Verilerin Analizi .....	50
5. TARTIŞMA .....	52
5.1 YM087 .....	53
5.2 VPA985 .....	56
6. KAYNAKLAR .....	59
7. EKLER.....	70
EK 1 - Tez Çalışması Orijinallik Raporu.....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	71

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. GPCR Sinyal Şeması .....	5
Şekil 2.2. Protein Katlanma Süreçleri .....	8
Şekil 2.3. AVP'nin Toplama Kanalının Ana Hücrelerinde Su Geçirgenliğini Artırma Etkisinin Şematik Gösterimi .....	13
Şekil 2.4. NDI'a Neden Olan Hücre Zarına Gömülü AQP2 Yapısının Şematik Gösterimi .....	18
Şekil 2.5. 193 Olası AVPR2 Mutasyonunun Şematik Temsili.....	20
Şekil 2.6. GPCR Ligandları ve Etkileri .....	25
Şekil 2.7. AVPR2'nin Peptit Olmayan Antagonistleri .....	27
Şekil 4.1. COS-1 Hücrelerinin Beyaz Işık Altında Alınan Görüntüleri .....	40
Şekil 4.2. Transfeksiyon Sonrası COS-1 Hücresi Görüntüleri .....	41
Şekil 4.3. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonlarının Uygulanması Sonrası Elde Edilen MTT Grafiği .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b> 2
Şekil 4.4. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonlarının Uygulanması Sonrası Hücrelerin Tripan Mavisi ile % Canlılık Grafiği .....	44
Şekil 4.5. Mutant AVPR2'lerin Farmakolojik Şaperon Uygulaması Sonrası Hücre Yüzey ELISA Grafiği .....	45
Şekil 4.6. Karşılaştırmalı Hücre Yüzey ELISA Grafiği .....	46
Şekil 4.7. Mutant AVPR2'lerin Total ELISA Grafiği .....	47
Şekil 4.8. Karşılaştırmalı Total ELISA Grafiği .....	48
Şekil 4.9. YM087 Uygulaması Sonrası Flow Sitometri Grafiği.....	49
Şekil 4.10. VPA985 Uygulaması Sonrası Flow Sitometri Grafiği .....	50
Şekil 4.11. YM087 ve VPA985 Flow Sitometri Kromotogram Görüntüsü .....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneysel Çalışmalara Göre Kullanılan Hücre Miktarları ve Transfeksiyon Koşulları .....	32
Çizelge 4.1. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonları için MTT Uygulamasının % Sonuçları.....	42
Çizelge 4.2. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonlarının Uygulanması Sonrası Hücrelerin Tripan Mavisini ile Boyama Sonuçları.....	43
Çizelge 4.3. Mutant AVPR2'lerin Hücre Yüzey ELISA Sonuçları .....	45
Çizelge 4.4. Mutant AVPR2'lerin Total ELISA Sonuçları .....	47
Çizelge 4.5. Mutant AVPR2'lerin Flow Sitometri Yöntemi Sonuçları .....	49
Çizelge 4.6. Mann-Whitney U Testi Sonuçlarına Göre P Değerleri .....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$	Mikro
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
$\gamma$	Gama

### Kısaltmalar

ATP	Adenozin trifosfat
ATCH	Adrenokortikotropik hormon
AVPR2	Arginin Vazopressin Reseptörü 2
AVP	Arginin Vazopressin
AQP	Aquaporin
AKAP	Protein kinaz A bağlayıcı protein
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
CGRP	Kalsitonin Geniyle İlişkili Peptid
$Ca^{±2+}$	Kalsiyum
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CDI	Santral Diabetes insipidus
CFTR	Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici

COS1	CV1 Origin SV40
DI	Diabetes insipidus
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
ECL	Hücre dışı döngü
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	Endoplazmik retikulum ile ilişkili bozunma
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSH	Folikül uyarıcı hormon
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
GPCR	G protein Bağlı Reseptör
GABAB	$\gamma$ -aminobütirik asit G protein Bağlı Reseptör
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
GQC	Golgi kalite kontrol
GTPaz	Guanozin trifosfataz
GH	Büyüme hormonu
GHRH	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GHSR	Büyüme Hormonu Sekretagogu Reseptörü
GSK	Glikojen sentaz kinaz
g	g kuvveti
HCl	Hidroklorik asit
ICL	Hücre içi döngü
kg	Kilogram

kDa	kiloDalton
LH	Luteinize edici hormon
LB	Luria-Bertani
L	Litre
mGluR	Metabotropik Glutamat Reseptörleri
mRNA	messenger Ribonükleik asit
MC4R	Melanokortin 4 reseptörü
MTT	Metiltiazoldifenil Tetrazolyum Tuzları
M	Molar
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
mM	Milimolar
NDI	Nefrojenik Diabetes insipidus
NaCl	Sodyum klorür
NAFLD	Nonalkolik Yağlı Karaciğer hastalığı
PKA	Protein kinaz A
PLC	Fosfolipaz C
PKC	Protein kinaz C
PMQC	Plazma membran kalite kontrolü
PCSK1	Prohormon konvertaz
PC	Farmakolojik şaperon
4-PBA	4-Fenilbütirat
PBS	Fosfat tamponlu salin
SOÇ	Supraoptik çekirdek
TMD	Transmembranal sarmal
TSHR	Tiroid uyarıcı hormon reseptörü

TMAO	Trimetilamin N-oksit
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
UPR	Katlanmamış protein yanıtı
U/ml	Mililitre başına ünite
V2R	Arjinin vazopressin reseptörü
WFS1	Wolfram sendromu 1

# 1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki fizyolojik işlevlerin neredeyse tamamına yakını proteinler tarafından düzenlenmektedir. İnsan vücudu yaklaşık olarak 100.000 protein türü içerebilmektedir. Her proteinin kendine özgü bir biyolojik işlevi bulunmaktadır. Sahip oldukları bu işlevleri yerine getirebilmek için bu proteinlerin, primer yapılarında bulunan amino asit dizilerince belirlenen spesifik konformasyonel durumlarına katlanması ve aktif olacakları son hallerini almaları gerekir. Her bir proteinin aktivite gösterecekleri üç boyutlu yapılarına katlanması sahip oldukları polipeptit zincirlerinin içerdikleri amino asitler tarafından kodlanmakta ve belirlenmektedir [1]. Proteinlerin doğal konformasyonlarına katlanmaları ER tarafından kontrol edilir. ER'daki kalite kontrol sistemlerinin varlığı sadece doğru katlanmış proteinlerin geçişine izin vermektedir. Yanlış katlanarak kendi doğal konformasyonlarına ulaşamayan proteinler ER tarafından proteolitik bozunmaya uğramaktadır [2]. Yanlış katlanmış proteinler hücrede ya fonksiyon kaybına neden olmaktadır ya da hücre içinde birikerek toksik fonksiyon kazanımı sağlamaktadır. Örneğin, mutasyonlar sonucu proteinlerde fonksiyon kaybına neden olan ve bu sebeple ortaya çıkan kistik fibrozis ve  $\alpha$ 1-antitripsin ( $\alpha$ 1-AT) eksikliği proteinlerin bozunmasından kaynaklı iyi bilinen kalıtsal hastalıklardır. X kromozomunda kalıtılan *AVPR2* genindeki mutasyonların neden olduğu proteinlerdeki yanlış katlanmalar sonucu ortaya çıkan Nefrojenik Diabetes İnsipidus'da (NDI) bu grup içerisinde yer almaktadır [3, 4]. Toksik kazanım sağlayan proteinler ise yarı kararlı proteinler olup toksisite ile bağlantılı olarak agregasyona uğrarlar. En belirgin olarak Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığını (PD) ve ayrıca tip II diyabet, belirli kalp hastalığı ve kanser türleri bu grup içerisine dahil edilmektedir [3]. Hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak farmakolojik şaperon kullanımı ile proteolitik bozunma ve termal denatürasyona karşı şaperonların proteinlere bağlanarak, proteinleri kararlı halde tutmaları amaçlanmaktadır. Farmakolojik şaperonlar proteinleri doğru katlanmış formlarına göre stabilize etmeyi amaçlar ve bu şekilde yanlış katlanmaların engellenmesi hedeflenmektedir [5]. Düşük molekül ağırlığına sahip olan farmakolojik şaperonlar, proteinlere spesifik olarak bağlanarak yeniden katlanmayı veya protein yapısının kararlılığını teşvik ederek protein



fonksiyonunu geri kazandıran bileşiklerdir [6]. Yanlış katlanmış protein moleküllerinin herhangi bir tedavi sürecinden geçmeden kendi doğal konformasyonlarına tekrar katlanması az rastlanan bir durumdur. Protein hedeflerine özgül olarak bağlanan farmakolojik şaperonlar kalite kontrol sistemlerinden geçemeyip ER içerisinde tutuklu kalmış olan hedef proteinleri kararlı hale getirerek ER'den çıkışını ve Golgi üzerinden nihai hedeflerine ulaşmasını sağlamaktadır. Böylece hücre içerisindeki doğru katlanmış protein konsantrasyonlarında artışa neden olacaktır. Lizozomal enzimler, GPCR'ler ve iyon kanalları dahil olmak üzere birçok farklı protein türünün proteostazını arttırmak için farmakolojik şaperon uygulaması mevcuttur [7].

Bu tez kapsamında, grubumuzun yaptığı önceki çalışmalarda tanımlanan ve fonksiyon kayıplarına neden olduğu belirlenmiş olan (SBAG112S513) R68W, V162A ve T273M mutant reseptörlerin farmakolojik şaperonlar aracılığı ile yüzey ifadelerinin geri kazandırılması hedeflenmiştir. Sonuç olarak, kullanılan şaperonların söz konusu mutant reseptörlerin yüzey ifadelerini mutant proteinlerin tipine göre değişen düzeylerde arttırdığı belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 G Protein Bağlı Reseptörler

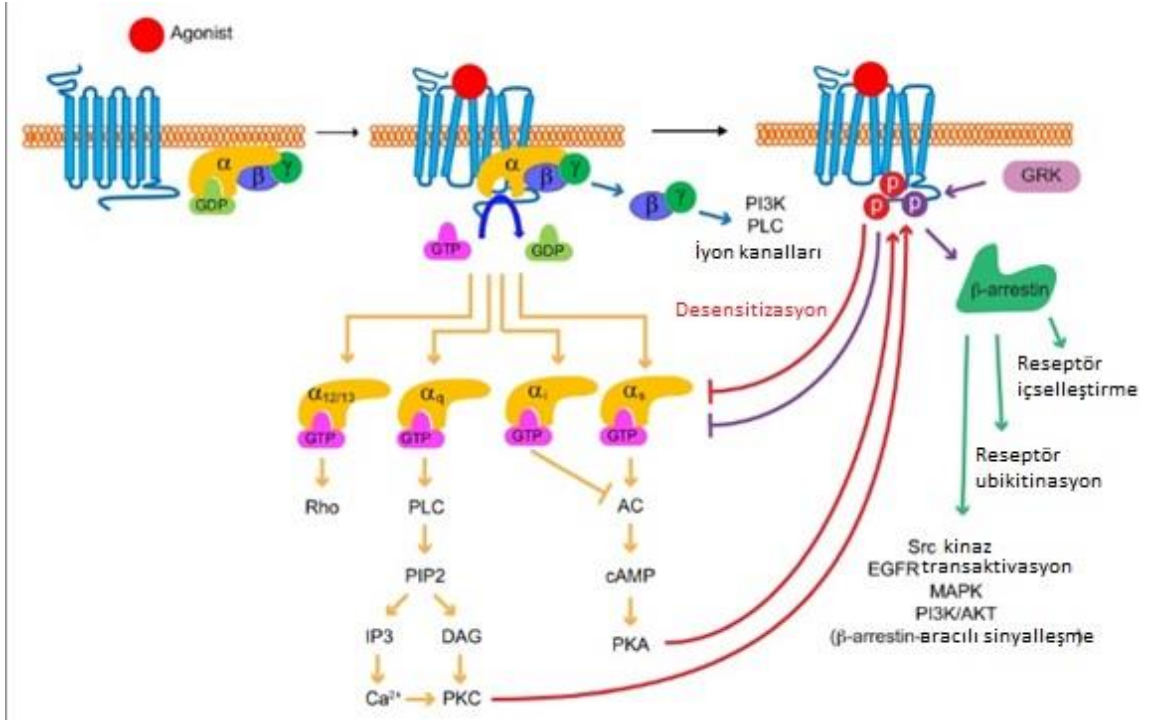
İnsan genomunda yaklaşık 800'den fazla G protein bağlı reseptör bulunduğu bilinmektedir. Hücre içi sinyal iletiminde anahtar rol gören GPCR'ler hücre dışı sinyal kaynakları olarak görev alan iyonları, fotonları, küçük organik molekülleri ve proteinleri algılayarak organizmada hücrel aktiviteyi ve homeostazı sağlamaktadır [1]. GPCR'ler yapısal olarak temelde hücre içi (C-terminali) ve hücre dışına (N-terminali) uzanan 7 adet transmembranal  $\alpha$ -heliks segment (TMD1-TMD7), 3 adet hücre dışı döngü (ECL1-ECL3) ve 3 adet hücre içi döngüden (ICL1-ICL3) oluşmaktadır [2]. Karboksil terminal alanları (ICL1, ICL2 ve ICL3) reseptörün kinaz aracılı fosforilasyonu ve desensitizasyonu için Ser/Tyr kalıntıları içerebilmektedir. Bazı GPCR'lerde palmitoilasyon olarak hizmet eden sistein kalıntısı bulunmaktadır [3].

GPCR'ler kendi içlerinde rodopsin (A ailesi), sekretin (B ailesi), glutamat (C ailesi) feromon (D ailesi), cAMP (E ailesi) ve frizzled GPCR (F ailesi) olmak üzere altı alt aileye bölünmüştür. İnsan genomunda sadece rodopsin, sekretin, glutamat ve frizzled aileleri bulunmaktadır [2]. En büyük aile grubunu oluşturan rodopsin ailesi (A ailesi) katekolamin, nöropeptid, kemokin, glikoprotein, lipid, nükleotid ve  $\beta$ -adrenerjik reseptörler de dahil olmak üzere küçük ligand molekülleri için G protein bağlı reseptörleri içermektedir [2, 4]. Rodopsin ailesi kendi içinde 3 gruba ayrılmaktadır. Birinci grubun bağlanma bölgeleri 7 transmembranal segment içinde, ikinci grubun bağlanma bölgeleri N-terminali ve transmembranal segmentlerin üst kısmında ve üçüncü grubun bağlanma bölgeleri ise çoğunlukla hücre dışında lokalize olmuştur [3]. Büyük bir N-terminal ektodomainin varlığı ile de karakterize edilen sekretin ailesi (B ailesi) kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP), glukagon, büyüme hormonu salgılayan hormon reseptörlerini, glutamat ailesi (C ailesi) kalsiyum algılayıcı, metabotropik glutamat (mGluR) ve  $\gamma$ -amino bütirik asit (GABAB) reseptörlerini içermektedir [2-4].

Yapılan analizler sonucu GPCR'lerin uzunluklarının 311 ile ~1.490 amino asit kalıntısı arasında değişebileceği gösterilmiştir. Ayrıca GPCR'lerin ökaryotik genlerin yanı sıra viral genler tarafından da kodlanabileceği ortaya çıkarılmıştır [5]. Büyük bir kısmı glikoprotein yapıda olan GPCR'lerin ömrü, mRNA transkripsiyonu sonrası ribozomlarda polipeptit zincirlerin sentezlenmesiyle başlamaktadır. Ardından endoplazmik retikulumda polipeptitlere yüksek mannoz içeren olgunlaşmamış karbonhidratlar eklenerek moleküler şaperonlar aracılığıyla Golgi aygıtına aktarılmakta ve son halini burada alan reseptör gerekli düzenlemeler sonucu hücre yüzeyine taşınmaktadır [6].

Hücre için sinyal üretiminde yer alan GPCR'ler heterotrimerik yapıda olup  $G\alpha$ ,  $G\beta$ , ve  $G\gamma$  alt birimlerinden oluşmaktadır [7]. Hücre dışı bir ligand molekülü ise GPCR'ye bağlanarak konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Bu şekilde aktif hale geçen reseptör ile hücre sel yanıtın oluşmasında ilk adım atılmış olunur [3, 8]. GPCR'ye bağlanan ligand molekülü reseptörün guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) olarak plazma membranında yer alan G proteinlerinin alımını indükler ve  $G\alpha$  alt biriminde yer alan GDP'nin (guanozin difosfat) GTP'ye (guanozin trifosfat) dönüşerek aktivasyonunu sağlar [9]. GTP'nin aktivasyonu ile birlikte çeşitli iyon kanalları, ikincil haberciler gibi ligand molekülleri ile iletişime geçilerek vücuttaki çeşitli fizyolojik olayların gerçekleşmesini sağlamaktadır. İnaktivasyon sürecinde  $G\alpha$  birimi GTP'yi GDP'ye hidrolize ederek dimerik  $\beta\gamma$  alt birimleriyle yeniden bağlanılmasını ve aktivasyonun sona ermesini sağlamaktadır. Yapılan araştırmalarda molekül ağırlıkları 39-52 kDa arasında 21  $G\alpha$ , 35-39 kDa arasında 6  $G\beta$  ve 7-8 kDa arasında 12  $G\gamma$  alt birimi tanımlanmıştır [10].  $G\alpha$ , guanin nükleotid bağlama bölgesi ile doğal GTPaz etkinliğinden sorumlu  $G\alpha$  alt birimlerinin amino asit benzerliği göz önüne alınarak 4 ana sınıfa ayrılmıştır.  $G\alpha$  stimülatör ( $G_{\alpha s}$ ),  $G\alpha$  inhibitör ( $G_{\alpha i}$ ),  $G_{\alpha q}$  ve  $G_{\alpha 12/13}$  olmak üzere sahip oldukları bu çeşitlilik ile sinyal iletim yolunda farklı düzenleyici görevlere izin vermektedirler [11].  $G_{\alpha s}$ , adenilil siklaz enzimini uyararak adenozintrifosfatı (ATP) ikincil haberci olan siklik AMP'ye (cAMP) dönüştürür ve hücre içinde cAMP birikimine neden olur. Hücre içindeki bu birikim protein kinaz A'nın (PKA) aktivasyonunu sağlayarak hücre içi tepkileri düzenleyen proteinlerin fosforilasyonunu sağlamaktadır. Böylece hücre sel yanıt oluşmaktadır. Bu tepkimenin tersi yönde işlemlerini sağlayan  $G_{\alpha i}$  adenilil siklaz üzerinde inhibitör etkisi oluşturarak hücre

içindeki cAMP'yi azaltmaktadır. Gαq, fosfolipaz C'yi (PLC) aktive ederek diasilgliserolün ve fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın ikincil habercileri olan inositol 1,4,5-trifosfat bölünmesine yol açar ve ER'dan Ca<sup>+2</sup> salınımını artırır. Hücre içinde artan Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu ve diasilgliseroller protein kinaz C'yi (PKC) aktive ederek hücre içi sinyallerin oluşmasını sağlar. GTPaz Rho'nun Gα12/13 tarafından aktive olduğu bilinmektedir [11-13].



Şekil 2.1. GPCR Sinyal Şeması [13] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır. Agonist ligand bağlanması, GPCR'ler heterotrimerik G proteinleri (guanin nükleotid bağlayıcı proteinler) ile etkileşime girer. G proteinleri, α alt birimi üzerinde bir GDP-GTP değişimine uğrar, bu da α ve βγ alt birimlerinin ayrışmasına ve ardından aşağı akış sinyal efektörlerinin aktivasyonuna yol açar. G proteini ile aktive olan PKC ve PKA sırayla reseptörü fosforile eder ve G protein sinyalini kapatır (heterolog duyarsızlaştırma, kırmızı çizgi ve fosfat). GPCR kinaz (GRK) aracılı GPCR fosforilasyonu, β-tutuklamaların alınmasına yol açar, bu da G-protein etkileşimini (homolog duyarsızlaştırma, mor çizgi ve fosfat) sterik olarak engelleyerek desensitizasyona ve ardından reseptör içselleştirmesine ve ubiquitinasyona neden olur. Reseptör ile β-arrestin bağlantısı ayrıca β-arrestin aracılı sinyalleşmenin aktivasyonunu başlatır. AC, adenilat siklazı belirtir; AKT, aynı zamanda protein kinaz B olarak da bilinen bir serin/treonin kinaz; DAG, diasilgliserol; EGFR, epidermal büyüme faktörü

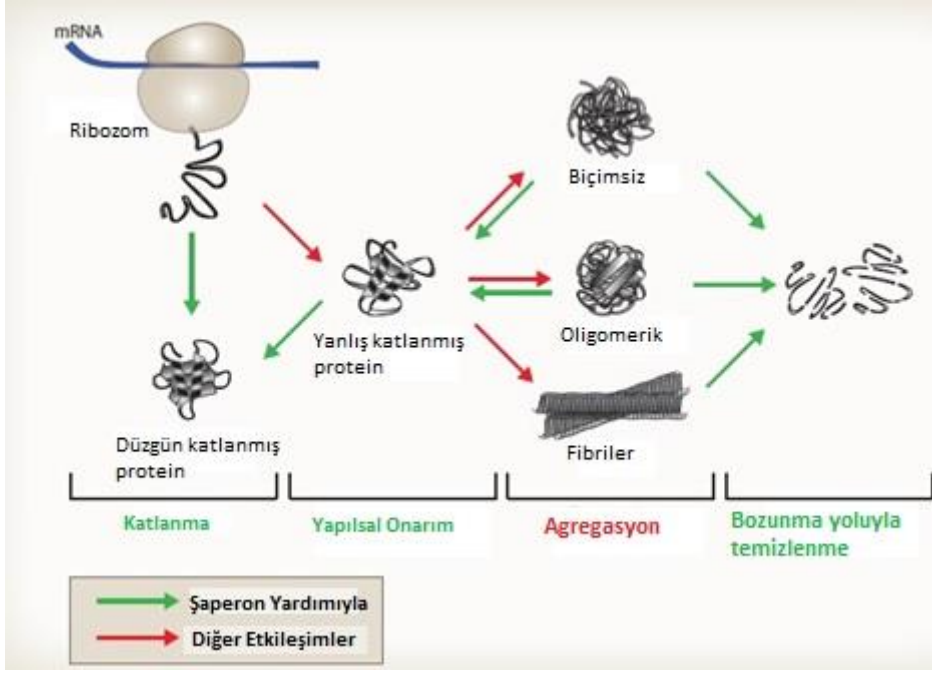
reseptörü; IP3, inositol-1,4,5-trifosfat; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; PI3K, fosfoinositid 3-kinaz; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bifosfat ve PLC, fosfolipaz C.

## 2.2 G Protein Bağlı Reseptör Mutasyonları

$\alpha 1$  adrenerjik reseptörü üzerinde yapılan mutajenez çalışmaları ile birlikte GPCR'lerin sahip olduğu mutasyonların reseptör üzerinde aktive veya inaktive etkisi sonucu hastalıklara sebep olabileceği kavramı ortaya atılmıştır [14]. İnaktivasyon mutasyonları GPCR'lerin sinyal transdüksiyonunda kusurlara neden olarak reseptörün fizyolojik sinyallere yanıt vermesini tam veya kısmi olarak engellemektedirler. Bu mutasyonlar içerisinde baz delesyonları/insersiyonları, çerçeve kayması, genin kısmi veya tamamen delesyonu ve tek nükleotid mutasyonları yer almaktadır. Bu mutasyonların çoğu birkaç nesil aktarılan resesif ya da *de novo* mutasyonlardır [10]. Mutasyonların endokrin hastalıklar, obezite ve kanserin de dahil olduğu 30'dan fazla hastalığa yol açtığı bilinmektedir [15].

Hücre içerisinde yeni üretilen GPCR'ler, ER'nin kalite kontrol sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Ökaryotik hücrelerde taşıma ve proteinlerin katlanması gibi birçok işleve sahip olan ER, uzun tübüllerden ve disklerden oluşmuş yapısıyla sitoplazmanın büyük bir kısmını kaplayan membranöz ağ sistemidir [16]. ER, hücrede işlev gören proteinlerin neredeyse tamamına yakınının sentezinde, proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasında ve yapısal olarak olgunlaşması gibi süreçlerde yer almaktadır [17]. Hücrelerdeki proteinlerin çoğunun ilk yolculukları ER'de başlamaktadır. ER'ye ulaşması hedeflenen proteinler ribozomlarda sentezlenirken sahip oldukları N-terminal sinyal dizisi ile ER zarına yönlendirilirler. ER'ye ulaşan proteinler son hallerini almak üzere üç boyutlu katlanmalarını, disülfid bağı oluşumu ve glikosilasyon gibi modifikasyonlar geçirirler. Bu süreçler ER'de bulunan enzimler, şaperonlar ve glikozile edici enzimler aracılığıyla katalizlenmektedir [18, 19]. ER'de protein homeostazını koruma ve yanlış katlanmaları engellemek için kalite kontrol sistemleri gelişmiştir. Kalite kontrol mekanizmaları üç ana eksen üzerine kurulmuştur. Bu sistemler ER ile ilişkili bozunma (ERAD), Golgi kalite kontrol (GQC) ve plazma membran kalite kontrolünü (PMQC) içermektedir. Her bir süreç katlanmamış protein yanıtı (UPR) tarafından bir dereceye kadar düzenlenmektedir [20]. Bu kalite kontrol sistemleri

tarafından kontrol edilen proteinler içerisinde yalnızca doğru katlanmış olanlar hücre yüzeyine ulaşabilmektedir. ER'deki proteinlerin katlanma kapasitesi hücreler arasında farklılık göstermektedir. Genellikle fazla miktarda protein salgılayan hücrelerde iyi gelişmiş ER'ler bulunmaktadır. Örneğin insüline dirençli durumlarda pankreasın  $\beta$  hücreleri dakikada bir milyondan fazla sentezleme kapasitesine sahiptir [21]. Mutasyonların neden olduğu yanlış katlanmalar proteinlerin kendi hedeflerine ulaşmasını engeller ve fonksiyonlarını yerine getiremeyerek birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. [10, 15, 22]. Protein katlanma yükü ER kapasitesini aştığı durumlarda ise hücrelerde ER stresi oluşabilmektedir. Stres durumlarında ER'deki protein katlanmalarının bozulabildiği, hipoksi, organelde besin yoksunluğu ve yanlış katlanmış protein birikimleri oluşabilmektedir [23]. Genellikle ER'nin kalite kontrol mekanizmasından geçen mutant bir GPCR hücre yüzeyine ulaşabilir. Ancak yapılan araştırmalar sonucu mutant reseptörlerin ligand moleküllerine düşük afinite gösterdiği ortaya çıkmıştır [10, 22, 24]. Örneğin, trombosit aktivasyonunu indüklemek için ADP tarafından aktive edilen purinerjik reseptördeki (P2RY12) Arg256Gln mutasyonu amino asit pozisyonunda değişime neden olarak agonist bağlama bölgesini değiştirir ve etkin bir ligand-reseptör kenetlenmesi görülmediği için konjenital kanama bozukluğuna neden olmaktadır [25]. Evrimsel süreç boyunca korunmuş olan bu reseptör pozisyonlarında meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar çoğunluğu oluşturmaktadır. Örneğin, Nefrojenik Diabetes İnsipidus'a neden olan AVPR2'deki mutasyonların %62'si bu gruba dahil olmaktadır [26]. Hücre dışındaki  $Ca^{+2}$ 'a karşı duyarsızlığa yol açan GPCR'lerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları adrenokortikotropik hormon (ACTH), tiroid uyarıcı hormon (TSH), büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH), folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH) ve vazopressin gibi hormon reseptörlerinin ilgili hormonlarına karşı direnç göstererek hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır [26, 27].



Şekil 2.2. Protein Katlanma Süreçleri [28] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır.

Mutasyonlar sonucu GPCR'lerin inaktivasyonu veya genlerin kaybı her zaman yaşamı tehdit eden patolojiler ile sonuçlanmamaktadır. DNA dizileme yöntemleri kullanılarak 90'dan fazla mutasyonlu gen tanımlanmıştır ancak bu mutasyonlara sahip bireylerde herhangi bir hastalık etkeni gözlemlenmemiştir [29]. %95'ini yanlış anlamalı mutasyonların oluşturduğu GPCR genlerindeki kusurların yaklaşık olarak %21'i monogenik hastalıklara neden olan aktive edici mutasyonları içermektedir [30]. Bu mutasyonların çoğu 7 transmembranal segmentin sarmallarında yer alıp reseptör fosforilasyonunu reseptörün değişen konformasyonları tarafından aktive edilebilmektedir [31]. Yapılan çalışmalar sonucu 4. transmembran sarmalda aktive edici bir mutasyon bulunmazken çoğunun 6. transmembran sarmalında biriktiği gözlenmiştir. Sonuç olarak aktive edici mutasyonlar reseptör bozulmasını azaltarak reseptörün hücre yüzeyi ekspresyonunu arttıracak ve G protein sinyalini fazlaştıracaktır [32]. Hipofiz bezinden salgılanan TSH tiroid foliküler hücrelerin bazolateral membranındaki tirotropin reseptörüne (TSHR) bağlanarak tiroid bezini düzenlemektedir. Reseptörün hücre içi sarmallarında reseptör aktivasyonu sağlayan delesyonlar tespit edilmiştir. Amino asit delesyonları sonucu oluşan mutasyonların agonist bağlanmalara benzer bir davranış gösterdiği açığa çıkarılmıştır. Bu mutasyonlar otozomal dominant hipertiroidizme ve toksik tiroid nodüllerine neden olmaktadır [33]. G protein bağlı reseptörlerin artan aktivitesi her zaman mutasyon kaynaklı olmayıp endojen

agonistlerden de kaynaklıdır [34]. GPCR'lerin birden fazla agonistin olduğuna dair yapılan ilk çalışmalar  $\beta$ 1-adrenerjik reseptörün doğal endojen agonistleri olan adrenalin, noradrenalin ve dopaminin reseptör aktivasyonunun artışıyla ortaya çıkarılmıştır. Böylece tek bir agonistin reseptörü aktive ettiğine dair hipotez de çürütülmüştür. Bu yüzden mutasyonlar bir agonistin bağlanmasını etkileyerek kısmi olarak fonksiyon kaybına neden olabilmektedir [35]. GPCR'lerin herhangi bir ligand tarafından uyarılmadığı zaman bile kendi içlerinde bir dengede bulunarak bazal aktivite gösterebildiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda bazı yabancıl tip reseptörlerin herhangi bir agonist varlığı olmadığında bile yüksek bazal aktivite gösterebildiği gözlenmiştir [36]. Bazal aktivite kayıpları sonucu ortaya çıkabilecek patofizyolojik ilişkilerine örnek olarak, metabolik yolda etkili olan melanokortin-4 reseptöründeki (MC4R) mutasyon sonucu oluşan aktivite kayıpları kalıtsal obezite ile ilişkilidir [37]. Yine aynı şekilde GPCR'lerden büyüme hormonu (GH) sekretagogların hedefi ve beyin ve hipofiz bezinden eksprese olan reseptördeki (GHSR) bazal aktivite kaybına neden olan mutasyonlar kısa boy sendromuna neden olmaktadır [38]. Sonuç olarak mutasyonlar sonucu bazal aktivite kaybı hastalıkların ortaya çıkmasında çok büyük bir etken olabilmektedir.

### **2.3. G Protein Bağlı Reseptör ile İlişkili Olan Nadir Hastalık Diabetes İnsipidus**

Diabetes insipidus (DI) ozmotik diürezden kaynaklı anormal biçimde seyreltik idrar oluşumu (poliüri - 50 ml/kg vücut ağırlığı/24 saat) ve sıvı kaybından kaynaklı aşırı su içme (polidipsi - >3 L/gün) ile karakterize olan bir hastalıktır [39]. Nadir bir hastalık olan DI'nın semptomları her yaşta gözlenebilmektedir. Kadın ve erkek bireyler arasında benzer dağılım gösteren hastalığın yaklaşık olarak prevalansı 1:25000'dir [40]. Hastalığın kalıtsal formları erken yaşlarda gözlemlenirken sonradan kazanılan (edinilmiş) formları genellikle çocukluktan sonraki dönemlerde ortaya çıkmaktadır [41]. Yapılan bir çalışmada, 79 kişiden oluşan bir hasta grubunun %94'ünde edinilmiş DI formları gözlemlenirken geriye kalan %6'luk dilimde kalıtsal form tespit edilmiştir [42]. DI, santral veya nefrojenik olan birincil forma, primer polidipsiden kaynaklanan ikincil forma ve çok nadir olarak gebelik süresince ortaya çıkan ve sonradan kazanılmış bir form olan gestasyonel form olarak adlandırılan alt formlara ayrılmaktadır [43]. Santral DI (CDI) genellikle arjinin vazopressin (AVP) üretiminden sorumlu nörohipofizde



oluşabilecek kraniyofarenjiyom ve germ hücreli tümörler gibi ödemlerden ya da mekanik hasar kaynaklı lezyonlardan veya 20. kromozomunun p13 lokasyonunda yer alan AVP'deki mutasyonlar sonucu oluşan kalıtsal hasarlardan kaynaklanabilmektedir. CDI'a ayrıca inflamatuvar hastalıklar da neden olabilmektedir [43, 44]. Nörohipofizdeki hasar sonucu AVP salınımı tam veya kısmi olarak engellenebileceği için ozmotik diürezin şiddeti de buna bağlı olarak değişecektir [45]. Bazı durumlarda hastaların sahip olduğu lezyonlara rağmen CDI görülmez. Çünkü hipotalamusta sentezlenen AVP arka hipofiz bezinde depolanıp saklanmaktadır. Lezyonların neden olduğu tahribat arka hipofiz bezine zarar vermesine rağmen AVP sentezinde görev alan magnoselüler nöronlarda herhangi bir tahribata neden olmamaktadır. Sadece sinir uçlarında hasara neden olup nöron gövdelerinde herhangi bir etki göstermeyen hasarlar AVP salınımını bütünüyle engellememektedir. Böylece hastalık semptomları görülmemektedir [40, 43]. Gebelik sonucu meydana gelen poliüri ve polidipsi sendromları 1940'lara kadar uzanmaktadır. Yaklaşık olarak 30.000'de 1 kişi olarak gözlemlenen bu hastalık hamilelik süresi boyunca değişen fizyolojik etmenlerden kaynaklanmaktadır. Hamilelik süresi boyunca plasental bir enzim olan vazopressinaz üretimi artar ve artan enzim miktarı AVP'nin yıkımına neden olmaktadır. Böylelikle CDI semptomları görülmektedir. Erken teşhis ile bu durumun önüne geçmek mümkündür [46, 47]. Polidipsi, psikiyatri hastalarında görülen vücuttaki su homeostazındaki bozukluklardır. Hastaların aşırı miktarda sıvı tüketmesi sonucu ortaya çıkmaktadır [48]. Psikotik bozukluğa sahip olan bu kişilerde anksiyete, obsesif-kompulsif bozukluk, anoreksiya nervoza veya alkolizm görülür. Bu kişiler aşırı sıvı alımının kaygıları azalttığını ve kendilerini daha iyi hissettiklerini söylerler [49]. Nefrojenik DI, kalıtsal veya edinilmiş kusurlar nedeniyle böbreğin fizyolojik olarak antidiüretik etkisine duyarlılığının azalmasından kaynaklanmaktadır [50].

### **2.3.1. Santral Diabetes İnsipidus (CDI)**

CDI, AVP'nin üretiminde, taşınmasında veya salgılanmasındaki hatalardan kaynaklı bir hastalıktır. CDI, çoğunlukla hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerinde AVP salgılayan nöronlardaki hasarlardan meydana gelmektedir. Yüksek miktarda hipotonik idrar ile karakterizedir. Erkek ve kadınlar arasında benzer bir dağılım göstermektedir. Dağılım miktarı ise yaklaşık olarak 1:25.000 civarındadır

[51]. CDI'nin ortaya çıkış nedeni bazen idiyopatik olabilir. Özellikle çocuklarda %29 idiyopatik nedenler görülmektedir. Yetişkinlerde ise bu oran yaklaşık olarak %25 civarındadır. Beyin tümör ve lezyonlarında kaynaklı CDI ise çocuklarda %50 oranında gözlenirken bu oran yetişkinlerde %30'u bulabilmektedir. Kafa travmaları sonucu arka hipofiz bezinde oluşabilecek hasarlar ise vakaların %2'sini kapsamaktadır [52]. CDI'nin sonradan edinilmiş ve kalıtsal olmak üzere iki ayrı formu bulunmaktadır.

Edinilmiş CDI, AVP üretiminden sorumlu nörohipofizde veya arka hipofiz bezinde oluşabilecek mekanik hasarlar, lezyonlar ve tümörlerden kaynaklanır. CDI hastalarında çok sayıda lezyon olmasına rağmen hastalığın görülme sıklığı daha yaygındır. Bunun sebebi nörohipofiz bezinin fizyolojisinden kaynaklanmaktadır. Eğer beyindeki tümör veya lezyonlardan kaynaklanacak hasar sadece arka hipofiz bezinde gerçekleşiyor ise AVP salgılayan magnoselüler nöronlarda hasar görülmeyeceği için genellikle CDI'ya neden olmamaktadır. Arka hipofiz bezinin hasar görmesinden kaynaklı CDI nadir gözlenmektedir. Ayrıca su homeostazının sürdürülmesi için günlük sentezlenen AVP miktarı genellikle kapasitenin çok üzerindedir. Magnoselüler nöronlarda meydana gelebilecek bir hasar olmasına rağmen günlük ihtiyaç için yeterli miktar AVP üretimi olmaktadır. Bu nedenle CDI görülebilmesi için hipofiz bezinde çok geniş bir hasar olması gerekmektedir [50, 53].

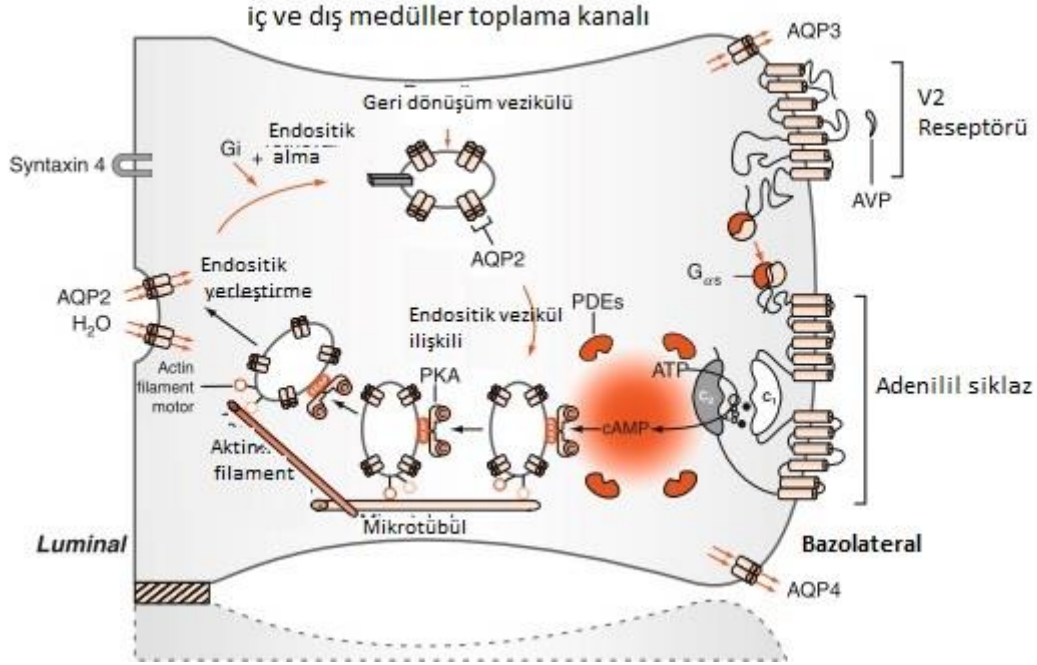
Kalıtsal CDI'nin nedeni 20p13 kromozomunda yer alan AVP'de meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Otozomal dominant CDI'da AVP geninde meydana gelen mutasyonlar 70'den fazladır ve mutasyonların hiçbirisi genin kopeptin kısmında meydana gelmemektedir. Otozomal dominant CDI, en sık görülen formudur. Çok çeşitli mutasyonların olmasına rağmen hastalığa sahip bireyler benzer özellikler sergilemektedir. Erkek ve kadınlar eşit olarak etkilenmektedir. Heterozigot bireyler doğumda sağlıklı iken ileriki yaşlarda artan semptomlar ile birlikte tam CDI görülmektedir [54]. Otozomal resesif CDI, dominant formuna göre daha nadir görülmektedir. AVP, WFS1 ve hipotalamik ve sindirim prohormonlarının işlenmesinde rol oynayan PCSKI'deki proprotein konvertaz subtilisin/kexin tip 1'i kodlayan mutasyonları içermektedir. En yaygın şekli Wolfram sendromunun klinik bir belirtisi olarak WFS1'deki mutasyonlardan kaynaklanan tip C'dir [50][55]. X'e bağlı çekinik

CDI'ya neden olan gen veya genler henüz tam tanımlanmamış olmasına rağmen Xq28 kromozomu ile ilişkilendirilmiştir [56].

### **2.3.1.1. AVP Geni**

Arginin vazopressin (AVP) olarak da adlandırılan antidiüretik hormon hipotalamusta sentezlenmektedir. Hipotalamik çekirdekler olan paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerde (SOÇ) magnoselüler hücreler (büyük nöronlar) tarafından üretilen bir proteindir. Kan dolaşımına pleksuslar kavernoöz sinüs ve superior vena kava ile katılırlar [57]. Nörohipofiz hormonu olan AVP düz kasların kasılması, diürezin inhibisyonu, trombositlerin toplanması, glikojenolizinin uyarılması, hipofizden adrenokortikotropik hormon salınımı, ısı, kan ve üreme davranışlarının düzenlenmesi gibi birçok işleve sahiptir. AVP'nin sahip olduğu bu etkiler etkileşim içerisinde oldukları V1a, V1b ve V2 gibi GPCR ile açıklanmaktadır [58]. AVP biyosentezinde sinyal peptidi, tirpeptit bağlayıcı, nörofizin II (NPPII) olarak bilinen bir protein, bazik aminoasit, kopeptin ve AVP bölgesi rol oynamaktadır [59]. Memelilerin birçoğunda bulunan AVP insanların 20. kromozomunda yer alan ve 3 ekzona sahip bir gen tarafından kodlanmaktadır [60]. Vücudumuzdaki su homeostazının düzenlenmesi böbrekte bulunan renal medulla içerisindeki tübüllerin fonksiyonları ile sağlanmaktadır. AVP böbreğin distal ve toplayıcı kanallarından suyun geri emilimini arttırarak daha konsantre bir idrar oluşturmaktadır [61]. AVP ilk etkisini renal toplayıcı tübüllerin bazolateral membranında yer alan vazopressin V2 reseptörüne (AVPR2) bağlanarak göstermektedir. G protein bağlı reseptörlerden biri olan AVPR2'deki konformasyonel değişiklik ile birlikte aktive olan reseptör cAMP üretimi ve protein kinaz A'nın (PKA) uyarılması ile zarın su geçirgenliği özel su kanalı olan aquaporin 2'nin (AQP2) lümene ekzositik olarak eklenmesiyle artmaktadır ve böylelikle su taşınması kolaylaşmaktadır [62]. Hücrelere alınan suyun kan dolaşımına geri kazandırılmasında böbrek hücrelerinin bazolateral membranda yer alan aquaporin 3 ve 4 (AQP3/4) de görev almaktadır. Plazma ozmolalitesi tekrar denge haline gelerek su dengesi sağlanır. Bu dengenin sağlanması ile birlikte hipofiz bezinden salgılanan AVP durdurulur ve AQP2 hücrelerinin tekrar eski konumuna getirilmesi için endozomlarda tutunması sağlanmaktadır [63]. Plazma ve hücre dışı sıvı arasındaki çözünen madde konsantrasyonlarından kaynaklanan ozmotik basınç AVP'nin nörohipofizden

salınmasına etki etmektedir. Ozmotik basınç konsantrasyonları en çok sodyum ve anyonlar ile belirlenirken glukoz ve üre gibi diğer çözücüler bu konsantrasyona çok azda olsa etki etmektedir [64].



Şekil 2.2. AVP'nin Toplama Kanalının Ana Hücrelerinde Su Geçirgenliğini Arttırma Etkisinin Şematik Gösterimi [65] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır. AVP, bazolateral membran üzerindeki V2 reseptörüne (bir G proteinine bağlı reseptör) bağlanır. Reseptör sinyalleşmesine bağlı olarak  $GTP\alpha$  ve  $\beta\gamma$  alt birimleri ayrılarak adenilil siklaz aktive edilir ve hücre içi cAMP konsantrasyonu arttırılır. ATP'nin cAMP'ye dönüşümü dimer ara yüzünde gerçekleşir. PKA, üretilen cAMP'nin hedefidir. cAMP'nin PKA'nın düzenleyici alt birimlerine bağlanarak aktivasyona neden olur. Böylece A-kinaz bağlama proteini yoluyla bir AQP2 içeren endositik vezikül'e bağlanır. Şekilde A-kinaz bağlayıcı proteinin endositik vezikülden ayrılması gösterilmektedir. Veziküllerin zara doğru hareketi için mikrotübüller ve aktin filamentleri gereklidir. AVP ortamda bulunmadığında, AQP2 su kanalları bir endositik süreç tarafından alınır ve su geçirgenliği orijinal oranına geri döner. AQP3 ve AQP4 su kanalları, bazolateral membranda yapısal olarak ifade edilir.

### 2.3.2. Nefrojenik Diabetes İnsipidus (NDI)

Kan dolaşımındaki hacmin azalması ve serum ozmolalitesindeki artış ile birlikte vücudun su tutması gerektiğinde arka hipofiz bezinden vazopressin hormonu salgılanarak bazolateral membrandaki AVPR2'ye bağlanır. AVPR2, ATP'yi cAMP'ye dönüştürmek amacıyla PKA aktivasyonuna yol açar [66]. cAMP seviyesinde bu artış ile birlikte AQP2'nin Ser256 kalıntısı fosforile edilir. Homotetramerlerden oluşan AQP2'nin fosforilasyonu için tetramerlerindeki dört monomerden en az üçünün fosforile edilmesi gerekmektedir. PKA'nın hedefini etkin bir şekilde fosforile edebilmesi, protein kinaz A bağlayıcı proteinler (AKAP) tarafından düzenlenir. Fosforilasyon sonucu AQP2 içeren alt apikal depolama vezikülleri sitoplazmadan plazma zarına ilerleyerek zar ile kaynaşır. Fosforilasyon sonucu gerçekleşen bu yer değiştirme hücrenin su geçirgenliğini arttırmaktadır [67-69].

Nefrojenik Diabetes insipidus böbreklerde yer alan AVPR2 veya AQP2 proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu kalıtsal olan veya şizofreni tedavisinde yaygın olarak kullanılan lityum gibi ilaçların yan etkisinden kaynaklı hipokalemi gibi elektrolit bozukluklar nedeniyle sonradan edinilmiş, vücudun AVP'ye yanıtının kısıtlandığı bir hastalıktır [43]. Klinik olarak yine poliüri ve polidipsi olmak üzere hastalarda idrar konsantrasyonunda bozukluklar, gelişme geriliği, yetersiz beslenme gibi semptomlar gözlenmektedir [63]. Genel olarak NDI herhangi bir antidiüretik hormona dirençli üriner konsantrasyon bozukluğunu kapsamaktadır. Kalıtsal NDI'dan daha yaygın olarak görülen bu formda poliüri ve polidipsi şiddeti orta düzeyde olup nadiren şiddetli bir etki göstermektedir. Henle kulpundaki NaCl geri emiliminin azalmasından, medüller yaralanmalar sonucu ters akım mekanizmasındaki kusurlar ya da toplayıcı tübüllerde AVP'ye direnç sonucu idrar ozmalalitesinde bozulmalar görülebilmektedir [43]. Karmaşık bir duygudurum bozukluğu olan bipolar bozuklukların tedavisinde yaygın olarak lityum tedavisi uygulanmaktadır [70]. Sonradan kazanılan bu hastalıkta en büyük etmen lityum tedavisi sonucu ortaya çıkan AQP2 ekspresyon seviyesindeki azalmalar ve uzun vadede böbreklerde yer alan principal hücrelerin kaybindan kaynaklanmaktadır [71]. Lityum tedavisi uygulanan hastaların %40'ında yaklaşık olarak 8 hafta gibi kısa bir sürede ilacın yan etkisi olarak NDI'un ortaya çıktığı görülmüştür. İlacın uzun süre kullanım gösteren hastalarda ise kronik böbrek yetmezliği oluşabilmektedir [72].

Lityum, böbrekler tarafından sodyuma benzer bir şekilde süzülüp tekrar emilerek duyarlı epitelyal sodyum kanalı ile toplama kanalı ana hücrelerine ulaşabilmektedir. Lityum ile tedavi edilen ve toplama kanallarında duyarlı epitelyal sodyum kanalı bulunmayan farelerde poliürinin gelişmediği gözlemlenmiştir [73]. Lityum kullanımının glikojen sentaz kinaz 3'ün izoformları olan GSK3 $\alpha$  ve GSK3 $\beta$ 'nin sinyal yollarını inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca in vitro olarak yapılan çalışmalarda farelerde lityum kullanımının toplama kanallarında yer alan AQP2'nin ekspresyonunu da büyük ölçüde azaltarak poliüriye neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca GSK3 $\beta$ 'nin inhibisyonu sonucu siklooksijenaz 2 ekspresyonunu ve prostaglandin E2'nin lokal olarak atılımını artırarak vazopressin etkinliğini inhibe ettiği de gözlemlenmiştir [74-76]. Edinilmiş Nefrojenik DI'un diğer sebepleri arasında da hiperkalsemi, hiperkalsiüri ve obstrüktif üropati bulunmaktadır. AQP2 ekspresyonunun azalması ve otofajik olarak bozulması ayrıca su ve üre kanallarındaki geçirgenliğin azalması hipokalemi ve hiperkalsemi tarafından indüklenmektedir [77, 78].

X'e bağlı resesif NDI bireyleri genellikle erkeklerde ve heterozigot olarak dişilerde görülür ancak genelde dişi bireylerin etkilenmesi olası olmayan nadir bir hastalıktır [79]. Bu hastalığa sahip bireylerin yaklaşık %90'ı X'e bağlı resesif karakter gösteren Xq28 kromozom bölgesinde AVPR2 genindeki mutasyonlardan kaynaklı erkek bireylerdir. %10'luk kısım ise AQP2 mutasyonlarından kaynaklı otozomal resesif veya dominant karakter sergilemektedir [57, 64]. AVPR2'yi kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu böbrek, arjinin vazopressin hormonuna yanıt veremeyerek idrarı konsantre edemez [80, 81]. Bu mutasyonlar reseptörde ekzon atlamaları, stabil olmayan mRNA'lar, çerçeve kaymaları ya da anlamsız mutasyonlar oluşturarak reseptörün liganda bağlanma stabilitesinde azalma, anormal baz eklenmeleri veya yanlış katlanmış proteinler gibi genetik kusurlarla sonuçlanabilmektedir [82]. AVPR2'de 250'den fazla yanlış anlamlı, delesyon/insersiyon ve anlamsız mutasyonlar tanımlanmıştır [83]. Yanlış katlanan proteinler Golgi aygıtında birikerek ubikuitin-proteazom yolu ile bozularak fonksiyon kaybı fenotiplerine yol açmaktadır [84]. Mutant reseptörlerin sınıflandırılması mutant proteinin işlevlerine ve hücredeki lokalizasyonlarına göre gruplandırıldığı düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünükine dayanmaktadır [85]. Tip 1 mutant reseptörlerde çerçeve kaymaları ve anormal eklenmeler gibi kusurlar mRNA sentezinde hatalara neden olur. Reseptör hücre yüzeyine ulaşabilse de ligand

bağlanma bölgesindeki kusurlar etkin bir şekilde ligand bağlanmasını gerçekleştirilerek cAMP üretimi indüklenemez. Sonuç olarak reseptör fonksiyonu engellenmiş olur [85, 86]. X'e bağlı NDI'daki doğal olarak meydana gelen mutasyonların çoğunun yer aldığı grup olan tip 2 sınıfında yanlış katlanmış proteinler Golgi aygıtında veya ER içerisinde tutulup proteazomlar tarafından hedef alınarak bozunmaya uğrama eğilimindediler [85, 86]. Mutant proteinlerdeki bu yanlış katlanmalar yanlış anlamlı mutasyonlardan veya delesyon/insersiyonlardan kaynaklanmaktadır [63]. Mutant proteinlerin sahip olduğu bu mutasyonların çoğu transmembran sarmallarda yer alarak sarmallar üzerinde çok büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir [87]. Tip 3 sınıfına ait mutasyonlar Gs-adenilil siklaz sisteminde düşük afiniteye yol açarak kararsız mRNA'ların oluşmasına neden olur. Fosforilasyon aktivasyonunda azalmaya neden olan bu alt grup nadir olarak görülmektedir. Tip 4 sınıfına ait mutasyonlar esas olarak altıncı ve ikinci transmembranal sarmal ile birinci ve ikinci hücre dışı döngülerde yer almaktadır. Bu alanlarda yer alan amino asitlerin, agonist bağlanması için reseptör konformasyonunun oluşturulmasında rol oynadığı düşünülmektedir [85, 86].

Otozomal resesif NDI'lı hastalar AQP2'de görülen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. AQP2'de görülen mutasyonların çoğunluğu zar ötesi alanlarda ve sarmallar içerisinde yer almaktadır. Bu mutasyonlar AQP2'nin yanlış katlanmasına yol açarak ER içerisinde tutulmasına ve burada bozulmasına neden olmaktadır. Genellikle bu mutasyonlardan kadın ve erkekler eşit oranda etkilenmektedir [80].

Otozomal dominant NDI'lardaki mutasyonların çoğu çekinik mutantların aksine karboksil terminalindeki amino asitlerde gözlemlenmiştir. Proteinlerin karboksil kuyrukları proteinin kanal içerisinde doğru yönlendirilmesinde görevlidir. Otozomal baskın NDI'da görülen mutasyonların su geçirgenliği üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır ve protein katlanmaları doğru bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu katlanma sonucu mutant monomerler, heterotetramer oluşturmak için yabancı tip AQP2 ile hücre içinde etkileşime girerek yabancı tip AQP2'nin ya Golgi aygıtı içerisinde tutulmasına ya da plazma zarına, lizozomlara, endozomlara doğru bir şekilde taşınmasını engellediği gösterilmiştir [88, 89].

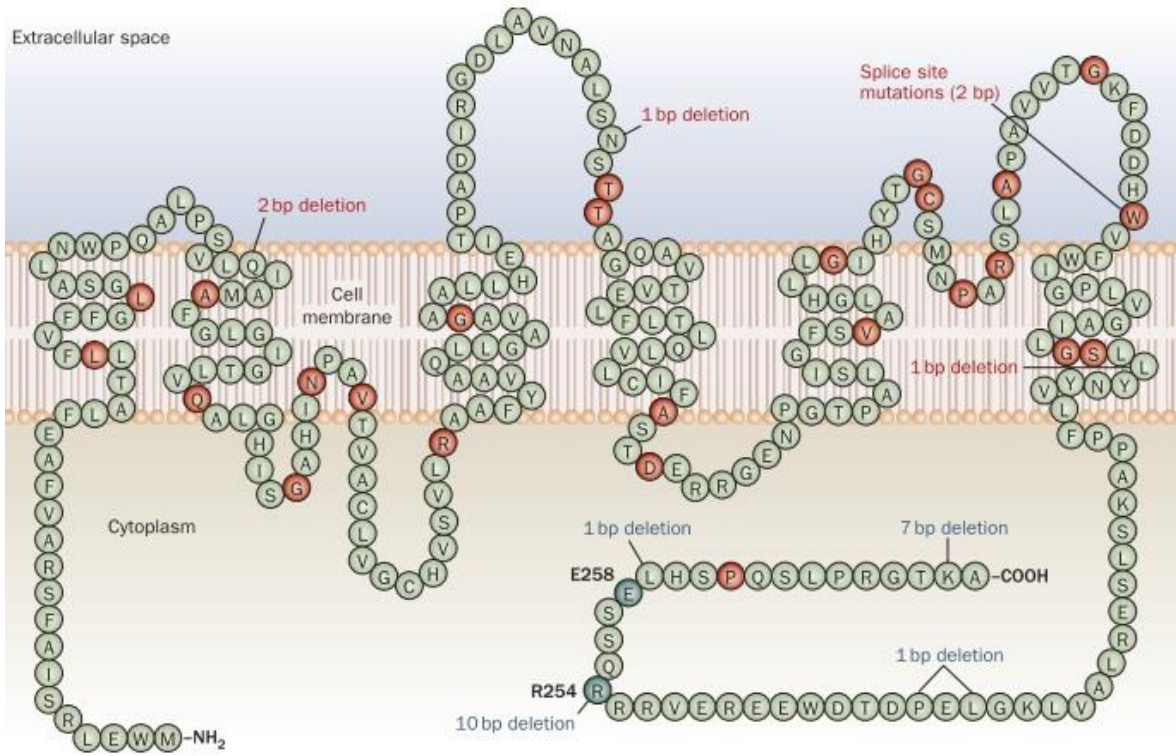
### 2.3.2.1. AQP2 Geni

Agre ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucu aquaporin su kanallarının keşfi ile vücuttaki su dengesinin fizyolojisi ve bu dengedeki bozuklukların neden olduğu patofizyolojiler açığa çıkarılmıştır. Özellikle bu dengenin korunmasında toplama kanallarında suyun geri emilimi anahtar rol oynamaktadır [90]. Böbrek dokusunda 6 tip su kanalı (AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP6 ve AQP7) tübül epitellerinin farklı yerlerinde lokalize olmuş şekilde bulunmaktadır. Organizmada farklı dokularda da gözlemlenen su kanallarından AQP5, AQP8 ve AQP9 submandibuler bez, testis, pankreas, karaciğer, kolon, lökosit, akciğer gibi dokularda yer almaktadır [91].

Moleküler kütlesi 29 kDa, hidrofobik bir zar entegral proteini olan AQP2 böbreğin toplama kanallarında lokalize olmuş bir su kanalıdır [92]. AQP2'yi kodlayan gen kromozom 12q13 üzerinde lokalize olmuştur [63]. Vücuttaki su homeostazının sağlanması normal hidrasyon şartları altında toplama kanalının sitoplazmasında yer alan AQP2'ler ile sınırlıdır. Mutasyonların neden olduğu AQP2 bozukluğu, NDI dahil olmak üzere çeşitli su dengesi bozukluklarına neden olur [67-69].

AQP2 geninde tanımlanan 65 mutasyonun çoğunun resesif otozomal NDI'ya neden olduğu gösterilmiştir [93, 94]. Yanlış anlamlı mutasyonlara sahip (L22V, G64R, N68S, T126M, A147T, C181W, R187C, S216P) AQP2 proteinleri fonksiyonel olarak etkin su kanalları oluşturabilmektedir. Ancak bu mutasyonlar proteinlerin ER'dan çıkışını engellemektedir [95, 96]. Resesif NDI'daki mutasyonlar transmembranel sarmalın F17-Q36 ve F204-L223 bölgeleri arasında yer alırken dominant NDI'deki 2 mutasyon (E258K, 807del7) AQP2'nin karboksi terminal kuyruğunda yer almaktadır [97, 98].





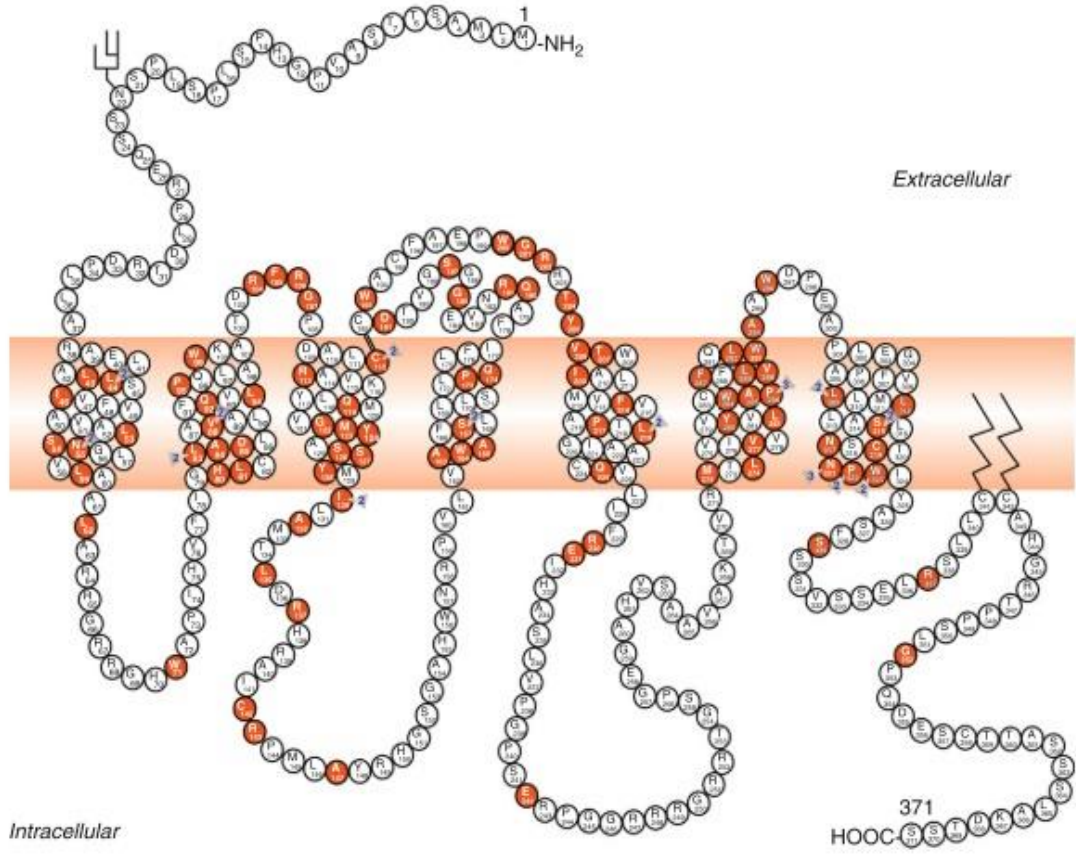
Şekil 2.3. NDI'a Neden Olan Hücre Zarına Gömülü AQP2 Yapısının Şematik Gösterimi [66] kaynağından alınmıştır.

### 2.3.2.2. AVPR2 Geni

AVP hormonuna yanıt olarak idrar ozmolalitesini düzenleyen ve böbrek toplama kanalının ana hücreleri tarafından eksprese edilen AVPR2 ya da diğer adı ile V2 reseptörü ilk olarak 1992 yılında tanımlanmıştır [99]. AVPR2 insanlarda Xq28 kromozom bölgesinde yer alan ve üç ekzon iki küçük intron içeren AVPR2 geni tarafından kodlanmaktadır [100]. Yaklaşık olarak molekül ağırlığı 41 kDa ve 371 amino asitten oluşan AVPR2 reseptörü G protein bağlı reseptör ailesinden rodopsin alt ailesinin bir üyesidir. Yedi hidrofobik transmembranın hücre dışına bakan amino terminalinde N-bağlı glikosilasyon için konsensüs dizileri ve hücre içine bakan karboksil terminalinde kinazlar için fosforilasyon bölgeleri içermektedir [86]. Reseptörün amino terminali membran üzerindeki oryantasyonu ve konumu için önemli iken karboksil terminal kısmındaki kronmuş motif ise reseptörün ER'den Golgi aygıtına taşınmasında rol oynamaktadır [101, 102]. AVP toplama kanalı hücrelerinin bazolateral membranına yerleşik halde bulunan AVPR2 reseptörlerine bağlanarak ilk etkisini göstermektedir. AVPR2 aktivasyonu ile uyarıcı G proteinleri tarafından adenilil

siklaz uyarılarak renal toplayıcı tübüllerin apikal plazma zarına siklik adenosin monofosfat (cAMP) aracılığıyla AQP2 su kanallarının katılması sağlanmaktadır [103]. Aktif haldeki AVPR2 reseptörlerindeki sinyal iletimindeki aksaklıklar sonucu NDI gibi reseptör işlev bozukluğu ve hastalığı ortaya çıkmaktadır [58, 104, 105].

NDI'ya sebep olan AVPR2'deki mutasyonların çoğu (L44P, I46K, L59P, L62P, L62-64del, L83Q, A84D, R113W, Y128S, I130F, R137H, R143P, W164S, S167T, S167L, G201D, V278del, Y280C, L292P, A294P, R337X) fonksiyon kaybına neden olan yanlış anlamlı mutasyonları içermektedir [106-108]. Bugüne kadar 200'den fazla fonksiyon kaybına neden olan mutasyon keşfedilmiştir [109]. Genellikle transmembran sarmallarda lokalize halde bulunan mutasyonlar, domainlerin mutasyonlara ne kadar duyarlı olduğunu göstermektedir [110]. AVPR2'deki ilk mutasyonlar bebeklerde tanımlanmıştır. Bu mutant hücreler reseptördeki Arg137'nin Cys veya Leu ile yer değiştirmesinden (R137C veya R137L) kaynaklanmaktadır [111]. Mutant reseptöre sahip hücrelerde yüksek cAMP üretimi gözlemlenmiştir [112]. AVPR2'deki P95-R113 ve R181-T207 hücre dışı döngülerinde görülen V88M, W99R, F105V, R113W, R181C, G185C, R202C, T204N, Y205C veya V206D mutasyonları ise reseptörün hücre yüzeyi ifadesinde herhangi bir sorun oluşturmazken bu mutasyonlara sahip mutant hücrelerde AVP bağlanmasında azalma gözlemlenmiştir [87, 113, 114].



Şekil 2.4. 193 Olası AVPR2 Mutasyonunun Şematik Temsili [65] kaynağından alınmıştır. Amino asitler, tek harfli amino asit kodu olarak gösterilir.

## 2.4. Şaperon Uygulamaları

Protein kalite kontrol sistemlerinde proteinlerin doğru bir şekilde katlanması, denetlenmesi ve protein bozulmalarını önlenmesinde önemli görev alan şaperonlar moleküller, kimyasal ve farmakolojik olarak üç gruba ayrılmaktadır [115].

### 2.4.1. Kimyasal Şaperonlar

Moleküler şaperonlar gibi davranan kimyasal şaperonlar ozmolit mutant proteinleri agregasyonlardan kurtararak proteinleri ER kalite kontrol mekanizmalarından geçmelerini sağlayabilmektedir [116]. Düşük moleküler ağırlığına sahip olan kimyasal şaperonlar hidrofobik bileşikler ve ozmolitler olmak üzere 2 gruba ayrılır. Farmakolojik şaperonların aksine kimyasal şaperonlar spesifik olarak proteinlere bağlanmamaktadır ve genellikle yüksek konsantrasyonlarda terapötik etkiye sahip ajanlardır [115].

Organizmaların, tuzluluk oranı, kuruma veya aşırı sıcaklık gibi stres koşullarına verdikleri hücrel stres tepkilerin üyeleridir. Düşük molekül ağırlığına sahip hücrel ozmolitler ökaryot hücrelerinde glisin, taurin gibi amino asit türevleri, hücrelerin aşırı sıcaklığa ve dehidrasyona karşı koruma sağlayan gliserol, sükröz gibi polioller, serbest amino asitler ve tuz konsantrasyonun fazla olduğu hücre dışı ortamlara karşı koruma sağlayan trimetilamin N-oksit (TMAO) gibi metil-amin bileşiklerinden oluşmaktadır. Stres koşulları altında yer alan bu ozmolitler protein aktivitelerini etkilemeyerek stabilitelelerini arttırmaktadır [115, 117]. cAMP ile aktive olan klorür iyon kanalı proteini CFTR'nin mutasyonu D508F CFTR birçok konformasyonel hastalığa sebep olmaktadır. *In vitro* koşullarda yapılan deneylerde mutant CFTR'nin hücre içinde hızlı bir şekilde bozulduğu görülmüştür. Mutant proteinlere uygulanan gliserol ve TMAO'nun protein olgunlaşmasını arttırabildiği gösterilmiştir [118]. Alzheimer hastalığının başlıca sebebi olan beta amiloid plak oluşumu üzerinde uygulanan gliserol ve TMAO sonucu plak oluşumu başarıyla engellendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca Creutzfeldt-Jacob hastalığında uygulanan DMSO ve gliserolün hastalıktan sorumlu olan mutant PrP (Sc) proteinin eski formuna geri döndürdüğü yapılan çalışmalarla bulunmuştur [119]. Kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda tümör baskılayıcı protein p53'deki mutasyonlar üzerinde denenilen aktif ozmolitler ile onkojenik mutasyonların yanlış lokalizasyonlarının düzeltildiği gözlemlenmiştir [120].

Kimyasal şaperonlar katlanmamış proteinlerde açığa çıkan hidrofobik bölgelerle etkileşime girerek protein agregasyonunu önler. Çünkü açığa çıkan bu bölgeler diğer katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgeleriyle moleküler bağ kurmaya açık hale gelmektedir. En iyi bilinen hidrofobik şaperon kısa zincirli yağ asidi olan 4-Fenilbütirat (4-PBA)'tır [117]. PBA'nın şaperon aktivitesi ilk olarak CFTR $\Delta$ F508'in hücre yüzeyindeki aktivitesi ile keşfedilmiştir. Çocuklarda, üre döngüsü bozukluklarını gidermek amacıyla amonyak temizleyici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca telasemi tedavisinde ve kemoterapide de değerlendirilmektedir [121]. Karaciğer hücrelerinde lipid damlacıklarının birikmesi ve lipotoksisite ile ilişkili olan Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD) üzerinde yapılan çalışmalarda 4-PBA ile tedavinin lipid ve trigliseritlerin birikimini azalttığı ve lipojenik ve lipid bozunma yollarını düzenlediğine dair rolleri ortaya konulmuştur [121, 122].

## 2.4.2. Farmakolojik Şaperonlar

Amino asit dizilerindeki mutasyonlar sadece proteinlerin yanlış katlanması sonucu fonksiyon kayıpları ile sonuçlanmamaktadır. Bunun yanı sıra yanlış katlanmış protein birikimi ER’de strese yol açmakta ya da kalite kontrol sistemlerinin etkin çalışmamasından kaynaklı bozunmadan kaçan proteinler amiloid olarak bilinen fibril birikintilerine yol açmaktadır. ER stresinden kaynaklı diyabet, Alzheimer hastalıkları, hücre ölümleri meydana gelebilmektedir [123]. ER içerisinde mutasyonlar sonucu yanlış katlanmış proteinleri stabilize ederek ER ve Golgi üzerinden çıkışını kolaylaştırıp nihai hedeflerine ulaşmasını amaçlayan farmakolojik şaperonlar (PC), proteinlere spesifik özellik gösteren küçük moleküllerdir [124]. Mutant proteinlerin doğru katlanmasına yardım etmek amacıyla moleküler bir yapı iskelesi görevi üstlenirler. Hedef proteinin ilgili bölgesinde substrat, agonist, antagonist veya allosterik modülatör olarak bağlanarak stabilize ederler [125]. Heterojen bir protein sınıfına ait olan PC’ler proteinin yanlış katlanması ve yanlış yönlendirilmeleri düzelttikleri için en iyi terapötik ajanlar arasında sayılır [126]. PC’ler terapötik ajan olarak genellikle salgı yolu proteinlerini, reseptörleri, enzimleri ve iyon kanallarını hedeflemektedirler [127].

PC’leri kimyasal şaperonlardan ayıran belirli avantajlar bulunmaktadır. Kimyasal şaperonların aksine daha düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilen PC’ler hücrede daha düşük toksisiteye neden olmaktadır. Farmakolojik şaperonların diğer avantajları ise sahip oldukları özgüllükleridir. Böylece bağlanacakları proteinleri spesifik olarak tanırlar. Kimyasal şaperon proteine özgül olmadığı için hedef olmayan proteinler de dahil olmak üzere birden fazla proteine bağlanabilmektedir [128]. PC’lerin düşük konsantrasyonlarda etki göstermesi, küçük molekül boyutundan kaynaklı hücreler arası geçişinin kolay olması ile yanlış katlanmış proteinlerin tutulduğu ER bölümlerine rahat bir şekilde ulaşabilmesi, uzun süreler boyunca yapısının bozulmayıp sabit kalabilmesi ve tersinir bir şekilde ilgili domaine bağlanarak kolay bir şekilde hedef molekülden ayrılabilmesi kimyasal şaperonlar ile arasındaki farkı ortaya koymaktadır [129]. Farmakolojik şaperonlar termodinamik dengeyi doğru katlanmış proteinler yönünde değiştirmektedir. Böylece proteinler ER kalite kontrol sistemlerinden geçerek hücre yüzeyindeki reseptör seviyesinde artış gözlemlenmektedir [130]. PC’ler proteinlerin ligand bağlanma bölgelerinde yer alan kalıntılarla elektrostatik, van der Waals veya

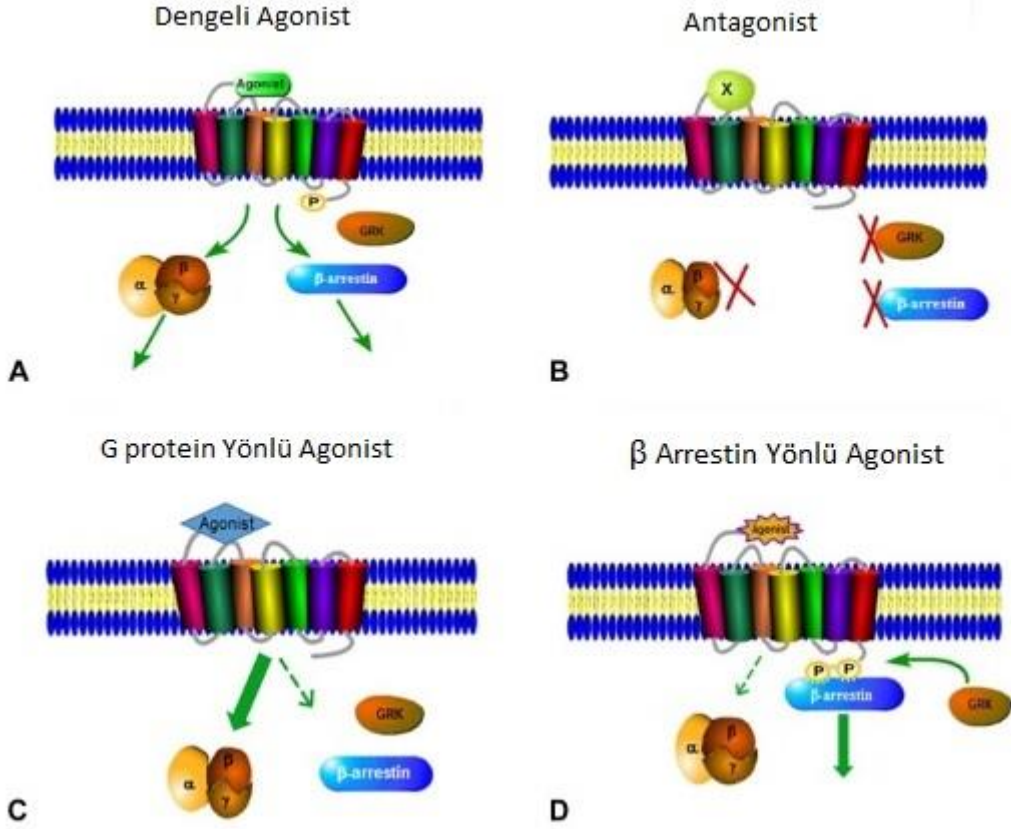
hidrojen bağı ile etkileşimde bulunarak proteinin yapısında bulunan çeşitli kısımları bir arada tutabilmektedir. Farmakolojik şaperonlar yanlış katlanmış mutant proteinleri tekrar katlama özelliğine sahip değildir. Halihazırda katlanmış olarak bulunan proteinlere bağlanarak termal denatürasyon ve proteolitik bozunmalara karşı stabilize ederler [131]. Hücreye uygulanacak dozları hücredeki diğer proteinlerle hedef dışı etkileşimlerde bulunmasını önlemek için nispeten düşük konsantrasyonlarda olmalıdır. Antagonistler veya kısmi agonistler olan farmakolojik şaperonlar, reseptörden hızla ayrılabilmelidir. Çünkü uzun süre bağlanma kurtarılan reseptörün doğal endojen veya nörotransmitter maddesiyle etkileşimini engelleyebileceği için terapötik etkiyi en aza çekebilme riski taşımaktadır. Özellikle ligandına kovalent bağlanma gösteren agonistlere nispeten hidrojen bağı veya Van der Waals kuvveti ile bağlanan antagonistler bu açıdan daha tercih edilebilir olmaktadır [130, 132].

GPCR'lerin bazı yapısal motifleri yüksek oranda korunmuş şekilde bulunur. Ancak iyonlar, organik koku vericiler, aminler, peptitler, proteinler, lipitler, nükleotitler ve fotonlar gibi uyarıların seçici olarak yerleşmesine izin verecek bir dizi değişkenliği mevcuttur. Bu endojen uyarıların davranışlarını taklit veya bloke eden doğal veya sentetik bileşiklerin tanımlanması GPCR ligandlarındaki çeşitliliği de arttırmaktadır. Bu bileşiklerin reseptörleri ile etkileşimleri ligandın kimyasal yapısına bağlıdır ve bağlanacağı reseptörlerin yapıları tarafından yönlendirilmektedir [133]. GPCR'de aktif olmayan (R) ve aktif (R\*) konformasyon arasında denge mevcuttur. Ancak son yapılan çalışmalarla GPCR'lerin birden fazla konformasyona sahip olabileceği öne sürülmüştür. Her bir ligandın GPCR'nin sahip olduğu konformasyonlardan spesifik olarak birini stabilize ettiği düşünülmektedir. Ligandların gösterdikleri bu davranışlar ise fonksiyonel seçicilik veya yönlü agonizm olarak adlandırılmaktadır [134]. Ligandın reseptöre bağlanma kapasitesi afinite olarak tanımlanmaktadır ve elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri tarafından yönlendirilir. Matematiksel olarak, bir ligandın afinitesi, birleşme hızının ayrılma hızına bölümü olarak tanımlanmaktadır. Reseptör üzerindeki ligand etkinliği iki temel esas üzerine kurulmuştur. İlk olarak reseptöre bağlanan ligand molekülünün reseptöre karşı afinitesi bulunduğu söylenir. İkinci olarak ligandın reseptör ve sinyalleşme yolları üzerinde sahip olduğu etkiler ile esas ligand etkinliği açıklanmış olur. Ligandın göstereceği tepkiyi aynı zamanda alıcı yoğunluğu ve bağlanma etkinliği de etkilemektedir. Bu uyarı-yanıt ilişkisinin özelliği

agonistin reseptöre yanıt verme özelliğidir. Pozitif etkiye sahip agonist ligandlar, reseptörde hücredeki efektörlere bağlanmayı destekleyecek bir konformasyonel değişikliği indükler. Kısmi agonizmde daha az etkili olan bir değişim gözlemlenmektedir. Antagonistlerin ise agonist etkisini inhibe etmek için hareket ettikleri gözlemlenmiştir [135]. Sinyalleşme yolları üzerinde agonistlerin pozitif bir etki gösterirken antagonistlerin tam tersi negatif bir etkisi olduğu söylenir. Nötr olan antagonistlerin ise reseptör ve sinyal yolları üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır [136].

#### **2.4.2.1. Agonistler**

$\beta$ -arrestin'ler, GPCR sinyalleşmesinde inhibitör rolü keşfedilen sitozolik adaptör proteinleridir.  $\beta$ -arrestin bağlanmasını inhibe eden ya da tam tersi şekilde aktive eden agonist ligandların keşfi ile hücre içi sinyal yollarının seçici olarak aktive edilmesi mümkün olmuştur [137]. Vücudumuzdaki peptid hormonları ve nörotransmitterler, reseptörleri ile olan ilişkilerinde hücre, doku veya organlarda aktif tepkimelere yol açarak agonist gibi etki göstermektedir [138]. Agonistler reseptöre bağlanarak onu uyaran ve intraselüler komponentleri aktive eden bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Barsoum ve Gaddum'un yaptıkları agonist çalışmalar neticesinde yüksek dozda uygulanan bir agonist bileşik kendinden önceki agonistin etkisini inhibe ettiği görülmüştür [139]. Tam agonistler belirli bir reseptöre karşı yüksek afinite gösterirken kısmi agonistler orta düzeyde bir afinite göstermektedir ve oluşturdukları biyolojik yanıt tam agonistlere kıyasla daha azdır [136]. Yönlü agonist ligandların ise GPCR'lerin farklı konformasyonlarını stabilize ederek seçici sinyal yollarını çalıştırdığı ve farklı fonksiyonel sonuçlara neden olduğu gözlenmiştir. Özellikle özgül ilaç tasarımlarında yan etkileri minimuma indirme olasılığını sağlamak açısından umut vadetmektedir [140]. Yapılan çalışmalarda da AVPR2'ye uygulanan peptid olmayan agonistler ile reseptör aktivasyonu etkinleştirilerek hücre içi cAMP düzeyinde artış gözlemlenmiştir. cAMP'deki bu artış AQP2'nin apikal membran yüzeyine taşınmasını sağlamıştır [141].



Şekil 2.5. GPCR Ligandları ve Etkileri [137] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır. (A) Dengeli agonist, değişken etkililikler ve kinetik yer değiştirme ile hem G-proteini hem de  $\beta$ -arrestin bağımlı sinyalleşmeyi indükleyen reseptör konformasyonlarını stabilize eder. (B) Seçici olmayan antagonist, reseptörü aktif olmayan bir durumda kilitleyebilir ve ne G proteini ne de  $\beta$ -arrestin sinyalleşmeyi desteklemez. (C ve D) Yönlü agonistler, diğerlerini zayıflatırken (ince ok) belirli sinyal olaylarını güçlendirerek (kalın ok) sinyal vermek için dönüşümlü olarak G-proteinlerini veya  $\beta$ -arrestinleri seçen reseptörün aktif bir konformasyonunu destekler.

#### 2.4.2.2. Antagonistler

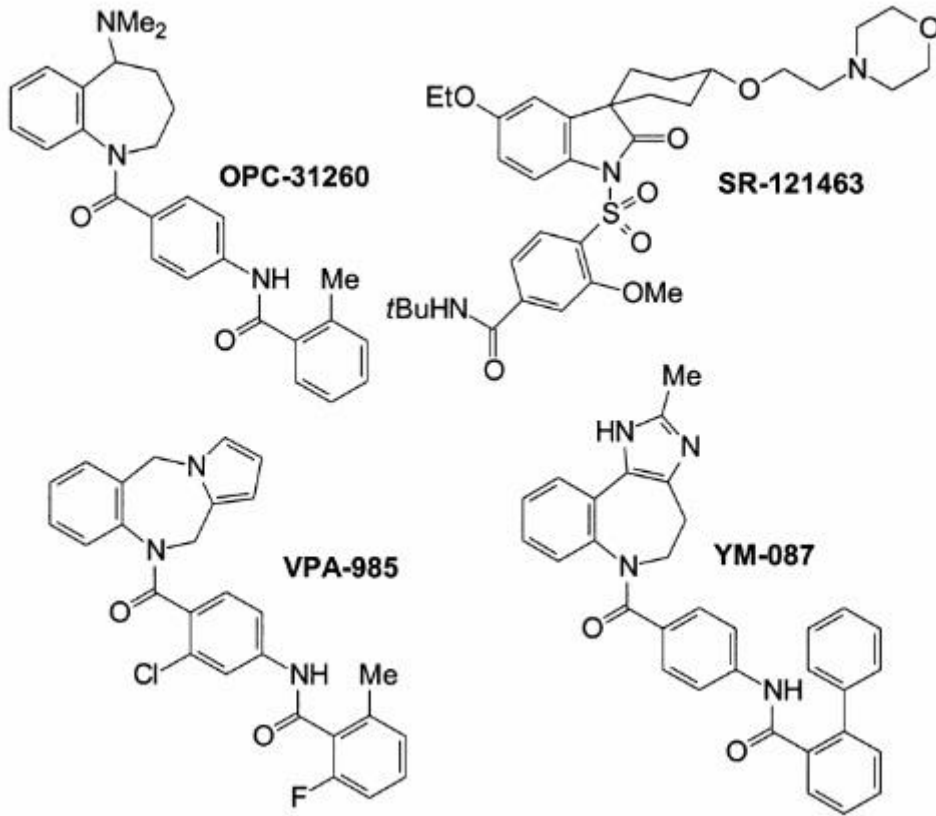
Antagonistler reseptörlere bağlanarak reseptörün aktivasyonunu engelleyen bileşiklerdir. Agonistlere kıyasla molekül ağırlıkları daha fazla olan hidrofobik yapıya sahiptirler. Bazı antagonist bileşikler allosterik etki göstermektedir. Kompetitif antagonistler, agonistlerin bağlanma bölgeleri ile etkileşim içerisinde iken nonkompetitif olan antagonistler allosterik olarak farklı bölgelere bağlanarak reseptör konformasyonunda değişikliğe neden olmaktadır. Bu etkileşim ile yapısı değişen



reseptöre agonistlerin bağlanması engellenmiş olur. Geri dönüşümsüz antagonistlerde reseptörün liganda olan afinitesi değişmektedir. Bazen bu durum reseptörün G proteininden ayrılarak etkisinin artmasına neden olmaktadır [138]. AVPR2 mutantlarını kurtarmak için kullanılan ilk antagonist, reseptöre afinitesi yüksek olan SR121463'dür [108]. Hücre geçirgen olan bu antagonist, mutant reseptörün yanlış olan konformasyonunu stabilize ederek tamamen glikosile edilmiş olgun reseptörlere dönüştürmüştür. ER kalite kontrol sisteminden geçerek hücre yüzeyine ulaşabilen bu mutant reseptörler AVP'ye farklı şekilde bağlanarak hücre için cAMP üretimini sağlayabilmişlerdir. Böylece moleküler şaperonlara benzer olan bu antagonistler farmakolojik şaperonların öncüleri olmuştur. Hücre geçirgenliği bulunmayan peptidik antagonistler ise SR121463'ün gösterdiği etkiyi gösterememişlerdir. Yine aynı şekilde nonpeptid olan VPA985'in SR121463 gibi göstermiş olduğu sonuçlar şaperon kullanımının önünü açmıştır [108]. Spesifik mutant reseptörleri için spesifik antagonist bileşikleri belirleyebilmek önemlidir. Çünkü zayıf bir antagonist işlevi gören ve V1aR'nin antagonisti olan SR49059, K100D, C319Y ve R137H mutantlarında etkili iken del62-64, D136A, P322S, W323H ve F328H mutantları üzerinde herhangi bir etki gösterememiştir [141, 142]. Diğer antagonist özellikte olan SR49059 (V1AR), YM087 (V1AR/V2R), OPC31260 ve OPC41061 (V2R) şaperonlar da mutant V2R'leri yabancı tip reseptör gibi bazolateral membrana ulaşması üzerine test edilmiştir [143].

Son zamanlarda AVPR2 reseptörü antagonisti olarak geliştirilen, kronik hiponatremi tedavisinde kullanılan ve vaptan olarak adlandırılan ilaç grupları bulunmaktadır. Mozavaptan, conivaptan, tolvaptan, satavaptan, liksivaptan ve rwJ351647 olarak adlandırılan birkaç vaptan çeşidi mevcuttur. Geliştirilen bu ilaçların agonist aktivitesi bulunmamaktadır. Vaptanların özgüllükleri geliştirilen vazopressin reseptörlerine göre farklılıklar içermektedir. Conivaptan ve mozavaptan V1a ve V2 reseptörlerine, tolvaptan, satavaptan ve liksivaptan V2 reseptörlerine spesifik olarak bağlanmaktadır [144]. Terapötik amaçla kullanılan antagonist yapıdaki bu vaptanlar vazopressin hormonunun AVPR2 üzerindeki etkisini bloklayarak akuarezi teşvik etmektedirler. Böylece toplama kanallarından serbest suyun emilimi engellenmiş olur. Bu gruba ait bazı ilaçlar hiponatremi tedavisinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Vazopressin reseptörünün antagonistlerinin çoğu benzen ile kaynaşmış yedi üyeli halka sistemi ve iki amid bağlarıyla bağlı aromatik halkalar içermektedir [145]. Vaptan

kullanımının bazı yan etkilerini görmek mümkündür. Gözlenen en yaygın etki idrara çıkmada artış, ağız kuruluğu ve susuzluk olmuştur. Kullanılan akuaretikler kan tonisitesini ve idrar hacmini arttırarak ozmostatın sıfırlanarak susuzluğa neden olabilmektedir. Susuzluğun neden olacağı sıvı alımındaki artış terapötik etkiyi tehlikeye sokabilmektedir. Hipernatreminin ilaç kullanımından sonra geriye dönmesi nadir olarak hastalarda gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda conivaptan kullanımının hipokalemi insidansını arttırdığı gözlemlenmiştir. İdrar akışındaki artış potasyum kaybına neden olacağı için toplama kanallarından potasyum salgılanmasını kolaylaştırmıştır. Damar içi hacmin azalmasına bağlı olarak gözlemlenecek olan böbrek yetmezliği endişe duyulan bir konudur. Ancak şu ana kadar böbrek fonksiyonlarında önemli bir hasar gözlemlenmemiştir [146].



Şekil 2.6. AVPR2'nin Peptit Olmayan Antagonistleri [147] kaynağından alınmıştır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Grubumuzun daha önceki yaptığı çalışmalarla (SBAG112S513) literatüre kazandırdığı *AVPR2* geninde fazla oranda fonksiyon kaybına neden olan R68W ve T273M mutasyonları ile yabancı tipe yakın fonksiyonel özellik gösteren V162A mutasyonunun nadir bir hastalık olan NDI'ya neden olduğu tespit edilmiştir [148]. Bu tez kapsamında kullanılacak olan lixivaptan türevi VPA985, Wyeth-Ayerst Research tarafından geliştirilen seçici V2 reseptörü antagonistidir. Conivaptan türevi YM087 ise V2 reseptör blokajı, V1a reseptör blokajına göre daha belirgin olan V1a/V2 reseptör antagonistidir ve Yamanouchi Pharmaceutical tarafından geliştirilmiştir [144, 145]. Bu tez çalışmasındaki amaç literatüre kazandırılmış olan R68W, T273M ve V162A mutant *AVPR2*'lerine uygulanan YM087 ve VPA95 farmakolojik şaperonlarının etkilerini belirlemektir. Tez kapsamında yapılan deneysel yöntemler aşağıda sırasıyla belirtilmiştir.

1. Önceki çalışmalarda site-directed mutagenез yöntemi kullanılarak oluşturulmuş R68W, V162A ve T273M mutasyonlarını içeren ifade vektörlerinin; yabancı tip *AVPR2* dizisi içeren ifade vektörünün ve içerisinde *AVPR2* dizisi bulundurmayan boş vektörün (pL) çoğaltılması
2. Hücre kültürü çalışmalarıyla COS-1 hücrelerinin üretilmesi ve devamlılığının sağlanması
3. Yabancı tip ve mutant *AVPR2* dizilerini içeren vektörler ile COS-1 hücrelerinin geçici olarak transfeksiyonu
4. Farmakolojik şaperonların COS-1 hücrelerine toksik etki yaratmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi;
  - Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) Testi
  - Tripan Mavisini ile boyama yöntemi
5. ELISA deneyleri ile COS-1 hücrelerinde mutant reseptörlerin ifadelerinin belirlenmesi;
  - Hücre Yüzey ELISA
  - Total ELISA
6. Flow sitometri yöntemi ile COS-1 hücre yüzeyinde mutant reseptörlerin ifadelerinin belirlenmesi

### 3.1. pLV2R İfade Vektörlerinin Çoğaltılması

Grubumuzun daha önceki yaptığı SBAG 112S513 ve SBAG 216S304 numaralı projeler kapsamında çalışmalarda istenilen mutasyon bölgesi için birbiriyle mismatch eden primerler tasarlanıp birkaç adımdan oluşan polimeraz zincir reaksiyonları kurulmuştu. Site-directed mutagenез yöntemi olan bu yöntem ile mutant diziler ve nükleotidler elde edilip pLV2R vektörü içerisine klonlanmış ve dizi analizi yöntemi ile doğrulukları kontrol edilmişti. Mutant ve yabanıl tip *AVPR2* genini içeren vektörler *E.coli* DH5 $\alpha$  kompetan hücresi içine transforme edilerek ampisilinli LB Broth besiyeri içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Transformasyon için kullanılan yöntem aşağıdaki gibidir.

1. Transforme edilecek olan vektör DNA'larından 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) alınıp 100  $\mu$ l kompetan hücre içerisine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon sonrası 42°C'de 45 saniye inkübe edilerek ısı şoku uygulandı.
3. Örnekler hiç bekletilmeden tekrar buz üzerine alınarak 1-2 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
4. Önceden hazırlanmış 250  $\mu$ l SOC medium içerisine örneklerin tamamı eklenerek 37°C'de 1 saat boyunca çalkalamalı etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonrası örnekler ampisilinli LB agar plağına yayma ekim yöntemi ile ekilerek 37°C'de gece boyu etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. pLV2R vektöründe seçici marker olarak ampisiline direnç geni bulunmaktadır. Bu nedenle kullanılan LB agar plaklarında ampisilin bulunmaktadır.

Transformasyon sonrası gece boyu inkübasyona bırakılan plaklardan tek bir koloni seçilerek ampisilin içeren 70 ml LB Broth besiyeri içerisine ekilerek 37°C'de çalkalamalı etüvde gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sıvı besiyerinde üreyen bakteriler Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı.

Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System kitin protokolü;

1. 70 ml'lik bakteri kültürü 5000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürüldü. Pelet kısmına zarar gelmeyecek şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve

- bakteri pelet üzerine 3 ml Resüspanسیون Çözeltisi eklenerek hücreler resüspanse edildi.
2. 3ml Lizis Solüsyonu eklenerek hücreler 3-5 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
  3. İnkübasyon sonrası 5 ml Nötralizasyon Solüsyonu eklenerek 5-10 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 15000 g'de santrifüğe edildi.
  4. Santrifügasyon işlemi devam ederken kit içeriğinde bulunan iki filtreli kolon üst üste gelecek şekilde vakum manifolduna yerleştirildi.
  5. Santrifügasyon sonrası elde edilen süpernatant kolonlara aktararak vakumlama işlemi yapıldı. Böylelikle vakumla birlikte kolondan aşağı inen DNA'nın kolon üzerine tutunması sağlandı.
  6. Üstte kalan kolon dikkatlice çıkarılarak DNA'nın bağlandığı kolon tekrardan vakum manifolduna yerleştirildi ve 5 ml Endotoksin Uzaklaştırma Çözeltisi (etanol eklenmiş) eklenerek çözelti tamamen uzaklaşmaya kadar vakum uygulandı.
  7. Kolon üzerine 5 ml Endotoksin Giderici Yıkama solüsyonu eklenerek vakumlandı.
  8. 20 ml Kolon Yıkama Solüsyonu eklenerek vakumlama işlemi tekrar uygulandı. Kolon filtresinin etanolden uzaklaşması için 30-60 saniye vakum işlemine devam edildi.
  9. Eluator™ Vakum Elüsyon Cihazının tabanına 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpü yerleştirilerek tüp sabitlendi ve tekrar vakum manifolduna yerleştirildi.
  10. Kolon üzerine 400–600µl Nükleaz içermeyen su eklenerek 1 dakika boyunca bekletildi. Tüm sıvı kolondan geçene kadar vakumlama işlemi yapıldı.
  11. Mikrosantrifüj tüpü içerisine toplanan DNA'lar kolondan alındı. Elde edilen DNA'ların kalite kontrolünün sağlanması için absorbanları ölçülerek %1.5'lük agaroz jelde yürütülerek istenilen bantta olup olmadığı kontrol edildi. Kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

### **3.2. COS-1 Hücrelerinin Kültürasyonu**

Tez kapsamında yapılacak olan bütün deneyler COS-1 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. COS-1 hücreleri Afrika Yeşil Maymunlarının (*Cercopithecus*

*aethiops*) böbrek dokusundan üretilmiş fibroblast benzeri hücre hatlarıdır. COS-1 hücre hattı primer hücre hattı olmayıp yabancı tip T antijenini kodlayan SV40'ın bir orijin kusurlu mutanlığı ile transformasyon yoluyla CV-1 hücre hattından 1980'lerin başında üretilmiştir. Hücreler, SV40 genomunun tek bir entegre kopyasını içermektedir. Sahip oldukları T antijeni sayesinde plazmitin yüksek kopya sayısını ve hızlı replikasyonunu sağlar. Ayrıca gerekli tüm proteinleri eksprese etme özelliği bulunmaktadır. COS-1 hücre hattı içerisinde yer alan AVPR2 geni, insan AVPR2 geni ile % 96.8 oranında homoloji göstermektedir.

COS-1 hücrelerinin hazırlanışı aşağıda maddeler halinde verilmektedir.

1. COS-1 hücre hattı hücre kültürü kaplarında (25 cm<sup>2</sup> veya 75 cm<sup>2</sup>) %10 fetal bovine serum, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2-3 gün süreyle çoğaltıldı.
2. Hücrelerin, kültür kabının yüzeyini yaklaşık olarak %80 konfluent bir biçimde kaplayıp kaplamadığı ışık mikroskobu aracılığıyla kontrol edildi. Konfluent olan hücreleri, hücre kültürü kapları yüzeyinden kaldırmak için öncelikle kap içerisindeki besiyeri çekildi. Hücrelerin zarar görmemesine dikkat edildi.
3. Hücreler 25 cm<sup>2</sup> kültür kabı için 2 ml, 75 cm<sup>2</sup> kültür kabı için 5 ml 1x PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi hücrelerin üzerine direkt gelmeyecek şekilde dikkatlice köşeden yapıldı. Daha sonra bütün kap yüzeyinde dikkatlice gezdirildi.
4. 1x PBS hücre kültür kabında çok tutulmayarak geri çekildi. Hücrelerin zarar görmemesi için 1 dakikadan fazla bekletilmemelidir.
5. Hücreleri kültür kabı yüzeyinden kaldırmak için 25 cm<sup>2</sup> kültür kabına 0,5 ml, 75 cm<sup>2</sup> kültür kabına 1,5 ml %0.25 Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi.
6. %0.25 Tripsin-EDTA çözeltisinin kültür kabının tüm yüzeyini kaplamasına dikkat edilerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2 dakika inkübe edildi. Hücrelerin zarar görmemesi için 2 dakikadan fazla bekletilmemelidir.
7. 2 dakika sonra inkübatörden alınan hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları kontrol edildi. Eğer kalkmayan hücre varlığı tespit edilirse kültür kabına yanlardan hafifçe vurularak kalkmaları sağlandı.
8. Hücre yüzeyinden kalkmış olan hücreleri nötralize etmek için 25 cm<sup>2</sup> kültür kabına 4,5 ml, 75 cm<sup>2</sup> kültür kabına ise 13,5 ml %10 fetal bovine serum, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM eklendi.
9. İyice pipetleme yapılarak hücreler homojen kıvama getirildi.

10. Thoma camı kullanılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanarak plate'ler hazırlandı.

### 3.3. COS-1 Hücrelerinin Transfeksiyonu

Yapılan deneysel çalışmalarda transfeksiyon ajanı olarak TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Yapılan tüm deney setlerinde kullanılan hücre kültür kabı boyutları, ekilen hücre miktarı ve kullanılan transfeksiyon ajan miktarları aşağıdaki Çizelge 3.1'de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. Deneysel Çalışmalara Göre Kullanılan Hücre Miktarları ve Transfeksiyon Koşulları

Deney	Kullanılan Hücre Kültür Kabı	Ekilen Hücre Sayısı (hücre/kuyu)	DNA Miktarı	TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)	Besiyeri Miktarı
MTT	96 well plate	15.000	20 ng	0,4 µl	20 µl (serumsuz)
Tripan Mavisi ile Boyama	96 well plate	15.000	20 ng	0,4 µl	20 µl (serumsuz)
Yüzey ELISA	48 well plate	40.000	70 ng	1 µl	70 µl (serumsuz)
Total ELISA	6 well plate	400.000	2000 ng	6 µl	400 µl (serumsuz)
Flow Sitometri	60mm plate	700.000	3000 ng	12 µl	600 µl (serumsuz)

### 3.4. Farmakolojik Şaperonlar için Uygun Konsantrasyonların Belirlenmesi

Mutant ve yabancı tip pLV2R vektörlerini geçici olarak ifade eden hücrelere uygulanacak farmakolojik şaperonların toksik etki göstermemesi için iki farklı yöntem

ile doz belirleme çalışmaları yapılmıştır. MTT testinde proliferasyona uğrayan hücreler artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile metiltiazol difenil tetrazolyumu suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürür. Oluşan bu kristaller dimetil sülfoksit (DMSO)'da veya izopropil alkolde çözünür. Hücre canlılığı spektrofotometrik olarak renk değişiminden belirlenir. Hücre canlılığı % olarak hesaplanır.

### 3.4.1. MTT Testi

Yapılan MTT testi protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Thoma camı kullanılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanarak 96 well plate'e 15.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
2. Ertesi gün transfeksiyon işlemi için Çizelge 3.1'de belirtilen miktarlarda yabancı tip pLV2R vektör DNA'sı, DMEM (serumsuz) ve TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) iyice karıştırılarak 20 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda plate'lerdeki hücrelerin üzerine 20 µl aktarıldı. Transfeksiyon süresinin 20 dakikadan az veya fazla olmamasına dikkat edildi.
3. Transfeksiyon işleminin kontrolünün sağlanmasında yeşil floresan proteinini ifade eden pEGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) vektörü kullanıldı. pEGFP vektörünün transfeksiyonu yabancı tip pLV2R vektör DNA'sı ile aynı koşullarda hazırlandı ve 2 adet kontrol hücre grubu üzerine eklendi.
4. pLV2R ve pEGFP vektörlerinin COS-1 hücrelerine transfekte olabilmesi için 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı.
5. 48 saat sonra transfeksiyon işleminin kontrolü için verimlilik pEGFP vektörü ile eş zamanlı kontrol edildi.
6. Literatür taramalarına istinaden uygulanacak olan farmakolojik şaperon dozları belirlenmiştir. YM087 (10 mM stok) ve VPA985 (1 mM stok) farmakolojik şaperonların belirlenen dozları seri seyreltme yapılarak hazırlanır. YM087 için hazırlanan konsantrasyonlar 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 0 M, VPA985 1mM stok konsantrasyonuna sahip olduğu için hazırlanan konsantrasyonlar 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M ve 0 M şeklindedir. Seri seyreltme işlemi için DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) besiyeri kullanıldı.



7. Transfeksiyondan 48 saat sonra kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak YM087 ve VPA985 için hazırlanan beş farklı konsantrasyon ve kontrol grupları üçer tekrar olacak şekilde 100 µl eklendi. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı.
8. Uygulanacak MTT dozu 1:9 = MTT:DMEM olacak şekilde hazırlandı.
9. 16 saat sonra inkübatörden alınan plate'lere ışık görmeyen bir ortamda 1/9 MTT:DMEM solüsyonundan 100 µl dağıtıldı. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonrası MTT:DMEM solüsyonu kuyulardan uzaklaştırıldı.
11. Reaksiyonu durdurmak için her kuyuya %100'lük 100 µl izopropanol eklendi.
12. ELISA okuyucuda 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

### **3.4.2. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi**

1. Thoma camı kullanılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanarak 96 well plate'e 15.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
2. Ertesi gün transfeksiyon işlemi için Çizelge 3.1'de belirtilen miktarlarda yabancı tip pLV2R vektör DNA'sı, DMEM (serumsuz) ve TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) iyice karıştırılarak 20 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda plate'lerdeki hücrelerin üzerine 20 µl aktarıldı. Transfeksiyon süresinin 20 dakikadan az veya fazla olmamasına dikkat edildi.
3. Transfeksiyon işleminin kontrolünün sağlanmasında yeşil floresan proteinini ifade eden pEGFP vektörü kullanıldı. pEGFP vektörünün transfeksiyonu yabancı tip pLV2R vektör DNA'sı ile aynı koşullarda hazırlandı ve 2 adet kontrol hücre grubu üzerine eklendi.
4. 48 saat sonra transfeksiyon işleminin kontrolü için verimlilik pEGFP vektörü ile eş zamanlı kontrol edildi. Kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak YM087 için hazırlanan 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M beş farklı konsantrasyon ve kontrol grupları ile VPA985 için hazırlanan 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M ve kontrol grubu üçer tekrar olacak şekilde 100 µl eklendi. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı.
5. 16 saat sonra inkübatörden alınan plate'lerden besiyeri uzaklaştırıldı.

6. Her kuyu üzerine 100 µl 1x PBS eklenerek hücreler yıkandı ve çok bekletilmeyerek tekrar uzaklaştırıldı.
7. Her kuyu üzerine 20 µl Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 2 dakika boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör içerisinde bekletildi.
8. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinde kalkıp kalkmadıkları gözlemlendi. Yapışık halde duran hücreler gözlemlenirse plate kenarına hafifçe vuruldu.
9. Her kuyudaki hücre üzerine 180 µl DMEM (%10 FBS, 100 U/ml Penisilin ve 100 µg/ml Streptomisin içeren) eklenerek pipetaj yapıldı ve mikrosantrifüj tüpleri içerisine toplandı.
10. Ayrı bir mikrosantrifüj tüpü içerisine 50 µl hücrelerden aktarıldı ve üzerine 50 µl %0,2'lik Tripan Mavisi (PBS içerisinde seyreltilir) solüsyonu eklendi.
11. Pipetaj yapılarak hücrelerin homojen karışması sağlandı.
12. Thoma camı üzerine 10 µl aktarılan hücreler ışık mikroskopu altında sayılarak canlı hücreler kaydedildi.

### **3.5. ELISA Deneyleri ile COS-1 Hücrelerindeki Reseptör İfadesinin Belirlenmesi**

C ucunda FLAG işareti, N ucunda HA işareti taşıyan mutant pLV2R vektörlerinin 2 farklı farmakolojik şaperon uygulaması sonucu hücre yüzeyindeki ve hücre içerisinde göstermiş oldukları toplam ifadelerin belirlenebilmesi için hücre yüzey ELISA ve total ELISA yöntemleri uygulanmıştır. Yöntemler için Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi hücreler hazırlanarak transfeksiyon işlemi uygulandı. Transfeksiyon işlemi sonrası plate içindeki besiyeri uzaklaştırılarak MTT ve Tripan Mavisi ile belirlenen uygun farmakolojik şaperon dozları her bir kuyuya eklenerek plate'ler hazırlandı. 16 saat inkübasyon süresi sonunda ELISA yöntemlerine başlandı.

#### **3.5.1. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi**

1. 16 saatlik inkübasyon sonrası kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 3 defa 200 µl 1x PBS ile kuyular yıkanır. İnkübasyon süresinin 2 dakikadan fazla olmamasına dikkat edildi.
3. Hücreler üzerine 250 µl %4 Formalin/PBS çözeltisi eklenerek fikse edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika 50 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.
4. 30 dakika sonra kuyulardan %4 Formalin/PBS çözeltisi uzaklaştırılarak 3 defa 200 µl 1x PBS ile yıkandı.

5. Hücrelere 500 µl Bloklama solüsyonu (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM) eklenerek 37 °C'de 1 saat 50 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.
6. 1 saat sonunda kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı ve 3 defa 200 µl 1x PBS ile yıkandı.
7. Hücreler üzerine 100 µl peroksidaz işaretli monoklonal anti-HA (HA-Tag (6E2) Mouse mAb#2367- Cell Signaling Technology) antikoru 1:1000 seyretilmiş şekilde eklenerek 2 saat 37 °C'de 50 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.
8. Kuyular içerisinde hücrelere bağlanmayan antikoları uzaklaştırmak için 3 defa 200 µl 1x PBS ile yıkandı.
9. Substrat reaksiyonu için 25ml Substrat Buffer, 10 mg o-fenilendiamin (0.1 M fosfat/sitrat tamponu içerisinde), 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karıştırılarak hazırlandı, kuyulara 150 µl eklendi ve karanlık bir alanda 15-30 dakika arası oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
10. Renk değişimi gözlemlendiği zaman reaksiyonu durdurmak için hücreler üzerine 50 µl 1 mol/L HCl eklendi.
11. ELISA okuyucuda ölçüm yapabilmek için 48 well plate içerisindeki hücreler 96 well plate'e aktarılarak 492 nm'de ölçüm alındı.

### **3.5.2. Total ELISA**

1. 16 saatlik inkübasyon sonrası kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak 2 ml 1x PBST (%0.05 Tween-20 içeren 1x PBS) ile yıkandı.
2. 1x PBST ile yıkama işleminden sonra 2 dakikadan fazla kalmamasına özen gösterilerek kuyulardan uzaklaştırıldı.
3. Kuyulara 2 ml saf dH<sub>2</sub>O eklenerek hücreler yüzeyden dikkatlice kazındı ve mikrosantrifüj tüplerine toplandı.
4. Mikrosantrifüj tüplerine toplanan hücreler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası peletlere zarar gelmeyecek şekilde tüplerden su uzaklaştırıldı.
6. Hücreler üzerine 150 µl Lizis buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EDTA, %1 Nadesoxycholate, 0.2 mM NP-40) eklenerek gece boyu +4 °C'de inkübasyona bırakıldı.

7. Aynı gün içerisinde Maxisorb 96-well plate'ler 0.15 M borat tamponu (pH 8.0) içinde bulunan 100 µl poliklonal anti-FLAG antikor (1:1000 seyreltilmiş) ile (M2; Sigma–Aldrich) kaplanarak 4°C'de gece boyu inkübe edildi.
8. Ertesi gün plate içeriği boşaltılarak kuyular 100 µl 1x PBST ile 3 defa yıkandı. Her yıkama esnasında plate'lerin 2 dakikadan fazla bekletilmemesine dikkat edildi.
9. Kuyulara 200 µl Bloklama solüsyonu (%10 FBS içeren DMEM) eklenerek 1 saat boyunca 37°C, 50 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
10. 1 saat sonunda plate içeriği boşaltılarak 100 µl 1x PBST ile 3 defa yıkandı.
11. Gece boyu +4°C'de inkübe edilen hücreler üzerine 300 µl 1x PBST eklenerek iyice çözüldü. 2 dakika boyunca 13.000 rpm'de sanrifüj edildi.
12. Plate içeriğine santrifüj işlemi yapılmış hücrelerden 3'lü tekrar olacak şekilde her bir örnekten 100 µl eklendi.
13. Plate üzerine eklenmiş hücreler 2 saat boyunca 37°C, 50 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
14. Plate içeriği boşaltılarak 100 µl 1x PBST ile 3 defa yıkandı.
15. Her bir kuyu içerisine 100 µl 1x PBST içerisinde hazırlanmış monoklonal anti-HA (HA-Tag (6E2) Mouse mAb#2367-Cell Signaling Technology) antikorunu (1:1000 seyreltilmiş) eklenerek 1 saat boyunca 37°C, 50 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
16. 1 saat sonunda plate içeriği boşaltılarak 100 µl 1x PBST ile 3 defa yıkandı.
17. Substrat reaksiyonu için 25ml Substrat Buffer, 10 mg o-fenilendiamin (0.1 M fosfat/sitrat tamponu içerisinde), 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karıştırılarak hazırlandı, kuyulara 150 µl eklendi ve karanlık bir alanda 15-30 dakika arası oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
18. Renk değişimi gözlemlendiği zaman reaksiyonu durdurmak için hücreler üzerine 50 µl 1 mol/L HCl eklendi.
19. ELISA okuyucuda 492 nm'de ölçüm alındı.

### **3.6. Flow Sitometri Yöntemi ile COS-1 Hücre Yüzeyindeki Reseptör İfadesinin Belirlenmesi**

Flow sitometri yöntemi öncesi hücreler Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi hazırlanarak transfeksiyon işlemi yapıldı. Transfeksiyon işlemi sonrası besiyeri uzaklaştırıldı.

Farmakolojik şaperon uygulaması sonrası 16 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 16 saat sonunda aşağıdaki yöntemler izlendi:

1. 60 mm plate içeriğinden besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Hücrelere 400 µl Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör içerisinde 2 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası 1600 µl DMEM (%10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren) eklenerek hücreler kültür kabına tekrar yapışmadan mikrosantrifüj tüpü içerisine toplandı.
4. pL (AVPR2 dizisi içermeyen boş vektör) içeren hücrelerle Thoma camında sayım yapıldı. Flow sitometriden kalite bir sonuç almak için hücrelerin yaklaşık olarak 1.000.000 hücre/ml olması gerekmektedir.
5. Mikrosantrifüj tüpü içerisine toplanan hücreler 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası hücre peletlerine zarar gelmeyecek şekilde süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı.
7. Hücre üzerine 500 µl 1x PBS eklenerek iyice çözülür. 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası hücre peletlerine zarar gelmeyecek şekilde süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı.
9. Hücre üzerine 500 µl 1x PBS eklenerek iyice çözüldü. 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası hücre peletlerine zarar gelmeyecek şekilde süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı ve üzerlerine 100 µl %4 Formalin/PBS eklenerek iyice karıştırılarak hücrelerin çözümlenmesi sağlandı.
11. 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı.
12. Hücre üzerine 500 µl 1x PBS eklenerek iyice çözüldürülerek 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı.
13. Taze hazırlanan %0,5 BSA/PBS (100 ml 1x PBS içerisinde 0,5 g Bovine Serum Albumin çözdürülür) içerisine 1:100 oranında HA-Tag (6E2) Mouse mAb (Alexa (R) 488 Conjugate) (Cell Signaling Technology) antikor ekleni ve kuyulara dağıtıldı. Bu işlem yapılırken ortamın ışık görmemesine dikkat edildi.
14. Alüminyum ile hücrelerin üzeri iyice örtülerek oda ısısında 100 rpm çalkalamalıda 1 saat inkübe edildi.

15. 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı.
16. 1 kere 500 µl 1x PBS eklenerek hücreler yıkandı ve 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
17. Süpernatant kısmı uzaklaştırılan hücreler üzerine 200 µl 1x PBS eklenerek iyice çözdürüldü.
18. Çözdürülen hücreler flow tüplerine numaralandırılarak aktarıldı.
19. BD FACSCanto™ II cihazı kullanılarak ölçüm alındı.

### **3.7. İstatistiksel Yöntemler**

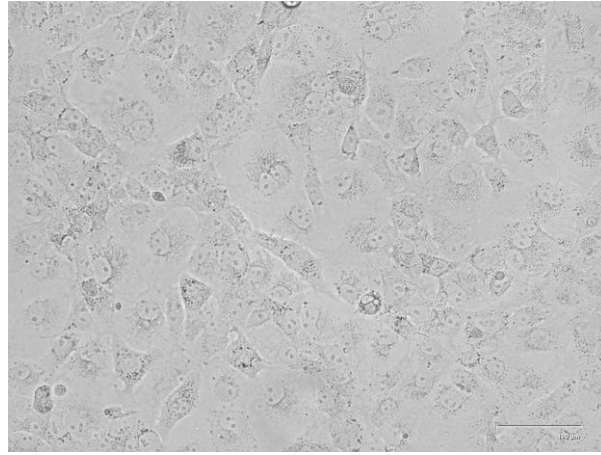
Tez kapsamında yapılan deneysel çalışma sonuçlarını istatistiksel olarak değerlendirmek için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Verilerin S.D. ve S.E.M. değerleri GraphPad Prism 9.3.0 yazılım programı kullanılarak hesaplanmıştır. Verilerdeki anlamlılık düzeyi  $P < 0.05$  olarak alınmıştır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. COS-1 Hücrelerinin Üretilmesi ve Transfeksiyonu

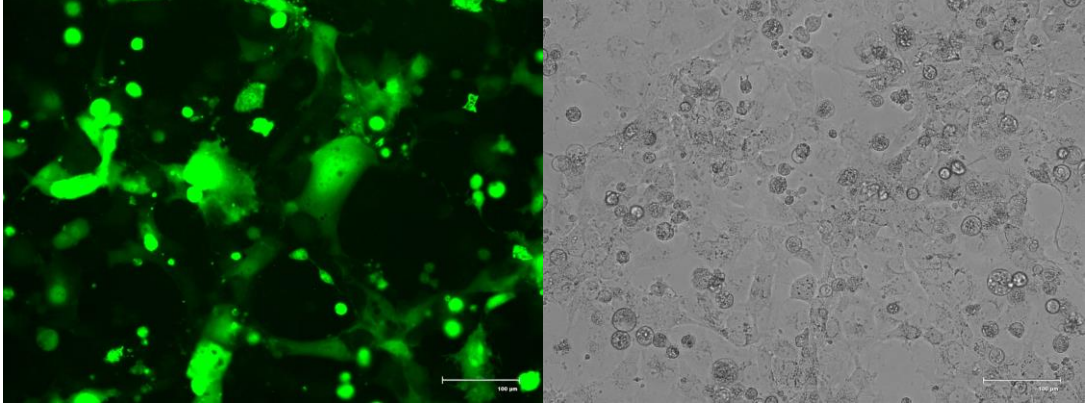
Tez kapsamında kullanılan COS-1 hücreleri %10 fetal bovine serum, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde çoğaltılmış, pasajlanmış ve ilgili her bir deney seti için hücre hazırlıkları yapılmıştır.

Şekil 4.1. COS-1 hücrelerinin transfeksiyon uygulanmadan önceki beyaz ışık altında alınmış görüntüsünü içermektedir.



Şekil 4.1. COS-1 Hücrelerinin Beyaz Işık Altında Alınan Görüntüleri

Transfeksiyon işleminin başarılı olması için pEGFP vektörü ile transfekte olmuş hücrelerin yaklaşık olarak %80-90 konfluent yapıda olması beklenir. Aşağıda Şekil 4.2.'de beyaz ve yeşil ışık altında transfeksiyon sonrası COS-1 hücrelerine ait görüntüler yer almaktadır. Sol alt fotoğraf yeşil ışık altında pEGFP ile transfekte olmuş COS1 hücrelerini göstermektedir. Sağ alt fotoğraf beyaz ışık altında pEGFP ile transfekte olmuş COS-1 hücrelerini göstermektedir.



Şekil 4.2. Transfeksiyon Sonrası COS-1 Hücresi Görüntüleri

#### 4.2. MTT Analizi Sonuçları

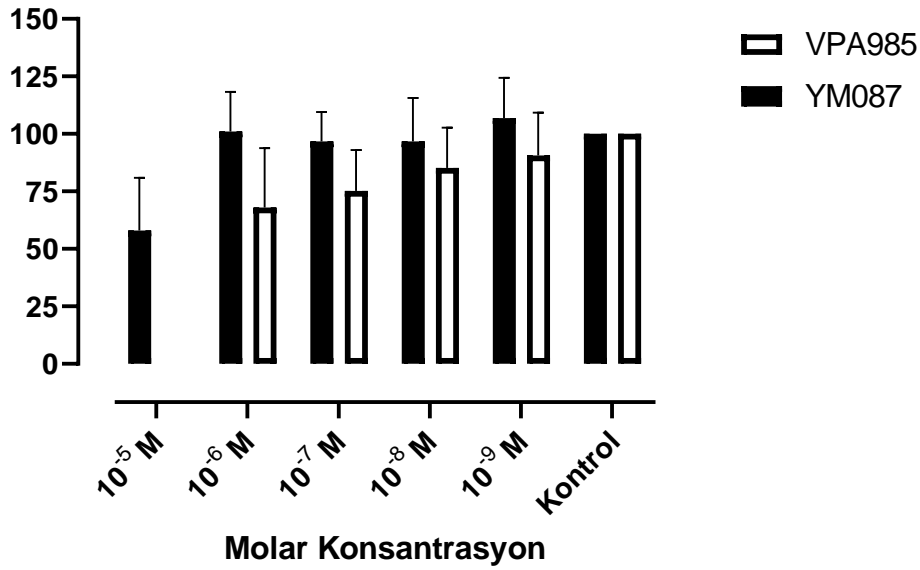
COS-1 hücrelerine transfekte edilen yabancı tip pLV2R vektörüne uygulanan YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonlarının hangi dozda uygulanması gerektiğini belirleyebilmek için MTT testi gerçekleştirilerek % hücre canlılığı belirlenmiştir. MTT testi sonucu elde edilen veriler çizelge halinde aşağıda verilmiş olup aynı zamanda grafikleri de çizilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda VPA985 ve YM087 farmakolojik şaperonlarının  $10^{-9}$  M konsantrasyonda uygulanmasına karar verilmiştir. VPA985 farmakolojik şaperonun stok konsantrasyonu 1 mM olduğu için en yüksek denemeye  $10^{-6}$  M konsantrasyondan başlanmıştır.



Çizelge 4.1. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonları için MTT Uygulamasının % Sonuçları S.D.: Standart sapma, n: Bağımsız deney seti (Her bir bağımsız deney seti kendi içerisinde 3 tekrarludur)

	YM087 (n:4)		VPA985 (n:4)	
	% Ortalama	± S.D.	% Ortalama	± S.D.
10 <sup>-5</sup> M	58	19,8		
10 <sup>-6</sup> M	101	14,9	67,9	22,4
10 <sup>-7</sup> M	96,7	11	75,2	15,3
10 <sup>-8</sup> M	96,7	16,3	85,2	15,1
10 <sup>-9</sup> M	106,8	15,1	90,5	16,1
Kontrol	100		100	

### 16 Saat İnkübasyon



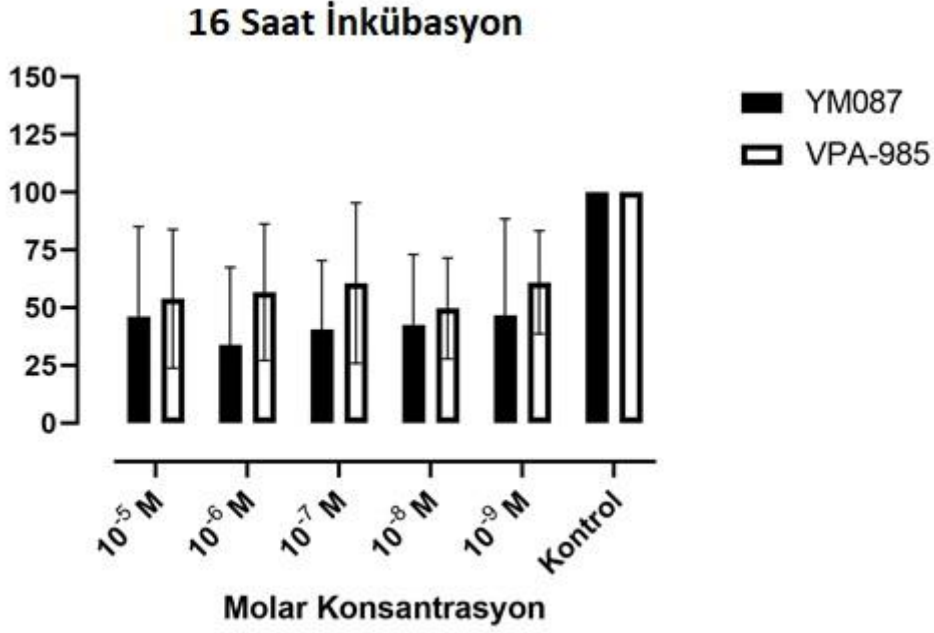
Şekil 4.3. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonlarının Uygulanması Sonrası Elde Edilen MTT Grafığı.

### 4.3. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi Sonuçları

MTT testinde olduğu gibi COS-1 hücrelerine transfekte edilen yabancı tip pLV2R vektörüne uygulanan YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonlarının hangi dozda uygulanması gerektiğini belirleyebilmek için ayrıca Tripan mavisi ile boyama yöntemi yapılarak canlı hücre sayıları % olarak belirtilmiştir. MTT ve tripan mavisi ile boyama yöntemi birlikte değerlendirilerek uygulanacak farmakolojik şaperonların her birinin konsantrasyonu  $10^{-9}$  M konsantrasyonda uygulanması kabul edilmiştir.

Çizelge 4.2. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonlarının Uygulanması Sonrası Hücrelerin Tripan Mavisi ile Boyama Sonuçları S.D.: Standart sapma, n: Bağımsız deney seti (Her bir bağımsız deney seti kendi içerisinde 3 tekrarludur)

	YM087 (n:3)		VPA985 (n:3)	
	% Ortalama	± S.D.	% Ortalama	± S.D.
$10^{-5}$ M	46	34		
$10^{-6}$ M	33,9	29	56,8	25
$10^{-7}$ M	40,5	25	60,7	30
$10^{-8}$ M	42,5	26	49,7	19
$10^{-9}$ M	46,8	36	61,03	19,3
Kontrol	100		100	



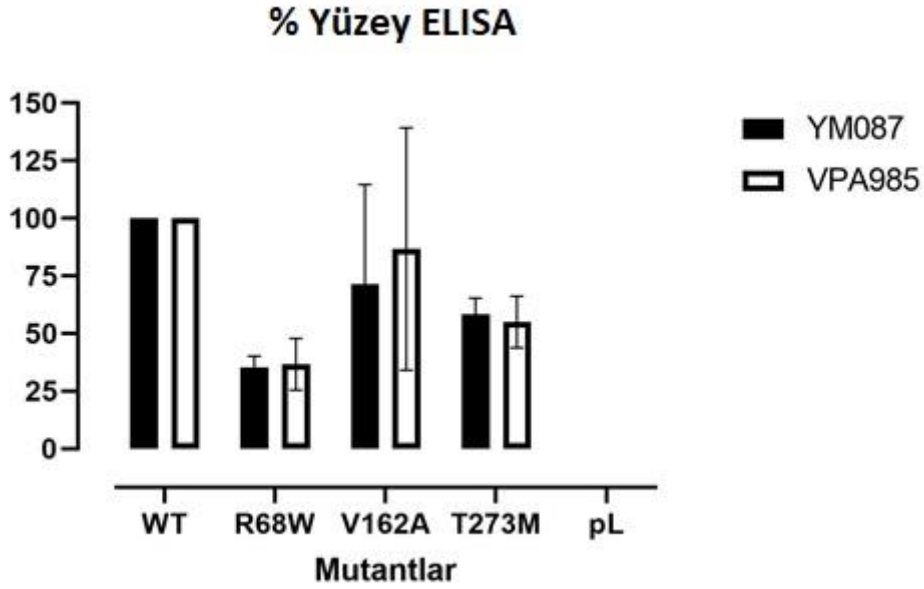
Şekil 4.4. YM087 ve VPA985 Farmakolojik Şaperonlarının Uygulanması Sonrası Hücrelerin Tripan Mavisi ile % Canlılık Grafiği

#### 4.4. Hücre Yüzey ELISA Yöntemi Sonuçları

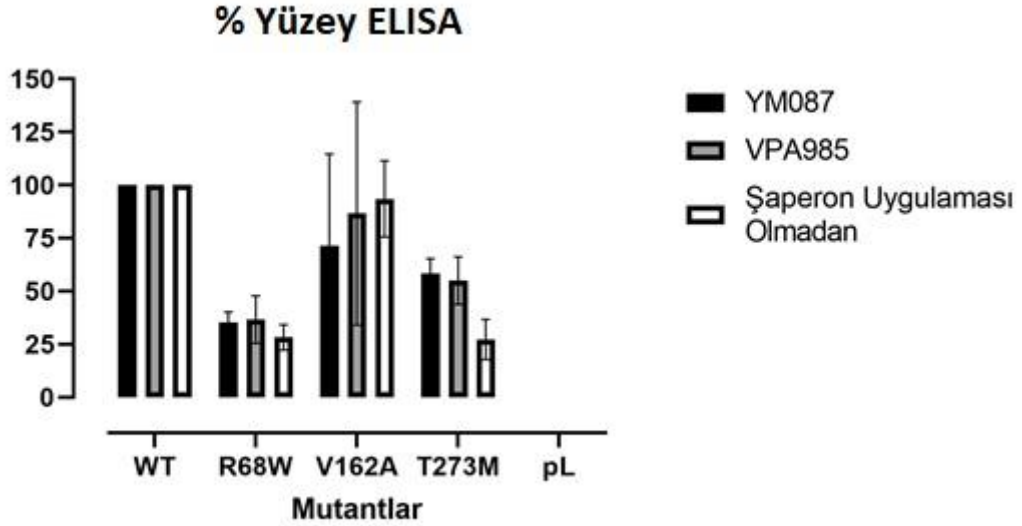
Mutant AVPR2'lerin farmakolojik şaperon uygulaması sonucu hücre yüzeyinde ne kadar ifade olduklarını belirleyebilmek için hücre yüzey ELISA deneyi yapılmıştır. YM087 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası mutant reseptörlerin hücre yüzey ifadesi ortalama R68W için %35,3, V162A için %71,5 ve T273M için ise %58,3 olarak bulunmuştur. VPA985 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası mutant reseptörlerin hücre yüzey ifadesi ortalama R68W için %36,6, V162A için %86,6 ve T273M için ise %55 olarak bulunmuştur. Sonuçları tartışma kısmında TÜBİTAK SBAG 112S513 no'lu proje kapsamında yapılan fonksiyon analiz çalışmaları ile birlikte karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Çizelge 4.3. Mutant AVPR2'lerin Hücre Yüzey ELISA Sonuçları WT: Yabanıl tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör, S.D.: Standart Sapma, S.E.M.: Ortalamanın Standart Hatası, n: Bağımsız deney seti (Her bir bağımsız deney seti kendi içerisinde 4 tekrarludur)

	YM087 (n:3)			VPA985 (n:3)		
	% Ortalama	± S.D.	S.E.M.	% Ortalama	± S.D.	S.E.M.
WT	100			100		
R68W	35,3	4	2,8	36,6	11	6,4
V162A	71,5	43	30,5	86,6	52	30,4
T273M	58,3	7	4,05	55	11	6,4
pL	0			0		



Şekil 4.5. Mutant AVPR2'lerin Farmakolojik Şaperon Uygulaması Sonrası Hücre Yüzey ELISA Grafiği. WT: Yabanıl tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör



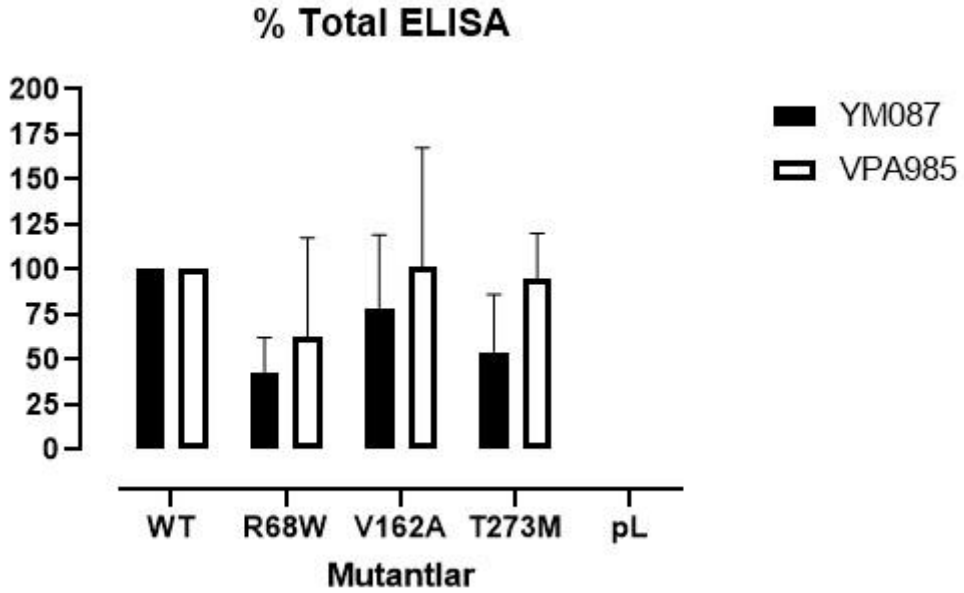
Şekil 4.6. Karşılaştırmalı Hücre Yüzey ELISA Grafiği. WT: Yabancıl Tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör. Tez çalışmasına dahil edilen mutant reseptörlerin herhangi bir şaperon uygulaması yapılmadan elde edilmiş fonksiyon analiz testlerine ait yüzey ELISA sonuçları Beril ERDEM TUNÇDEMİR'in doktora tez çalışmasından alınarak karşılaştırılmıştır [149].

#### 4.5. Total ELISA Yöntemi Sonuçları

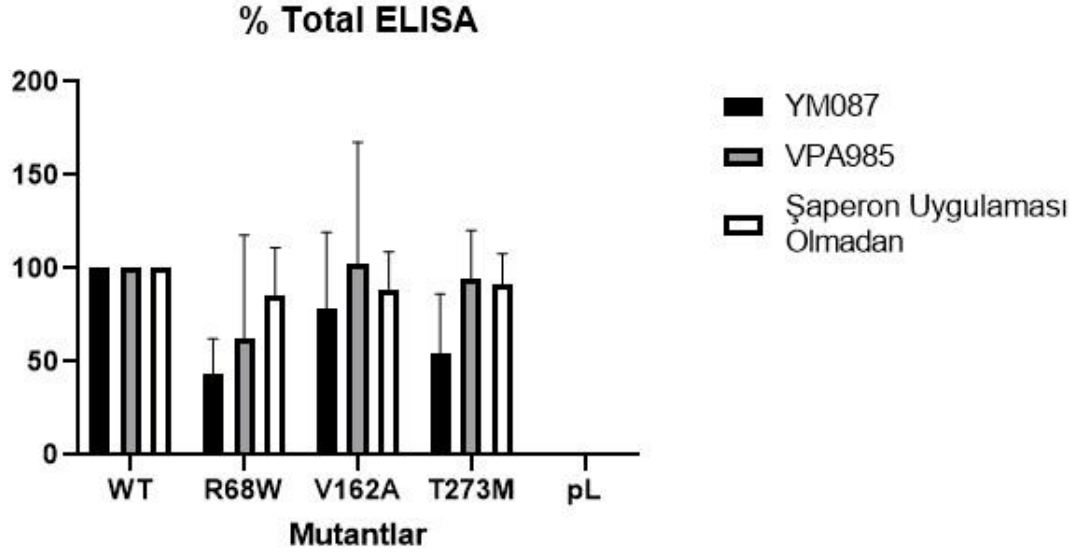
Mutant AVPR2'lerin YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonlarının uygulaması sonrası hücre içerisindeki toplam ifadelerinin belirlenebilmesi için total ELISA yöntemi uygulanmıştır. YM087 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası mutant reseptörlerin toplam ifadesi ortalama R68W için %43, V162A için %78,7 ve T273M için ise %54,3 olarak bulunmuştur. VPA985 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası mutant reseptörlerin toplam ifadesi ortalama R68W için %62,8, V162A için %102 ve T273M için ise %94,5 olarak bulunmuştur. Sonuçlar tartışma kısmında TÜBİTAK SBAG 112S513 no'lu proje kapsamında yapılan fonksiyon analiz çalışmaları ile birlikte karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.4. Mutant AVPR2'lerin Total ELISA Sonuçları. WT: Yabanıl Tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör, S.D.: Standart Sapma, S.E.M.: Ortalamanın Standart Hatası, n: Bağımsız deney seti (Her bir bağımsız deney seti kendi içerisinde 3 tekrarludur)

	YM087 (n:3)			VPA985 (n:3)		
	% Ortalama	± S.D.	S.E.M.	% Ortalama	± S.D.	S.E.M.
WT	100			100		
R68W	43	19,2	7,8	62,8	54,9	24,5
V162A	78,7	40,4	20,2	102	65,5	37,8
T273M	54,3	31,9	13	94,5	25,6	12,8
pL	0			0		



Şekil 4.7. Mutant AVPR2'lerin Total ELISA Grafiği. WT: Yabanıl Tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör



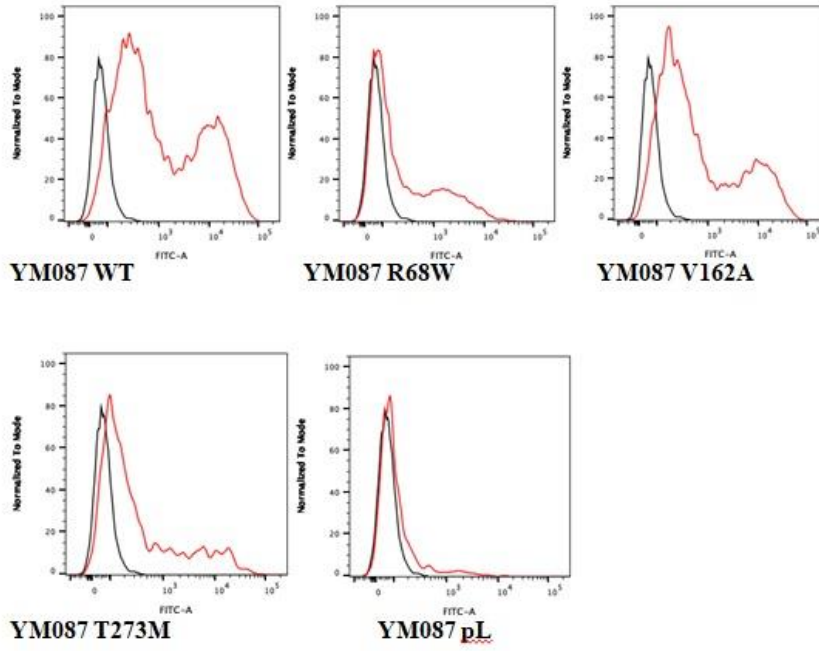
Şekil 4.8. Karşılaştırmalı Total ELISA Grafiği. WT: Yabanıl Tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör. Tez çalışmasına dahil edilen mutant reseptörlerin herhangi bir şaperon uygulaması yapılmadan elde edilmiş fonksiyon analiz testlerine ait total ELISA sonuçları Beril ERDEM TUNÇDEMİR'in doktora tez çalışmasından alınarak karşılaştırılmıştır [149].

#### 4.6. Flow Sitometri Yöntemi Sonuçları

Flow sitometrisi kromotografik bir yöntem olup sıvı akışında hareket eden hücrelerin, lazer algılama alanından yansıtılan ışık demetleri yoluyla algılanmasına yarayan bir sistemdir [150]. Yaptığımız deney kapsamında HA-Tag (6E2) Mouse mAb (Alexa (R) 488 Conjugate) (Cell Signaling Technology) antikoru kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Hücrelerdeki mutant reseptör ifadeleri, YM087 farmakolojik şaperonunun uygulanması sonrası ortalama R68W için %64,6, V162A için %105,2 ve T273M için %63,4; VPA985 uygulanması sonrası R68W için %65,06, V162A için %102,7 ve T273M için ise %76,6 olarak tespit edilmiştir.

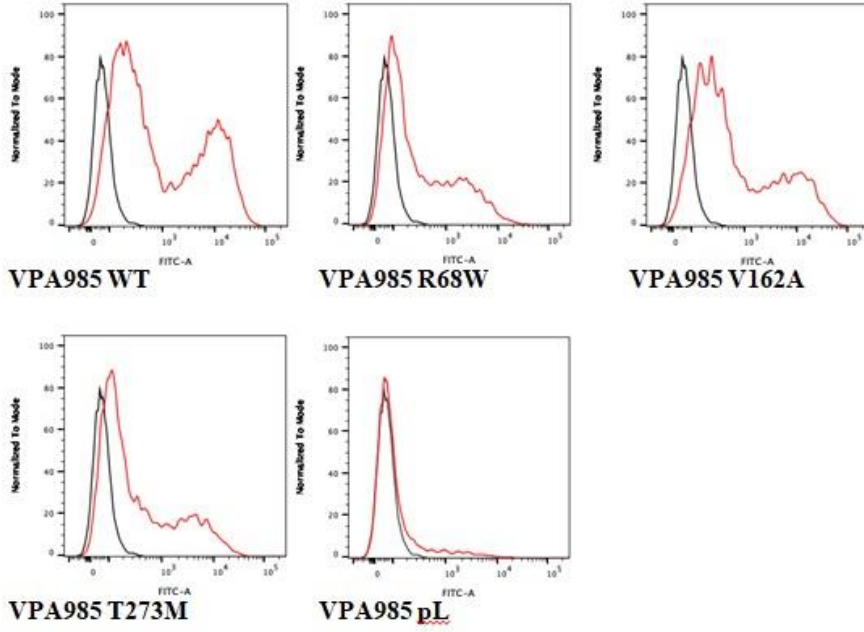
Çizelge 4.5. Mutant AVPR2'lerin Flow Sitometri Yöntemi Sonuçları. WT: Yabanıl Tip, pL: AVPR2 dizisi içermeyen Boş Vektör, S.D.: Standart Sapma, n: Bağımsız Deney Seti (Her bir bağımsız deney seti 1 tekrarludur)

	YM087 (n:3)		VPA985 (n:3)	
	% Ortalama	S.D.	% Ortalama	S.D.
WT	100		100	
R68W	64,6	25,1	65	18
V162A	105,2	29,6	102,7	13,97
T273M	63,4	33,3	76,6	25,1
pL	0		0	

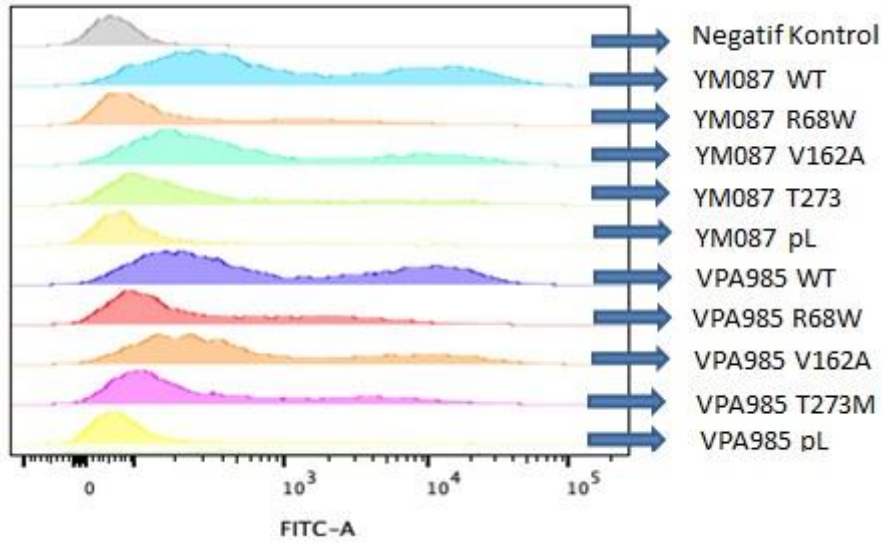


Şekil 4.9. YM087 Uygulaması Sonrası Flow Sitometri Grafiği. X eksen: Antikoru denkle geldiği renk konsantrasyonu Y eksen: Hücre yoğunluğu Siyah çizgi: Negatif Kontrol Kırmızı çizgi: Antikor işaretli örnek





Şekil 4.10. VPA985 Uygulamasını Sonrası Flow Sitometri Grafiği. X eksenini: Antikorun denk geldiği renk konsantrasyonu Y eksenini: Hücre yoğunluğu Siyah çizgi: Negatif Kontrol Kırmızı çizgi: Antikor işaretli örnek



Şekil 4.11. YM087 ve VPA985 Flow Sitometri Kromotogram Görüntüsü.

#### 4.7. Verilerin Analizi

Mutant AVPR2'lerin farmakolojik şaperon uygulaması sonucu hücre yüzeyinde ne kadar ifade oldukları hücre yüzey ELISA deneyi yapılarak belirlenmiştir. Çizelge 4.6.'da mutant AVPR2'lerin kontrol grupları ile karşılaştırılmalı olarak P değerleri

hesaplanmıştır. YM087 farmakolojik şaperonun uygulanması sonrası R68W için  $P = 0,0187$ , V162A için  $P = 0,5$  ve T273M için ise  $P = 0,087$  olarak bulunmuştur. VPA985 farmakolojik şaperonun uygulanması sonrası R68W için  $P = 0,0356$ , V162A için  $P = 0,7112$  ve T273M için ise  $P = 0,1652$  olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Mann-Whitney U Testi Sonuçlarına Göre P Değerleri. GraphPad Prism 9.3.0 yazılım programı kullanılarak hesaplanmıştır. Verilerdeki anlamlılık düzeyi  $P < 0.05$  olarak alınmıştır

	Kontrol Grubu ile YM087	Kontrol Grubu ile VPA985
R68W	0,0187	0,0356
V162A	0,5	0,7112
T273M	0,087	0,1652

## 5. TARTIŞMA

Tez kapsamında, COS-1 hücrelerine uygulanacak olan YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonların doz miktarlarının, MTT (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3.) ve Tripan Mavisi ile boyama (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.4.) deneylerinden elde edilen sonuçlara göre  $10^{-9}$  M olmasına karar verilmiştir. *AVPR2* geninde görülen mutasyonlar sonucu fonksiyon kaybına neden olan R68W, V162A ve T273 mutasyonlarını içeren ifade vektörleri COS-1 hücrelerine transfekte edilmiş ve daha sonra bu hücrelere YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonları uygulanmıştır. Mutant reseptörlerin hücre yüzeyindeki ve hücre içerisindeki toplam miktarlarına hücre yüzey ELISA ve total ELISA yöntemleri kullanılarak bakılmıştır. Ayrıca bu mutant reseptörlerin hücre yüzeyindeki ifadeleri bir başka deneysel yöntem olan Flow sitometri ile incelenmiştir.

T273M mutasyonu treonin amino asitinin metiyonin amino asitine dönüşmesiyle ortaya çıkan yanlış anlamlı mutasyonlardan biridir. Treonin amino asiti hidrofilik R gruplarına sahip polar amino asit sınıfına dahildir. Metiyonin amino asiti ise hidrofobik polar olmayan amino asit sınıfına dahildir. Özellikle proteinlerin sahip oldukları bu özellikler konformasyonel olarak üç boyutlu yapılarına katlanmalarında önem arz etmektedir. Polar amino asitin mutasyonlar sonucu polar olmayan bir yapıya dönüşmesinin protein katlanmasında ciddi bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. R68W mutasyonu ise arjinin amino asitinin triptofan amino asitine dönüşmesiyle oluşmuş yanlış anlamlı bir mutasyondur. Arjinin amino asiti pozitif yüklü polar bir amino asittir. Ancak triptofan amino asiti tam tersi şekilde polar olmayan bir amino asittir. T273M ve R68W mutantlarında amino asit gruplarındaki belirgin bu grup farklılığı proteinin üç boyutlu yapısını da etkileyeceği için en fazla fonksiyon kaybının oluşmasında etken olabileceği düşünülmektedir. V162A mutasyonunda valin amino asiti alanine dönüşmüştür. Ancak valin ve alanin amino asitlerinin her biri polar olmayan amino asit grubu içerisinde yer almaktadır. Yanlış anlamlı mutasyon sonucu amino asit gruplarında herhangi bir değişim gözlemlenmediği için V162A mutantının yabanıl tipe yakın bir fonksiyonel özellik gösterdiği gözlemlenir. Bu sebeple grubumuz tarafından literatüre kazandırılan mutantlar arasında bu mutantların çalışmaya dahil edilmesine karar verilmiştir.

Grubumuzun daha önce yaptığı TÜBİTAK SBAG 112S513 nolu proje ve Dr. Beril Erdem Tunçdemir'in doktora tezi kapsamında R68W, V162A ve T273M mutantlarının fonksiyon analiz çalışmaları tamamlanmıştır [148, 149]. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar ile yapılan önceki çalışmalar karşılaştırılmıştır.

## 5.1. YM087

*AVPR2* geninde 68. kodonda ve 273. kodonda meydana gelen mutasyon sonucu oluşan R68W ile T273M, grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda en fazla fonksiyon kaybı gösteren mutantlar olmuştur [149]. 162. kodondaki mutasyon sonucu oluşan V162A'nın ise hücrede en fazla ifade olan mutant protein olduğu saptanmıştır [149]. Önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, *AVPR2*'nin kendi agonisti olan AVP ile uyarılan mutantlar üzerinde yüzey ve total ELISA testleri uygulanmıştır [148, 149]. Yüzey ELISA sonuçlarına göre mutant proteinlerinin hücre yüzeyi ifadesi WT'a kıyasla R68W %28,3'lük bir oranda ifade olmuştur [149]. Mutant R68W reseptörünün hücre yüzeyindeki ifadesi YM087 şaperon uygulaması sonrası bir miktar artarak %35,3'e (Çizelge 4.3.) yükselmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p = 0,0187$ ; Çizelge 4.6.) olmakla beraber şaperonun mutant hücre yüzeyindeki ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. Mutant T273M reseptörünün hücre yüzeyindeki ifadesi %27,3'lük bir oranda ifade olmuştur [149]. YM087 şaperon uygulaması sonrası hücre yüzeyindeki ifadesi artarak %58,3 (Çizelge 4.3.) olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen ( $p = 0,087$ ; Çizelge 4.6.) yüzdelere göre şaperon uygulaması sonrası mutant reseptörün hücre içinde tutuklu kalmasının önüne geçerek bir miktar hücre yüzeyindeki ifadesini arttırdığı görülmüştür. WT'a yakın bir karakteristik özellik gösteren V162A %93,6'lık bir oranda ifade olmaktadır [149]. YM087 şaperon uygulaması sonrası mutantların hücre yüzeyindeki ifadesi %71,5 (Çizelge 4.3.) olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen ( $p = 0,5$ ; Çizelge 4.6.) reseptörün hücre yüzeyi ifadesinde bir miktar düşüş gözlenmiştir. Önceki çalışmada yapılan analizler neticesinde en fazla fonksiyon kaybı gösteren R68W ve T273M mutant proteinlerin şaperon uygulaması sonrası yüzey ifadesinde artış gözlenmiştir. R68W, T273M'e kıyasla çok az miktarda yüzey ifadesini arttırmıştır. Buradan anladığımız mutasyon sonucu ER kalite sistemlerinden geçemeyip hücre yüzeyine ulaşamayan T273M mutant proteini YM087 farmakolojik şaperonu

uygulamasý sonrası kalite kontrol sistemlerinden geçerek hücre yüzey ifadesini arttırabilmiştir. WT'a yakın karakteristik özellik gösteren V162A'nın yüzeydeki ifadesi doğal agonistine karşın YM087 farmakolojik şaperon uygulamasý sonrası az bir miktar azalmıştır. Ancak hücre yüzeyinde halihazırda halen WT'a yakın bir ifade göstermektedir. Yüzey ELISA sonuçları ile flow sitometri sonuçlarına baktığımızda kendi içlerinde korelasyon gösterdiğini gözlemlemekteyiz.

TÜBİTAK SBAG 112S513 no'lu proje ve Dr. Beril Erdem Tunçdemir'in doktora tez çalışmaları kapsamında proteinin kendi agonisti olan AVP ile uyarılan mutantların hücredeki total ifadeleri, total ELISA yöntemi kullanılarak gözlenmiştir. R68W mutant reseptörün hücredeki ifadesi total ELISA sonucu R68W %85,6 olarak saptanmıştır [148, 149]. R68W mutant reseptörü üzerinde uygulanan YM087 farmakolojik şaperon uygulamasý neticesinde hücredeki total ifadesi R68W %43 (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.) olarak gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda fonksiyon analizi yapılmış olan R68W mutantının total ifadesi WT'a yakın bir karakteristik özellik göstermiştir [149]. Bu tez kapsamında uygulanan YM087 şaperon uygulamasý neticesinde bu ifadenin azaldığını görmekteyiz. Mutant reseptörün hücredeki total ifadesindeki bu düşüş bazı farmakolojik şaperonların hücre içerisinde toksik etkiye sebep olabilmelerinden kaynaklanabilmektedir. WT'a yakın bir fonksiyonel özellik gösteren V162A'nın hücredeki total ifadesi %88,4 olarak gözlenmiştir [149]. V162A mutant reseptörüne uygulanan YM087 farmakolojik şaperon uygulamasý neticesinde hücredeki total ifadesi %78,7 (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.) olarak bulunmuştur. Şaperon uygulamasý sonrası çok az da olsa düşüş göstermesine rağmen halihazırda halen WT'a yakın bir karakteristik özellik göstermeye devam etmektedir. En fazla fonksiyon kaybı görülen T273M mutant reseptörün hücredeki total ifadesi yapılan fonksiyon analiz çalışmaları neticesinde %91,6 olarak bulunmuştur [149]. YM087 şaperon uygulamasý sonrası hücredeki total ifadesi %54,3 (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.) olarak bulunmuştur. T273M mutant reseptörün hücredeki total ifadesinde bir azalma görülmektedir. Özellikle bu mutasyona sahip olan mutant reseptörlerin ER'un kalite kontrol sistemlerinden geçemeyerek hücre yüzeyine ulaşmadığı ve ER içerisinde biriktiği düşünülmektedir [151]. Normal koşullarda WT'a yakın bir fonksiyon göstermesini beklediğimizi R68W ve T273M mutant reseptörleri yaklaşık olarak yarı yarıya bir düşüş yaşamıştır. Bütün sonuçları bir

bütün halinde karşılaştığımızda YM087 farmakolojik şaperonun üç mutant reseptör üzerinde kurtarıcı etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Noriko Makita ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada COS-7 hücrelerine transfekte edilen T273M mutantları agonist farmakolojik şaperon olan OPC5 ile çalışılmıştır [151]. Ayrıca hücreler kendi doğal agonisti olan AVP ile de işleme tabi tutularak yüzey ELISA yöntemi kullanılarak yüzeydeki ifade düzeyleri ölçülmüştür. Bu çalışmada doğal agonistine karşı OPC5 farmakolojik şaperonu uygulaması sonrası T273M mutantının kısmen ifade edildiği bulunmuştur. V2R-WT hücrelerinde AVP ve OPC5 uygulanmasının hücre yüzeyindeki V2'nin ifade düzeyinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Agonist olarak çalışan iki molekülün reseptör üzerinde desensitizasyona yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada OPC5 agonist farmakolojik şaperonun T273M gibi güçlü bir mutant üzerinde reseptörün duyarsızlaşmasına neden olduğu gözlemlenmiştir [151]. Bu çalışmadan yola çıkarak özellikle antagonist farmakolojik şaperonların agonistlere oranla reseptör stabilizasyonunu sağlamasında kısmen daha iyi olduğunu söyleyebiliriz. Agonist şaperonların reseptör üzerindeki güçlü etkileşimlerle desensitizasyona neden olarak reseptörün duyarsızlaşmasına yol açabileceği öngörülmektedir. Agonistlerin yapılan çalışmada daha zayıf AVPR2 mutant proteinleri üzerinde etkili olabildiği gözlenmiştir. Bu tez kapsamında güçlü bir mutant özellik gösteren T273M proteini üzerindeki etkisine bakılacak olursa agonistlerden daha etkili olabildiği görülmüştür.

Virginie Bernier ve arkadaşlarının X'e bağlı NDI mutantları üzerinde yaptıkları çalışmada in vitro olarak peptit olmayan V1a reseptör antagonisti SR49059 ve V1a/V2 reseptör antagonisti YM087'nin mutant V2 reseptörlerinin hücre yüzeyi ifadesini ve fonksiyonunu kurtarıp kurtarmadıklarını incelemişlerdir [127]. Yaptıkları çalışmalarda amino asit dizisindeki değişimlerden kaynaklı missense mutasyonlar (L59P, L83Q, Y128S, R137H, W164S, A165D, S167L, A294P, P322H), delesyon (185\_193del) ve nonsense (W284X) mutasyona sahip mutant V2 reseptörü üzerinde SR49059 ve YM087 farmakolojik şaperonların etkilerini değerlendirmişlerdir. YM087 ile tedavide test edilen 10 yanlış anlamlı mutant V2 reseptörünün hücre yüzeyi ifadelerinin ve cAMP oluşumunun arttırdığı gözlenmiştir. Anlamsız mutantlar üzerinde ise YM087 herhangi bir etki yaratmamıştır [127].

## 5.2. VPA985

AVPR2 geninde 68. kodonda ve 273. kodonda meydana gelen mutasyon sonucu oluşan R68W ile T273M'nin en fazla fonksiyon kaybı gösteren, 162. kodondaki mutasyon sonucu oluşan V162A'nın ise hücrede en fazla ifade olan mutant proteinler olduğu TÜBİTAK SBAG 112S513 no'lu proje ve Dr. Beril Erdem Tunçdemir'in doktora tez çalışmaları kapsamında raporlanmıştır [148, 149]. Fonksiyon analizi yapılan R68W mutant reseptörünün hücre yüzeyindeki ifade seviyesi WT'a kıyasla %28,3'lük bir oranda bulunmuştur [148, 149]. Bu tez kapsamında VPA985 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası R68W mutant reseptörün hücre yüzeyindeki ifadesi %36,6 (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.5.) olarak gözlenmiştir. R68W mutant reseptöre uygulanan VPA985 farmakolojik şaperon uygulaması, mutant reseptörün hücre yüzeyindeki ifadesini az da olsa arttırmıştır. İstatistiksel olarak yapılan analiz neticesinde p değeri 0,0356 olarak bulunmuş (Çizelge 4.6.) ve anlamlı bir fark görülmüştür. En fazla fonksiyon kaybı görülen T273M mutant reseptörün fonksiyon analiz çalışmaları neticesinde ise hücre yüzey ifadesi %27,3'lük bir oranda gözlenmiştir [148, 149]. T273M mutant reseptör üzerinde VPA985 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası hücre yüzeyinde %55'lik (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.5.) bir oranda ifade göstermiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen ( $p = 0.1652$ , Çizelge 4.6.) hücre yüzeyi ifadesini arttırdığını gözlemekteyiz. WT'a en yakın karakteristik özellik gösteren V162A mutant reseptörün hücre yüzeyindeki ifadesi önceki yapılan çalışmalarda %93,6'lık bir oranda bulunmuştur [148, 149]. Bu tez kapsamında V162A mutant reseptör üzerinde uygulanan VPA985 farmakolojik şaperonu sonrası hücre yüzeyi ifadesinde %86,6'lık (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.5.) bir oran gözlenmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen ( $p = 0.7112$ , Çizelge 4.6.) çok az bir miktar hücre yüzeyi ifadesinde düşüş gözlenmektedir. Sadece V162A mutant proteini YM087'de olduğu gibi hücre yüzeyi ifadesinde azalma göstermiştir. Ancak flow sitometri sonuçlarına baktığımızda V162A yine WT'a yakın bir fonksiyonel özellik göstermektedir. Çalışmamız kapsamında V162A mutant proteinin fonksiyonel özelliklerinin WT'a yakın olmasını bekliyorduk. Mutant proteinler üzerinde uygulanan VPA985 farmakolojik şaperonu, YM087'ye göre R68W ve V162A üzerinde benzer etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz. Ancak VPA985 yüzey ELISA sonuçlarında gördüğümüz üzere T273M mutant proteinin hücre yüzeyine taşımada YM087'ye göre daha fazla etki etmiştir. Flow sitometri sonuçları ile bu etki desteklenmektedir.

TÜBİTAK SBAG 112S513 no'lu proje ve Dr. Beril Erdem Tunçdemir'in tez çalışmaları kapsamında proteinin kendi agonisti olan AVP ile uyarılan mutant R68W reseptörünün hücredeki total ifadesi %85,6 olarak gözlenmiştir [148, 149]. VPA985 farmakolojik şaperonu uygulanan mutant R68W reseptörünün hücredeki total ifadesi %62,8 (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.) olarak bulunmuştur. Bu mutant reseptör üzerinde uygulanan VPA985 farmakolojik şaperon sonrası hücredeki total ifadesinde az da olsa düşüş gözlemekteyiz. Bu etkinin uygulanan farmakolojik şaperonun hücrede az da olsa toksik etki yapmış olabileceğini düşünmekteyiz. WT'a yakın bir karakteristik özellik gösteren V162A mutant reseptörün hücredeki total ifadesi %88,4 olarak bulunmuştur [148, 149]. VPA985 farmakolojik şaperonu uygulaması sonrası bu mutant reseptör hücredeki total ifadesini arttırarak %102 (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.) gibi bir oran gözlenmiştir. Yine aynı şekilde T273M mutant reseptörünün önceki yapılan fonksiyon analiz çalışmalarında hücredeki total ifadesi %91,6 olarak gözlenmiştir [148, 149]. V162A mutant reseptöründe olduğu gibi VPA985 farmakolojik şaperon uygulaması sonrası mutant T273M reseptörünün hücredeki total ifadesinde çok az da olsa artış gözlenmiş ve %94,5'e (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.7.) yükselmiştir. VPA985 şaperonu uygulaması sonrası mutant reseptörlerin hücredeki total ifade verilerine ve flow sitometri sonuçlarına göre mutant reseptör işlevlerini kurtardığını söyleyebiliriz.

Jean-Pierre Morello ve arkadaşları birinci sitoplazmik döngüde 3 amino asit delesyonu taşıyan del 62-64 V2R'nün fonksiyonel özelliklerini incelemişlerdir [108]. WT'a aksine del 62-64 mutant reseptörün hücre içerisinde ifade edildiği ancak reseptörün hücre yüzeyinde ifadesinin olmadığı gözlenmiştir [108]. Yapılan çalışmadan del 62-64 mutant reseptörün ER içerisinde tutulduğu ve reseptör yüzeyinde AVP bağlanmasının olmaması neticesinde hücre içerisinde cAMP üretiminin gerçekleşmediği doğrulanmıştır. Bu mutant reseptör üzerinde SR121463A antagonisti ile fonksiyon çalışmaları yapılmıştır ve analizler sonucunda mutant reseptörün hücre yüzeyi ifadesinin desteklediği görülmüştür [108]. SR121463A antagonisti farklı 15 mutant reseptörü üzerinde yapılan fonksiyonel çalışmada L59P, L83Q, Y128S, S167L, A294P, P322H ve R337X mutantlarının hücre ifadelerinin arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar aynı mutantlar üzerinde peptit olmayan başka bir antagonist VPA985'in de etkilerini gözlemişlerdir. VPA985 antagonist şaperonun mutant hücrelere uygulanması



neticesinde aynı mutant reseptörlerin hücre yüzeyindeki ifadelerinin artırdığını gözlemişlerdir [108].

YM087 ve VPA985 farmakolojik şaperonların etkilerini daha iyi anlamak için bu tez çalışmasının finanse edildiği, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin Kapsamlı projesi (Kapsamlı FBA-2020-18843) dahilinde cAMP deneyleri de yapılacaktır. cAMP deneyleri neticesinde söz konusu şaperonların hücre içi ikincil habercileri ne şekilde etkilediği araştırılacaktır. Nihai sonuçlar cAMP deneyleri sonucunda elde edilerek yayına çevirilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] A. J. Venkatakrisnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, and M. Madan Babu, "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors," *Nature*, vol. 494, no. 7436, pp. 185–194, 2013.
- [2] L. K. Yang, Z. S. Hou, and Y. X. Tao, "Biased signaling in naturally occurring mutations of G protein-coupled receptors associated with diverse human diseases," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1867, no. 1, p. 165973, 2021.
- [3] N. Tuteja, "Signaling through G protein coupled receptors," *Plant Signal. Behav.*, vol. 4, no. 10, pp. 942–947, 2009.
- [4] A. Wise, K. Gearing, and S. Rees, "Target validation of G-protein coupled receptors," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 4, pp. 235–246, 2002.
- [5] A. J. Gentles and S. Karlin, "Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless?," *Trends Genet.*, vol. 15, no. 2, pp. 47–49, 1999.
- [6] Y. X. Tao, "Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: Structure-function insights and therapeutic implications," *Pharmacol. Ther.*, vol. 111, no. 3, pp. 949–973, 2006.
- [7] A. R. B. Thomsen, D. D. Jensen, G. A. Hicks, and N. W. Bunnett, "Therapeutic Targeting of Endosomal GPCRs," 2018.
- [8] O. Vögler, J. M. Barceló, C. Ribas, and P. V. Escribá, "Membrane interactions of G proteins and other related proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, no. 7–8, pp. 1640–1652, 2008.
- [9] C. D. Hanlon and D. J. Andrew, "Outside-in signaling - A brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family," *J. Cell Sci.*, vol. 128, no. 19, pp. 3533–3542, 2015.
- [10] T. Schöneberg and I. Liebscher, "Mutations in g protein-coupled receptors: Mechanisms, pathophysiology and potential therapeutic approaches," *Pharmacol. Rev.*, vol. 73, no. 1, pp. 89–119, 2021.
- [11] B. Küçükkaya and B. Kan, "Heteromerik G Proteinleri," *Türk Biyokim. Derg.*, vol. 32, no. 1, pp. 39–50, 2007.
- [12] D. M. Rosenbaum, S. G. F. Rasmussen, and B. K. Kobilka, "The structure and function of G-protein-coupled receptors," *Nature*, vol. 459, no. 7245, pp. 356–363, 2009.
- [13] J. Wang, C. Gareri, and H. A. Rockman, "G-protein-coupled receptors in heart disease," *Circ. Res.*, vol. 123, no. 6, pp. 716–735, 2018.
- [14] L. F. Allen, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, and S. Cotecchia, "G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: Constitutively activating mutation of the  $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 24, pp. 11354–11358, 1991.

- [15] P. M. Conn and J. A. Janovick, "Pharmacoperone Identification for Therapeutic Rescue of Misfolded Mutant Proteins," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 2, no. March, pp. 1–7, 2011.
- [16] H. W. Moon, H. G. Han, and Y. J. Jeon, "Protein quality control in the endoplasmic reticulum and cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, 2018.
- [17] T. Anelli and R. Sitia, "Protein quality control in the early secretory pathway," *EMBO J.*, vol. 27, no. 2, pp. 315–327, 2008.
- [18] C. S. Sevier and C. A. Kaiser, "Formation and transfer of disulphide bonds in living cells," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 836–847, 2002.
- [19] S. A. Oakes and F. R. Papa, "The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 10, no. October 2014, pp. 173–194, 2015.
- [20] Z. Sun and J. L. Brodsky, "Protein quality control in the secretory pathway," *J. Cell Biol.*, vol. 218, no. 10, pp. 3171–3187, 2019.
- [21] S. Seino, T. Shibasaki, and K. Minami, "Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 6, pp. 2118–2125, 2011.
- [22] P. Tarnow, T. Schöneberg, H. Krude, A. Grüters, and H. Biebermann, "Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 49, pp. 48666–48673, 2003.
- [23] I. Tabas and D. Ron, "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 184–190, 2011.
- [24] J. P. Morello *et al.*, "Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that cause nephrogenic diabetes insipidus," *Biochemistry*, vol. 40, no. 23, pp. 6766–6775, 2001.
- [25] M. Cattaneo *et al.*, "Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor of a patient with congenital bleeding," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 4, pp. 1978–1983, 2003.
- [26] K. Sangkuhl, A. Schulz, H. Römpler, J. Yun, J. Wess, and T. Schöneberg, "Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 13, no. 9, pp. 893–903, 2004.
- [27] A. M. Spiegel, "Mutations Receptors BASIS OF ENDOCRINE in G Proteins in Endocrine and G Protein-Coupled Disease," 1996.
- [28] F. U. Hartl, "Protein misfolding diseases," *Futur. Sci. OA*, vol. 1, no. 2, 2015.
- [29] J. Bohnkamp *et al.*, "Involvement of the chemokine-like receptor GPR33 in innate immunity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 396, no. 2, pp. 272–277, 2010.

- [30] C. Parnot, S. Miserey-Lenkei, S. Bardin, P. Corvol, and E. Clauser, “Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 13, no. 8, pp. 336–343, 2002.
- [31] Y. X. Tao, “Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: Insights into mechanisms of activation and therapeutics,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 120, no. 2, pp. 129–148, 2008.
- [32] L. Fischer, C. Wilde, T. Schöneberg, and I. Liebscher, “Functional relevance of naturally occurring mutations in adhesion G protein-coupled receptor ADGRD1 (GPR133),” *BMC Genomics*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, 2016.
- [33] P. Wonerow, T. Schöneberg, G. Schultz, T. Gudermann, and R. Paschke, “Deletions in the Third Intracellular Loop of the Thyrotropin Receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 14, pp. 7900–7905, 1998.
- [34] J. K. Tan, C. Mckenzie, E. Mari, L. Macia, and C. R. Mackay, “G Protein – Coupled Receptors — Facilitators of Diet-Related Immune Regulation,” 2006.
- [35] N. Weitzl and R. Seifert, “Distinct interactions of human  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors with isoproterenol, epinephrine, norepinephrine, and dopamine,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 327, no. 3, pp. 760–769, 2008.
- [36] R. Seifert and K. Wenzel-Seifert, “Constitutive activity of G-proteins-coupled receptors: Cause of disease and common property of wild-type receptors,” *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 366, no. 5, pp. 381–416, 2002.
- [37] S. Srinivasan *et al.*, “Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans,” *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 8, pp. 1158–1164, 2004.
- [38] J. Pantel *et al.*, “Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 3, pp. 760–768, 2006.
- [39] G. L. Robertson, “Diabetes insipidus,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 24, no. 3, pp. 549–572, 1995.
- [40] N. Di Iorgi *et al.*, “Diabetes insipidus - Diagnosis and management,” *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 77, no. 2, pp. 69–84, 2012.
- [41] C. Saifan *et al.*, “Diabetes Insipidus: A Challenging Diagnosis with New Drug Therapies,” *ISRN Nephrol.*, vol. 2013, no. Table 1, pp. 1–7, 2013.
- [42] M. Maghnie *et al.*, “Central Diabetes Insipidus In Children And Young Adults,” 2000.
- [43] M. Christ-Crain, B. Winzeler, and J. Refardt, “Diagnosis and management of diabetes insipidus for the internist,” *J. Intern. Med.*, vol. 290, no. 1, pp. 73–87, 2021.
- [44] H. Arima, Y. Azuma, Y. Morishita, and D. Hagiwara, “Central diabetes insipidus,” *Nagoya J. Med. Sci.*, vol. 78, no. 4, pp. 349–357, 2016.

- [45] A. Aulinas *et al.*, “Low Plasma Oxytocin Levels and Increased Psychopathology in Hypopituitary Men with Diabetes Insipidus,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 104, no. 8, pp. 3181–3191, 2019.
- [46] J. A. DURR, J. G. HOGGARD, J. M. HUNT, and R. W. SCHRIER, “DIABETES INSIPIDUS IN PREGNANCY ASSOCIATED WITH ABNORMALLY HIGH CIRCULATING VASOPRESSINASE ACTIVITY,” *Phys. Fit. as a Predict. Mortal. Men*, vol. 328(8), pp. 2010–2013, 1993.
- [47] S. Ananthakrishnan, “Diabetes insipidus in pregnancy: Etiology, evaluation, and management,” *Endocr. Pract.*, vol. 15, no. 4, pp. 377–382, 2009.
- [48] F. Iftene *et al.*, “Identification of primary polydipsia in a severe and persistent mental illness outpatient population: A prospective observational study,” *Psychiatry Res.*, vol. 210, no. 3, pp. 679–683, 2013.
- [49] M. Christ-Crain *et al.*, “Diabetes insipidus,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 5, no. 1, 2019.
- [50] M. Christ-Crain *et al.*, “Diabetes insipidus,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 5, no. 1, 2019.
- [51] G. Patti *et al.*, “Central diabetes insipidus in children: Diagnosis and management,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 34, no. 5, p. 101440, 2020.
- [52] P. Saborio, G. A. Tipton, and J. C. M. Chan, “Diabetes insipidus,” *ANNA J.*, vol. 23, no. 3, 1996.
- [53] D. A. Maccubbin and J. M. Van Buren, “A quantitative evaluation of hypothalamic degeneration and its relation to diabetes insipidus following interruption of the human hypophyseal stalk,” *Brain*, vol. 86, no. 3, pp. 443–464, 1963.
- [54] 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, 2011.
- [55] P. B. Loughrey and M. Korbonits, *Genetics of Pituitary Tumours*, vol. 111. 2019.
- [56] M. De Fost *et al.*, “Familial neurohypophyseal diabetes insipidus due to a novel mutation in the arginine vasopressin-neurophysin II gene,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 165, no. 1, pp. 161–165, 2011.
- [57] G. L. Robertson, “Antidiuretic hormone: Normal and disordered function,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 30, no. 3, pp. 671–694, 2001.
- [58] D. G. Bichet, “V2R Mutations and Nephrogenic Diabetes Insipidus,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 89, no. C, pp. 15–29, 2009.
- [59] R. Ivell, H. Schmale, and D. Richter, “Vasopressin and oxytocin precursors as model preprohormones,” *Neuroendocrinology*, vol. 37, no. 3, pp. 235–240, 1983.

- [60] D. C. Riddell, R. Mallonee, J. A. Phillips, J. S. Parks, L. A. Sexton, and J. L. Hamerton, "Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor," *Somat. Cell Mol. Genet.*, vol. 11, no. 2, pp. 189–195, 1985.
- [61] R. W. Berliner, N. G. Levinsky, D. G. Davidson, and M. EDEN, "Dilution and Concentration of the Urine and the Action of Antidiuretic Hormone," *Am. J. Med.*, p. 730, 2005.
- [62] D. G. Bichet, A. Oksche, and W. Rosenthal, "Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus," no. 7, **1997**.
- [63] S. Milano, M. Carosino, A. Gerbino, M. Svelto, and G. Procino, "Hereditary nephrogenic diabetes insipidus: Pathophysiology and possible treatment. An update," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 11, pp. 1–26, 2017.
- [64] M. A. Linshaw, "Congenital nephrogenic diabetes insipidus," *Pediatr. Rev.*, vol. 28, no. 10, pp. 372–380, 2007.
- [65] D. G. Bichet, "Chapter 2 V2R Mutations and Nephrogenic Diabetes Insipidus," *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 89, no. C, pp. 15–29, 2009.
- [66] Y. Noda, E. Sohara, E. Ohta, and S. Sasaki, "Aquaporins in kidney pathophysiology," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 6, no. 3, pp. 168–178, 2010.
- [67] S. Nielsen, J. Frøkiær, D. Marples, T. H. Kwon, P. Agre, and M. A. Knepper, "Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 1, pp. 205–244, 2002.
- [68] G. M. Preston, T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre, "Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CH IP28 Protein," no. April, pp. 2–4, 1992.
- [69] K. Ishibashi, S. Hara, and S. Kondo, "Aquaporin water channels in mammals," *Clin. Exp. Nephrol.*, vol. 13, no. 2, pp. 107–117, 2009.
- [70] C. G. Garofeanu, M. Weir, M. P. Rosas-Arellano, G. Henson, A. X. Garg, and W. F. Clark, "Causes of reversible nephrogenic diabetes insipidus: A systematic review," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 45, no. 4, pp. 626–637, 2005.
- [71] D. Marples, S. Christensen, E. I. Christensen, P. D. Ottosen, and S. Nielsen, "Lithium-induced downregulation of Aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla," *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 4, pp. 1838–1845, 1995.
- [72] J. J. Bedford *et al.*, "Amiloride restores renal medullary osmolytes in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus," *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 294, no. 4, pp. 812–821, 2008.
- [73] B. M. Christensen *et al.*, "αENaC-mediated lithium absorption promotes nephrogenic diabetes insipidus," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, no. 2, pp. 253–261, 2011.
- [74] R. Rao, "Glycogen synthase kinase-3 regulation of urinary concentrating ability," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 21, no. 5, pp. 541–546, 2012.

- [75] R. Rao *et al.*, “Lithium treatment inhibits renal GSK-3 activity and promotes cyclooxygenase 2-dependent polyuria,” *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 288, no. 4 57-4, 2005.
- [76] K. Cryns *et al.*, “Lack of lithium-like behavioral and molecular effects in IMPA2 knockout mice,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 4, pp. 881–891, 2007.
- [77] S. Khositseth *et al.*, “Hypercalcemia induces targeted autophagic degradation of aquaporin-2 at the onset of nephrogenic diabetes insipidus,” *Kidney Int.*, vol. 91, no. 5, pp. 1070–1087, 2017.
- [78] J. M. Sands and D. G. Bichet, “Nephrogenic Diabetes Insipidus,” pp. 186–194, 2017.
- [79] D. G. Bichet, “Nephrogenic diabetes insipidus,” *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 96–104, 2006.
- [80] H. B. Moeller, S. Rittig, and R. A. Fenton, “Nephrogenic diabetes insipidus: Essential insights into the molecular background and potential therapies for treatment,” *Endocr. Rev.*, vol. 34, no. 2, pp. 278–301, 2013.
- [81] C. D’Alessandri-Silva *et al.*, “Diagnosis, Treatment, and Outcomes in Children With Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus: A Pediatric Nephrology Research Consortium Study,” *Front. Pediatr.*, vol. 7, no. January, pp. 1–7, 2020.
- [82] C. Gao, P. J. Higgins, and W. Zhang, “AQP2: Mutations Associated with Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus and Regulation by Post-Translational Modifications and Protein-Protein Interactions,” *Cells*, vol. 9, no. 10, pp. 1–18, 2020.
- [83] 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.
- [84] F. E. Mohamed, L. Al-Gazali, F. Al-Jasmi, and B. R. Ali, “Pharmaceutical chaperones and proteostasis regulators in the therapy of lysosomal storage disorders: Current perspective and future promises,” *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. JUL, pp. 1–17, 2017.
- [85] J. Morello and D. G. Bichet, “Nephrogenic Diabetes Insipidus,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 607–630, 2001.
- [86] N. V. A. M. Knoers and P. M. T. Deen, “Molecular and cellular defects in nephrogenic diabetes insipidus,” *Pediatr. Nephrol.*, vol. 16, no. 12, pp. 1146–1152, 2001.
- [87] P. M. T. Deen, N. Marr, E. J. Kamsteeg, and B. W. M. Van Balkom, “Nephrogenic diabetes insipidus,” *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 9, no. 6, pp. 591–595, 2000.
- [88] E. Sohara *et al.*, “Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 maturation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 38, pp. 14217–14222, 2006.

- [89] E. J. Kamsteeg *et al.*, “Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus,” *J. Cell Biol.*, vol. 163, no. 5, pp. 1099–1109, 2003.
- [90] P. Agre, “Aquaporin water channels (nobel lecture),” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 43, no. 33, pp. 4278–4290, 2004.
- [91] T. H. Kwon, H. Hager, L. N. Nejsum, M. L. E. Andersen, J. Frøkiær, and S. Nielsen, “Physiology and pathophysiology of renal aquaporins,” *Semin. Nephrol.*, vol. 21, no. 3, pp. 231–238, 2001.
- [92] L. Bai, K. Fushimi, S. Sasaki, and F. Marumo, “Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 9, pp. 5171–5176, 1996.
- [93] A. Iolascon *et al.*, “Characterization of two novel missense mutations in the AQP2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus,” *Nephron - Physiol.*, vol. 105, no. 3, pp. 33–42, 2007.
- [94] D. J. Lloyd, F. W. Hall, L. M. Tarantino, and N. Gekakis, “Diabetes insipidus in mice with a mutation in aquaporin-2,” *PLoS Genet.*, vol. 1, no. 2, pp. 0171–0178, 2005.
- [95] P. M. T. Deen, H. Croes, R. A. M. H. Van Aubel, L. A. Ginsel, and C. H. Van Os, “Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing,” *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 5, pp. 2291–2296, 1995.
- [96] S. M. Mulders *et al.*, “New Mutations in the AQP2 Gene in Nephrogenic Diabetes Insipidus Resulting in Functional but Misrouted Water Channels,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 8, no. 2, pp. 242–248, 1997.
- [97] K. Goji, M. Kuwahara, Y. Gu, M. Matsuo, F. Marumo, and S. Sasaki, “Novel mutations in aquaporin-2 gene in female siblings with nephrogenic diabetes insipidus: Evidence of disrupted water channel function,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 83, no. 9, pp. 3205–3209, 1998.
- [98] S. M. Mulders *et al.*, “An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the golgi complex,” *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 1, pp. 57–66, 1998.
- [99] A. Seibold, P. Brabet, W. Rosenthal, and M. Birnbaumer, “Structure and Chromosomal Localization of the Human Antidiuretic Hormone Receptor Gene,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 215, no. 3, pp. 1029–1036, 1995.
- [100] D. G. Bichet, “Vasopressin receptors in health and disease,” *Kidney Int.*, vol. 49, no. 6, pp. 1706–1711, 1996.
- [101] R. Schülein, C. Rutz, and W. Rosenthal, “Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 46, pp. 28844–28852, 1996.
- [102] J. Robert, E. Clauser, P. X. Petit, and M. A. Ventura, “A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 3, pp. 2300–2308, 2005.



- [103] D. Bockenhauer and D. G. Bichet, "Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 11, no. 10, pp. 576–588, 2015.
- [104] H. Rehmann, A. Wittinghofer, and J. L. Bos, "Capturing cyclic nucleotides in action: Snapshots from crystallographic studies," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 63–73, 2007.
- [105] L. S. Erdélyi *et al.*, "Mutation in the V2 vasopressin receptor gene, AVPR2, causes nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis," *Kidney Int.*, vol. 88, no. 5, pp. 1070–1078, 2015.
- [106] P. Peter M. T. Deen and N. V. A. M. Knoers, "Vasopressin Type-2 Receptor and Aquaporin-2 Water Channel Mutants in Nephrogenic Diabetes Insipidus," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 316, no. 5, pp. 300–309, 1998.
- [107] E. Albertazzi *et al.*, "Nephrogenic diabetes insipidus: Functional analysis of new AVPR2 mutations identified in Italian families," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 11, no. 6, pp. 1033–1043, 2000.
- [108] J. P. Morello *et al.*, "Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 7, pp. 887–895, 2000.
- [109] E. Spanakis, E. Milord, and C. Gragnoli, "AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: Review and missense mutation significance," *J. Cell. Physiol.*, vol. 217, no. 3, pp. 605–617, 2008.
- [110] A. Schmitz, M. Maintz, T. Kehle, and V. Herzog, "In vivo iodination of a misfolded proinsulin reveals co-localized signals for Bip binding and for degradation in the ER," *EMBO J.*, vol. 14, no. 6, pp. 1091–1098, 1995.
- [111] B. J. Feldman *et al.*, "Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis," *Pan Afr. Med. J.*, vol. 32, pp. 1884–1890, 2019.
- [112] L. S. Barak, R. H. Oakley, S. A. Laporte, and M. G. Caron, "Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 1, pp. 93–98, 2001.
- [113] T. Schöneberg *et al.*, "V2 vasopressin receptor dysfunction in nephrogenic diabetes insipidus caused by different molecular mechanisms," *Hum. Mutat.*, vol. 12, no. 3, pp. 196–205, 1998.
- [114] K. Pasel *et al.*, "Functional characterization of the molecular defects causing nephrogenic diabetes insipidus in eight families," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 4, pp. 1703–1710, 2000.
- [115] L. Cortez and V. Sim, "The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases," *Prion*, vol. 8, no. 2, pp. 197–202, 2014.
- [116] R. Sitia and I. Braakman, "Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory," *Nature*, vol. 426, no. 6968, pp. 891–894, 2003.

- [117] D. M. Pereira, P. Valentão, and P. B. Andrade, “Tuning protein folding in lysosomal storage diseases: The chemistry behind pharmacological chaperones,” *Chem. Sci.*, vol. 9, no. 7, pp. 1740–1752, 2018.
- [118] S. Sato, C. L. Ward, M. E. Krouse, J. J. Wine, and R. R. Kopito, “Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation,” *Pneumologie*, vol. 50, no. 8, p. 571, 1996.
- [119] Y. Gu and N. Singh, “Doxycycline and protein folding agents rescue the abnormal phenotype of familial CJD H187R in a cell model,” *Mol. Brain Res.*, vol. 123, no. 1–2, pp. 37–44, 2004.
- [120] E. Papp and P. Csermely, “Chemical chaperones: Mechanisms of action and potential use,” *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 172, pp. 405–416, 2006.
- [121] D. H. PERLMUTTER, “Chemical Chaperones: A Pharmacological Strategy for Disorders of Protein Folding and Trafficking,” *Pediatr. Res.*, vol. 52, no. 6, pp. 832–836, 2002.
- [122] A. U. Nissar *et al.*, “Chemical chaperone 4-phenyl butyric acid (4-PBA) reduces hepatocellular lipid accumulation and lipotoxicity through induction of autophagy,” *J. Lipid Res.*, vol. 58, no. 9, pp. 1855–1868, 2017.
- [123] C. Soto, “Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 4, no. 1, pp. 49–60, 2003.
- [124] Y. J. Wang, X. J. Di, and T. W. Mu, “Using pharmacological chaperones to restore proteostasis,” *Pharmacol. Res.*, vol. 83, pp. 3–9, 2014.
- [125] Y. X. Tao and P. M. Conn, “Chaperoning G protein-coupled receptors: From cell biology to therapeutics,” *Endocr. Rev.*, vol. 35, no. 4, pp. 602–647, 2014.
- [126] D. C. Smithson, J. A. Janovick, and P. M. Conn, *Therapeutic rescue of misfolded/mistrafficked mutants: Automation-friendly high-throughput assays for identification of pharmacoperone drugs of gpcrs*, 1st ed., vol. 521. Elsevier Inc., 2013.
- [127] V. Bernier *et al.*, “Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 1, pp. 232–243, 2006.
- [128] T. Arakawa, D. Ejima, Y. Kita, and K. Tsumoto, “Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1764, no. 11, pp. 1677–1687, 2006.
- [129] D. BR, “PHARMACOPERONES- From Genes to Pharmacological Agents,” vol. 3, no. 1, pp. 7–9, 2015.
- [130] V. Bernier, D. G. Bichet, and M. Bouvier, “Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 4, no. 5, pp. 528–533, 2004.
- [131] D. Ringe and G. A. Petsko, “What are pharmacological chaperones and why are

- they interesting?," *J. Biol.*, vol. 8, no. 9, 2009.
- [132] U. E. Petäjä-Repo, M. Hogue, S. Bhalla, A. Laperrière, J. P. Morello, and M. Bouvier, "Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of  $\delta$  opioid receptor maturation," *EMBO J.*, vol. 21, no. 7, pp. 1628–1637, 2002.
- [133] H. B. Schiöth and M. C. Lagerström, "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 4, pp. 339–357, 2008.
- [134] K. Takahashi *et al.*, "V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 3, pp. 2099–2106, 2012.
- [135] A. Gilchrist, *GPCR Molecular Pharmacology and Drug Targeting: Shifting Paradigms and New Directions*. 2010.
- [136] P. G. Strange, "Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G protein-coupled receptors," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. 7, pp. 1353–1363, 2008.
- [137] P.-Y. Jean-Charles, S. Kaur, and S. K. Shenoy, "G Protein-Coupled Receptor Signaling Through  $\beta$ -Arrestin-Dependent Mechanisms," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 54, no. 3, pp. 188–195, 2009.
- [138] E. A. Şener and İ. Yalçın, *Kantitatif Yapi-Etki İlişkileri Analizleri (Qsar)*. 2002.
- [139] B. Y. G. S. Barsoum, "THE PHARMACOLOGICAL ESTIMATION OF ADENOSINE AND HISTAMINE IN BLOOD.," 1935.
- [140] C. K. Herenbrink *et al.*, "The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs," *Nat. Commun.*, vol. 7, pp. 1–14, 2016.
- [141] V. Bernier, M. Lagacé, M. Lonergan, M. F. Arthus, D. G. Bichet, and M. Bouvier, "Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059," *Mol. Endocrinol.*, vol. 18, no. 8, pp. 2074–2084, 2004.
- [142] S. Wüller *et al.*, "Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 45, pp. 47254–47263, 2004.
- [143] A. C. Theos *et al.*, "Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. November, pp. 5356–5372, 2005.
- [144] G. L. Robertson, "Vaptans for the treatment of hyponatremia," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 7, no. 3, pp. 151–161, 2011.
- [145] T. Titko, L. Perekhoda, I. Drapak, and Y. Tsapko, "Modern trends in diuretics development," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 208, p. 112855, 2020.
- [146] S. Aditya and A. Rattan, "Vaptans: A new option in the management of

- hyponatremia,” *Int. J. Appl. Basic Med. Res.*, vol. 2, no. 2, p. 77, 2012.
- [147] I. Hermecz *et al.*, “Chemical development of the vasopressin receptor 2 antagonist SR-121463,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 73, no. 9, pp. 1401–1409, 2001.
- [148] B. Erdem, A. Schulz, E. Saglar, F. Deniz, T. Schöneberg, and H. Mergen, “Functional characterization of AVPR2 mutants found in Turkish patients with nephrogenic diabetes insipidus,” *Endocr. Connect.*, vol. 7, no. 1, pp. 56–64, 2018.
- [149] Erdem, B., Diabetes İnsipidus’lu Hastaların AVPR2 Geninde Tanımlanan Yeni Mutasyonların Fonksiyon Analizleri, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016.
- [150] R. Bott, *Flow cytometry principle and protocols*, no. 1. 2014.
- [151] N. Makita *et al.*, “Analysis of the V2 vasopressin receptor (V2R) mutations causing partial nephrogenic diabetes insipidus highlights a sustainable signaling by a non-peptide V2R agonist,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 43, pp. 22460–22471, 2016.