



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



**KONSTITÜTİF AKTİF VAZOPRESSİN 2 RESEPTÖR
MUTANTLARININ,
HÜCRE İÇİ VE HÜCRE MEMBRANINDAKİ
HAREKETLERİNİN
 β -ARRESTİN1 VE β -ARRESTİN2 EKSPRESYONU İLE
DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

Gökçe SÜRAL

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan Ogun ONARAN**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KONSTITÜTİF AKTİF VAZOPRESSİN 2 RESEPTÖR
MUTANTLARININ,
HÜCRE İÇİ VE HÜCRE MEMBRANINDAKİ
HAREKETLERİNİN
β-ARRESTİN1 VE β-ARRESTİN2 EKSPRESYONU İLE
DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

Gökçe SÜRAL

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hasan Ogun ONARAN

“Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 22L0230001 numaralı
proje ile desteklenmiştir”

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Konstitütif aktif vazopressin-2 reseptör mutantlarının, hücre içi ve hücre membranındaki hareketlerinin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ekspresyonu ile değişiminin incelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 07/09/2022 tarihinde, 2022-15-138 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gökçe SÜRAL

Tarih:

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

KONSTITÜTİF AKTİF VAZOPRESSİN 2 RESEPTÖR MUTANTLARININ, HÜCRE İÇİ VE HÜCRE MEMBRANINDAKİ HAREKETLERİNİN β -ARRESTİN1 VE β -ARRESTİN2 EKSPRESYONU İLE DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**3**

2

biotek.ankara.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**2**

3

Submitted to Ankara University

Öğrenci Ödevi

%**2**

4

www.nature.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

www.science.gov

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Vanessa Vezzi, Caterina Ambrosio, Maria Cristina Grò, Paola Molinari et al.

"Vasopressin receptor 2 mutations in the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis show different mechanisms of constitutive activation for G protein coupled receptors", Scientific Reports, 2020

Yayın

<%**1**

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Gökçe Süral	Sınav tarihi: 28 / 12 / 2022
Anabilim/Bilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji	
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan Ongun ONARAN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Konstitütif aktif vazopressin-2 reseptör mutantlarının, hücre içi ve hücre membranındaki hareketlerinin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ekspresyonu ile değişiminin incelenmesi	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.	

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Hakan GÜRDAL
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Hasan Ongun ONARAN
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi (TEZ DANIŞMANI)

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Özlem UĞUR
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

ÖNSÖZ

Çalışmalarımın planlanması, sürdürülmesi ve değerlendirilmesinde bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren ve bana destek olan, düşünme algoritmamı yeniden programlayan sevgili hocam Prof. Dr. Ogun Onaran'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler biyoloji tekniklerini öğrenmemde teorik ve pratik açılardan yardımcı olan Prof. Dr. Özlem Uğur'a ve konfokal mikroskopi için laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Mehmet Uğur'a teşekkürü bir borç bilirim. Karşılaştığım engellerde önerilerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta Prof. Dr. Hakan Ergün ve Prof. Dr. Eyüp Sabri Akarsu olmak üzere, bilgi ve birikimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli Ankara Tıp Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Hakan Gürdal, Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz, Prof. Dr. Mehmet Melli ve Prof. Dr. Kemal Sayar'a ve öğretim görevlisi Dr. Suzan Usanmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Motivasyonumu yüksek tutan, deneyimleri ve bilgi birikimlerini her zaman benimle paylaşan her ihtiyacım olduğunda güler yüz ile dinleyen ve yardım eden Soner Mamuk, Hilal Altan ve Mustafa Kaynar'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma disiplinine imrendiğim, bilgilerini ve deneyimlerini her zaman paylaşan sevgili Tuğçe Nomenoğlu'na, 4 yıl boyunca beraber çalışma şansını yakaladığım için kendimi şanslı saydığım, takıldığım yerlerde destek olan eş kıdemlim Sefa Metin'e, sabrı ve profesyonelliği ile bana örnek olan Serkan Kemer'e, güler yüzü ve yılmaz enerjisi ile beni motive eden sevgili Saliha Kasapoğlu'na, işe sevecek gelmemi sağlayan asistan arkadaşlarım Aygül Durdurur, Beyza Cengiz ve Mert Yüksel'e çok teşekkür ederim. Sizler ile çalışmak benim için zevkti.

Bana kendi ayaklarım üstünde durmayı öğretene, özgür büyümemi sağlayan ve kendi kararlarımı almamı destekleyen tanıdığım ilk feminist biricik annem Hamiyet Ecemiş'e sonsuz teşekkürler. Son olarak, bu tez çalışmasını, kariyerim boyunca aldığım her karara saygı duyan ve beni her zaman destekleyen, takıldığım konularda çözüm üreterek sorunları aşmamı sağlayan, benimle gece gündüz çalışan, en büyük yardımcım, sevgili eşim Altuğ Süral'a ithaf ediyorum.

Gökçe SÜRAL

Ankara, 2022

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	iii
Kabul ve Onay Sayfası	iv
Önsöz	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller Dizini	x
1. TÜRKÇE ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	8
5. GEREÇ ve YÖNTEM	17
5.1 Gereç	17
5.1.1 Hücre kültürü	17
5.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler	17
5.2 Yöntem	17
5.2.1 Konfokal mikroskopi	17
5.2.2 FRAP deneyleri	18
5.2.3 Kolokalizasyon hesabı	19
5.2.4 ER-Golgi-lizozom lokalizasyon hesapları	20
5.2.5 ER-Golgi-lizozom markerları	20
6. BULGULAR	21
6.1 WT V2R'nin agonist uyarısı sonrası V2R'nin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile birlikteliğinin incelenmesi	21
6.2 WT ve Mutant V2R'lerin β -arrestin 1 ve β -arrestin 2 ile birlikteliğinin incelenmesi	23
6.3 Mutant V2R'lerin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile birlikteliğinin	24

inverse agonist varlığında incelenmesi	
6.4 Mutant V2R'lerin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi	28
6.4.1 Mutant V2R'lerde ER lokalizasyonunun WT ile karşılaştırılması	29
6.4.2 Mutant V2R'lerde Golgi lokalizasyonunun WT ile karşılaştırılması	32
6.4.3 Mutant V2R'lerde lizozom lokalizasyonunun WT ile karşılaştırılması	32
6.5 WT ve mutant V2R'lerinin hücre zarındaki difüzyon özellikleri	35
6.6 V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisi	35
6.6.1 Gs yokluğunda V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisi	38
6.6.2 β -arrestin yokluğunda V2Rq2 mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisi	39
7. TARTIŞMA	41
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
9. KAYNAKLAR	49
10. EKLER	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	: Antidiüretik Hormon
AP2	: Adaptör protein 2
AQP2	: Aquaporin 2
ARF6	: ADP-ribosylation factor 6
Asn	: Asparajin amino asidi
AT1AR	: Anjiotensin II reseptör tip 1
AVP	: Arjinin Vazopressin
BRET	: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
cAMP	: Adenozin 3'-5' siklik monofosfat
cDNA	: Complementary DNA
COPII	: Coat Protein Complex II
Cys	: Sistein amino asidi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER-associated degradation
ERLAD	: ER-to-lysosome-associated degradation
FDA	: Food and Drug Administration
FRAP	: Flourescent Recovery After Photobleaching
FSK	: Forskolin
FSS	: Fötal sığır serumu
GDP	: Guanozin 5' difosfat
rGFP	: Green fluorescent protein
GIRK	: G proteine-bağımlı içeri doğrultucu potasyum kanalları
GPKR	: G proteinine kenetli reseptör

GRK	: G proteinine kenetli reseptör kinaz
GTP	: Guanozin 5' trifosfat
He-Ne	: Helyum–Neon
His	: Histidin amino asidi
KO	: Knock-out
KRH	: Krebs-Ringer-HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
Leu	: Lösin amino asidi
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MEF	: Mouse Embriyojenik Fibroblast
ms	: mili saniye
NDI	: Nefrojenik diabetes insipidus
NSF	: N-etilmaleimide duyarlı füzyon proteini
NSIAD	: Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis
PI4P	: Phosphatidylinositol 4-phosphate
Ser	: Serin amino asidi
SRP	: Signal recognition particle
TGN	: Trans Golgi Network
Thr	: Treonin amino asidi
UV	: Ultraviyole
V2R	: Vazopressin-2 reseptörü
WT	: Wild Type
β2AR	: β2-adrenerjik reseptör
M	: Molar konsantrasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Basit üçlü kompleks modeli	9
Şekil 2.2.	Protein sentezi, taşınması ve yanlış katlanmış protein yanıtı	11
Şekil 2.3.	β -arrestin aracılı reseptör internalizasyonu ve hücre içi reseptör trafiği	13
Şekil 5.1.	FRAP deneyleri	19
Şekil 6.1	1 μ M vazopressin uyarısı sonrası WT V2R ve β -arrestin dağılımının zamana bağlı değişimi	22
Şekil 6.2	1 μ M AVP uyarısı sonrası floresans dağılımının zamana bağlı değişimi	23
Şekil 6.3	MEF hücrelerinde V2R ve β -arrestinlerin hücresel dağılımı	24
Şekil 6.4	β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R-dendra'nın hücresel dağılımı	25
Şekil 6.5	WT/mutant V2R'lerin β -arrestin1/ β -arrestin2 kolokalizasyonu	26
Şekil 6.6	V2R-dendra ve β -arrestin1/2'nin 24 saat 50 nM tolvaptan sonrası hücresel dağılımı	27
Şekil 6.7	Tolvaptan uygulaması sonrası mutant V2R- β -arrestin1/2 Kolokalizasyonu	28
Şekil 6.8	Tolvaptanın reseptör- β -arrestin1/2 etkileşimi üzerindeki etkisi	29
Şekil 6.9	MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin ER lokalizasyon görüntüleri	30
Şekil 6.10	β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin, ER lokalizasyon görüntüleri	31
Şekil 6.11	WT ve mutant V2R'lerin ER lokalizasyonu	31
Şekil 6.12	MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin Golgi lokalizasyon görüntüleri	33

Şekil 6.13	β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin, Golgi lokalizasyon görüntüleri	34
Şekil 6.14	WT ve mutant V2R'lerin Golgi lokalizasyonu	34
Şekil 6.15	MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin lizozom lokalizasyon görüntüleri	36
Şekil 6.16	β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin, lizozom lokalizasyon görüntüleri	37
Şekil 6.17	WT ve mutant V2R'lerin lizozom lokalizasyonu	37
Şekil 6.18	WT ve mutant V2R difüzyon katsayıları	38
Şekil 6.19	2B2 hücrelerinde entegre cAMP yanıtı	39
Şekil 6.20	Gs KO 2B2 hücrelerinde entegre cAMP yanıtı	40
Şekil 6.21	β -arrestin KO MEF hücrelerinde bazal ve AVP ile indüklenen ve cAMP sinyali	40

1. TÜRKÇE ÖZET

KONSTITÜTİF AKTİF VAZOPRESSİN 2 RESEPTÖR MUTANTLARININ, HÜCRE İÇİ VE HÜCRE MEMBRANINDAKİ HAREKETLERİNİN β -ARRESTİN1 VE β -ARRESTİN2 EKSPRESYONU İLE DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ

Vazopressin-2 reseptöründe (V2R) görülen nokta mutasyonları nefrojenik diabetes insipidus (NDI) ve nefrojenik uygunsuz antidiürezis sendromu (NSIAD) adı verilen iki ayrı klinik tabloya sebep olmaktadır. Reseptörde fonksiyon kaybına sebep olan mutasyonlar, klinik olarak arjinin-vazopressin (AVP)'e duyarsızlık ve hipernatremi ile seyreden NDI'ye sebep olurken, reseptörün spontan aktivite kazanmasına sebep olan mutasyonlar klinik olarak oligüri, hiponatremi ile seyreden NSIAD'ye sebep olmaktadır. NSIAD'ye neden olan V2R mutasyonları, yapısal olarak aktif iki farklı fenotip oluşturmaktadır. Birinci tip, V2R-137 (R137L, R137C gibi) bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklanan, agonistlere zayıf yanıt veren ve invers agonistlere dirençli mutasyonlardır. İkinci tip ise reseptör molekülünün çeşitli yerlerinde oluşan (F229V, I130N L312S gibi), agonistlere yanıt verebilen ve invers agonistlere duyarlı, konstitütif aktivite gösteren mutasyonlardır. Çalışmamız kapsamında incelediğimiz R137L R137H ve F229V V2R mutasyonlarından R137H, NDI'ya sebep olurken F229V ve R137L NSIAD'ye sebep olmaktadır. Reseptörün aynı bölgesinde görülen mutasyonların birbirine zıt klinik tablolar oluşturmaları ve konstitütif aktif mutantlardan sadece bazılarının invers agonistlere yanıt vermesi, söz konusu mutasyonların reseptörün moleküler işleyişi üzerindeki etkilerinin yeterli düzeyde anlaşılmadığını göstermektedir. Bu nedenle, bu mutantların transdüserler, yani Gs ve β -arrestinler ile olan etkileşmelerinin ve hücresel trafiklerinin iyi karakterize edilmesine gereksinim vardır. Bu karakterizasyon, tedavi stratejileri geliştirmek bakımından önemlidir.

Çalışmamızın amaçları şu şekilde sıralanabilir: 1) V2R mutasyonlarının, β -arrestin etkileşimlerinde β -arrestin1/2 seçiciliği gösterip göstermediğini incelemek, 2) Reseptörde görülen mutasyonların reseptörün hücresel trafiği üzerindeki etkisini belirlemek, 3) Mutasyonların reseptörün hücre zarındaki lateral mobilitesine olan etkisini incelemek ve 4) NSIAD'ye sebep olan mutant reseptörlerde görülen konstitütif cAMP sinyaline Gs proteini ve β -arrestin1/2'nin katkısını incelemek.

Bu amaçlar doğrultusunda β -arrestinleri kalıcı olarak silinmiş MEF hücrelerine β -arrestin1 veya β -arrestin2 ayrı ayrı eksprese ettirilmiştir ve aynı hücrelere WT V2R veya R137L, R137H, F229V mutant V2R'ler eksprese ettirilerek mutant reseptörlerin β -arrestin etkileşimlerinde β -

arrestin1/2 seçiciliği gösterip göstermediği incelenmiştir. Konfokal mikroskop görüntülerinden reseptör β -arrestin1/2 lokalizasyonlarının birlikteliği hesaplanmıştır. Bu incelemelerde özellikle R137 mutant reseptörlerin β -arrestin2 birlikteliklerinin arttığı, spontan etkileşimlerinde β -arrestin2 seçiciliği gösterdikleri ve β -arrestin2 varlığında hücre içinde büyük veziküler yapılara sekestre oldukları gözlenmiştir. Hücre içi organellerden Golgi, ER ve lizozom selektif markerlar ile işaretlenmiş ve reseptörlerin bu organeller ile olan lokalizasyonları hesaplanmıştır. Bütün mutant reseptörlerin β -arrestin KO (knock-out) hücre serilerinde ER lokalizasyonlarının WT'ye kıyasla arttığı ve β -arrestin ekspresyonunun bu lokalizasyon artışı üzerine bir etkisi olmadığı izlenmiştir. Reseptörlerin Golgi lokalizasyonları incelendiğinde, R137 mutantlarında β -arrestin ekspresyonu ile Golgi lokalizasyonlarının WT'ye kıyasla arttığı gözlenmektedir. Lizozom lokalizasyonları incelendiğinde ise R137 mutantlarında daha bariz olmakla birlikte β -arrestin2 ekspresyonunun bütün mutantlarda, WT'ye kıyasla büyük bir lokalizasyon artışına sebep olduğu gözlenmiştir. Bu artışın reseptörlerin β -arrestin2 aracılı internalizasyonu sonrası, β -arrestin2'nin R137 mutantlarını lizozoma taşınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gs ve β -arrestin1/2'nin hücre içi cAMP yanıtı üzerine etkisinin araştırıldığı deneylerde cAMP probu Glosensor F22'yi stabil bir şekilde eksprese eden Gs KO 2B2 ve β -arrestin1/2 KO MEF hücreleri kullanılmıştır. Gs yokluğunda bütün reseptörlerde bazal cAMP sinyali birbirlerine benzer olarak gözlenmiş ve AVP, mutant ve WT V2R'lerde gözlenen bazal cAMP sinyalini değiştirmemiştir. NSIAD'ye sebep olan mutant V2R'leri eksprese eden hücrelerde arttığı bilinen bazal cAMP yanıtı β -arrestin1/2 KO MEF hücre serilerinde gözlenmeye devam etmiş olup, bu yanıtın reseptör trafiğinde izlenen farklılıkların sonucu değil, mutant reseptörün moleküler özelliklerinden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Nefrojenik Uygunsuz ADH sendromu (NSIAD), β -arrestin1/2, V2R, GPCR, Konstitütif aktif reseptör, R137L V2R

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF CELLULAR TRAFFICKING CONSTITUTIVELY ACTIVE VASOPRESSIN 2 RECEPTOR MUTANTS IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF β -ARRESTIN 1 OR β -ARRESTIN 2 EXPRESSION

Point mutations in the vasopressin 2 receptor (V2R) may result in two different clinical conditions called NDI and NSIAD. Loss-of-function V2R mutations cause nephrogenic diabetes insipidus (NDI), which is characterized by hypernatremia and insensitivity to AVP, while gain-of-function mutations cause nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD), which leads to oliguria and hyponatremia. NSIAD causing V2R mutations can generate two different constitutively active phenotypes. The first type result from mutations in the V2R-137 (such as R137L, R137C) region, which respond poorly to agonists and are resistant to inverse agonists. The second type results from residue substitutions in several V2R domains (such as F229V, I130N L312S), which can respond to agonists, sensitive to inverse agonists and show constitutive activity. Among the R137L, R137H and F229V V2R mutations that we examined within the scope of our study, R137H causes NDI, while F229V and R137L cause NSIAD. The fact that mutations in the same region of the receptor produce opposite clinical pictures and that only some of the constitutively active mutants respond to inverse agonists indicate that the effect of these mutations on the receptor functions is not fully understood. Therefore, the interaction of these mutants with transducers, namely Gs and β -arrestins, and their cellular trafficking need to be well characterized. This characterization is important for developing treatment strategies.

The aims of the present study can be listed as follows: 1) To examine whether V2R mutations show β -arrestin1/2 selectivity in β -arrestin interactions, 2) To determine the effect of mutations in receptor's cellular trafficking, 3) To examine the effect of mutations on the lateral mobility of the receptor in the cell membrane, and 4) To examine the contribution of Gs protein and β -arrestin1/2 to the constitutive cAMP signal seen in mutant receptors causing NSIAD.

For this purpose, β -arrestin1 or β -arrestin2 was expressed separately in MEF cells whose β -arrestins were permanently deleted. Then, each one of the V2R variants, i.e., WT V2R, R137L, R137H or F229V was expressed either in β -arrestin1 or β -arrestin2 expressing cells. These configurations gave us the opportunity to test β -arrestin1/2 selectivity of these receptor variants. The correlation between cellular localizations of receptor and β -arrestin 1/2 was calculated from confocal microscopic images, as an indicator of co-localization of these proteins. We observed that spontaneous co-localization of R137 mutants with β -arrestins was selectively high for β -

arrestin2 compared to WT. The latter assemblies were sequestered into large intracellular vesicles. The intracellular organelles, Golgi, ER and lysosome were labeled with selective markers and the localization of the receptors in these organelles was calculated. ER localizations of all mutant receptors were found to be increased in β -arrestin KO cell lines compared to WT. β -Arrestin expression did not change this localization pattern. However, Golgi localizations of the R137 mutants were found to be increased with β -arrestin expression compared to WT. Likewise, lysosome localizations of all the receptor mutants were observed to be increased (more pronounced for R137 mutants) with β -arrestin2 expression. The latter effect suggests that β -arrestin2 drives the R137 mutants to lysosome after β -arrestin2-mediated receptor internalization.

Contribution of Gs and β -arrestin1/2 to the receptor-mediated cAMP production was investigated in Gs KO 2B2 and β -arrestin1/2 KO MEF cells stably expressing the cAMP probe Glosensor F22 and a receptor variant. In the absence of Gs, basal cAMP accumulation was the same for all receptor variants, and AVP did not produce any response. In the presence of Gs, expression of those mutants that are known to cause NSIAD increased basal cAMP accumulation even in the absence of β -arrestin1/2 expression. The latter observation suggests that basal cAMP response is due to the molecular properties of the mutant receptors, but not to the differences in their trafficking.

Key Words: Nephrogenic Inappropriate ADH syndrome (NSIAD), β -arrestin1/2, V2R, GPCR, Constitutive active receptor, R137L V2R

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Reseptörler hücreler-arası ve hücre içi sinyal iletimine aracılık eden proteinlerdir. Hücre dışından gelen uyarılar membranda veya sitoplazmada bulunan reseptörler aracılığı ile hücre içi sinyal yollarını aktive ederler. Bu uyarılar bölünme, farklılaşma gibi bütün hücrelerde ortak olan yolları etkileyebileceği gibi hücrelerin yapmak üzere özelleştikleri kas kasılması, hormon salgısı gibi daha spesifik sinyal yollarının aktivitelerini de düzenleyebilirler.

Hücre membranında bulunan reseptörler, sinyal iletiminde kullandıkları mekanizmalara göre G proteinlerine kenetli reseptörler (GPKR), iyon kanalı yapısındaki reseptörler, tirozin-kinaz aktivitesi gösteren reseptörler gibi çeşitli gruplara ayrılır. GPKR'ler membranı 7 kez kateden integral membran proteinleridir. Nörotransmitterler, hormonlar, otakoidler, ışık, koku gibi geniş bir uyarı yelpazesinin etkisine aracılık ederler (1). GPKR'nin çalışma mekanizmasının aydınlatıldığı yıllarda bir tip reseptörün bir çeşit G proteini ile etkileştiği düşünülmüş ve bu reseptörler, etkileştikleri G proteini tipine göre Gs'ye, Gi'ye, Gq'ya ya da G12'ye kenetli reseptörler olarak sınıflandırılmıştır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar aynı GPKR'nin birden fazla G proteini ile etkileşebildiğini (2), ayrıca bu reseptörlerin G proteinlerinin yanı sıra β -arrestinler gibi başka aracı proteinlere de kenetlenebildiğini göstermiştir (3).

β -arrestinler hemen hemen tüm GPKR'lerin sinyal iletiminde görevli adaptör proteinlerdir. Bu proteinler ilk olarak GPKR'lerin duyarısızlaştırılmasındaki rolleriyle öne çıkmışlardır. Reseptöre bağlanarak reseptör-G proteini etkileşimini ve dolayısıyla bu etkileşimden doğan sinyali sustururlar. Aynı zamanda bağlı oldukları reseptörlerin klattrin kaplı veziküller içinde hücre içine alınmalarına aracılık ederler. GPKR'lerde görülen mutasyonlar G proteini aracılı sinyali değiştirebildiği gibi β -arrestin etkileşimini de değiştirebilmektedir. Bu nedenle GPKR sinyal iletiminde β -arrestinlerin rolünün aydınlatılması önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, reseptörde görülen mutasyonlarda farklı β -arrestin alt tiplerinin hücre içi reseptör dağılımına etkisini incelemek amacıyla bir GPKR olan vazopressin-2 reseptörü (V2R) ve V2R mutantları kullanılmıştır. V2R, Gs kenetli bir reseptördür ve fizyolojik koşullarda ligandı olan antidiüretik hormonun (ADH, arjinin-vazopressin (AVP)) reseptöre bağlanması ile aktive olarak hücre içi cAMP artışına sebep olur. Artan cAMP, protein kinaz A'yı aktive ederek su kanallarının (AQP2, aquaporin 2) fosforilasyonuna neden olur. Bu fosforilasyon, ilgili hücrelerde AQP2'nin luminal hücre zarına translokasyonuna yol açarak, hücre zarının suya geçirgenlik kazanmasını ve bu sayede suyun geri emilimini artırarak idrarın konsantrite edilmesini sağlar (4). V2R'de görülen mutasyonlar birbirine zıt iki ayrı klinik tabloya sebep olmaktadır: Genetik kökenli nefrojenik diabetes insipidus (NDI) ve nefrojenik uygunsuz antidiürezis sendromu (NSIAD). NDI'ya sebep olan mutasyonlar reseptörün ADH'ye

duyarsızlaşmasına, bu nedenle su geri emiliminin azalmasına ve hipernatremiye sebep olmaktadır (5). NSIAD'ye sebep olan V2R mutasyonlar ise, ADH uyarısı olmaksızın reseptörün hücre içine sinyal göndermesine yol açarlar. Yani bu mutasyonları taşıyan reseptörler ortamda ADH bulunmadığı durumlarda bile sanki ADH ile uyarılmış gibi davranırlar. Başka bir deyişle yapısal olarak aktiftirler. Bunun sonucu olarak bu mutasyonları taşıyan bireylerde böbrekten su geri emilimi artarken, oligüri, hiponatremi ve buna bağlı olarak gelişen klinik belirtiler görülmektedir (6).

V2R reseptöründe, söz konusu patolojilere yol açtığı bilinen mutasyonlar ikiye ayrılmıştır. Birinci tip, reseptör molekülünün çeşitli yerlerinde oluşan (F229V, I130N L312S gibi), hücre zarındaki ekspresyonları normal düzeyde olan, agonistlere yanıt verebilen ve invers agonistlere duyarlı, konstitütif aktivite gösteren mutasyonlardır. İkinci tip ise tüm G proteinlerine kenetli reseptörlerin 3. heliksinin sitoplazmik ucunda bulunan (E/)DRY(/H) motifindeki V2R-137-Arginin yerine Leu (lösin), Cys (sistein) ya da His (histidin) gelmesiyle oluşan, V2R-reseptör agonistlerine zayıf yanıt veren, ama tolvaptan gibi invers agonistlere dirençli konstitütif aktivite gösteren, hücre zarındaki ekspresyonları görece olarak azalmış mutasyonlardır (7). Bu reseptörlerde görülen ligand yanıtsızlığını açıklamak üzere çeşitli teoriler ortaya atılmıştır, ancak literatürde bu konu henüz tutarlı bir biçimde çözülememiştir. Dolayısıyla, burada sunulan çalışmamızın amaçlarından biri NDI ve NSIAD'ye sebep olan nokta mutasyonlarının hücre içi sinyal iletimi bakımından fonksiyonel özelliklerini aydınlatmaya yöneliktir.

Çalışmamızda incelemek üzere reseptör fonksiyonunu arttıran ve NSIAD'ye sebep olan R137L, F229V V2R mutantları ve reseptör fonksiyonunu azaltarak NDI'ya sebep olan R137H V2R mutantı seçilmiştir. Bu mutantlar R137 bölgesinde görülen mutasyonların iki farklı patolojik fenotipe yol açması ve ayrıca seçtiğimiz NSIAD'ye sebep olan mutantlardan (F229V, R137L) sadece F229V'nin aktivitesinin invers agonistlerle inhibe edilebilmesi nedeni ile söz konusu mutantların birbirinden ve yaban tip (WT) V2R'den farklı olan sinyal repertuarını aydınlatmak üzere seçilmiştir. Çalışmamızın ilk aşamasında bu mutantların (R137H, R137L, F229V) β -arrestin1 ve β -arrestin2 etkileşimleri açısından farklılıkları incelenmiştir. Ardından reseptörün ribozomal sentezinden sonra hücre içinde hangi oluşumlar içine taşındığı ve konstitütif aktif reseptör mutantlarının spontan endositozu sonrası hangi yapılara taşındığı belirlenmiştir. Sonrasında NSIAD'ye sebep olan mutant reseptörlerde görülen konstitütif cAMP sinyaline Gs proteini ve β -arrestin1/2'nin katkısı incelenmiş ve mutant reseptörlerin hücre zarındaki lateral mobilitesi WT reseptörle karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür. Bu amaçla bir fotokonvertibl floresans protein olan dendra ile genetik olarak işaretlenmiş WT ve mutant reseptör konstraktlarını ve yeşil floresans proteinle (rGFP) aynı şekilde işaretlenmiş β -arrestin1/2 konstraktlarını çeşitli kombinasyonlarda ya da ayrı ayrı eksprese eden hücre klonları

kullanılmıştır. Bu hücrelerde V2R mutantlarının lateral mobilitesi FRAP (Flourescent Recovery After Photobleaching) tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu deneylerin sonuçları iki boyutlu difüzyon modeline göre analiz edilmiş, buradan elde edilen difüzyon katsayıları reseptörlerin lateral mobilitelerinin bir ölçüsü olarak kullanılmıştır.

Değişik veziküler yapılara (endozom, eksozom, lizozom, erken endozom gibi) proteinlerin, özellikle de sinyal proteinlerinin sekestre olmaları farklı sinyaller ve mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle V2R reseptöründeki bir nokta mutasyonunun bu reseptörün nerelere taşınmasına yol açtığını belirlemek, reseptörün trafiği açısından önemli bilgiler taşımaktadır. Yaptığımız çalışmalarda bu ayrımı yapmak için lizozom, endoplazmik retikulum (ER), Golgi gibi hücresel yapılar, spesifik floresans markerlar kullanılarak işaretlenmiş, bu markerların reseptöre bağlı olan floresans dendra proteini ile kolokalizasyonu konfokal mikroskop verilerinde değerlendirilmiştir.

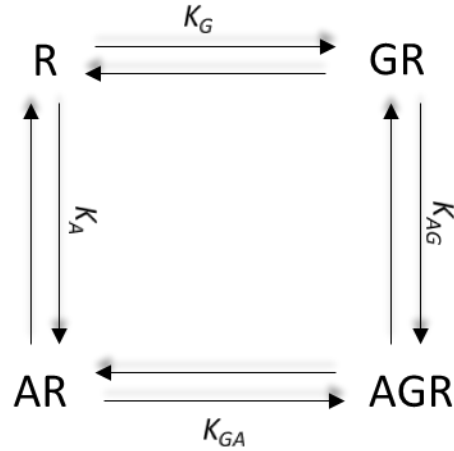
4. GENEL BİLGİLER

Hormonlar ve diğer hücre dışı sinyal molekülleri, hedef hücreleri üzerindeki etkilerini bu hücrelerin plazma zarlarında bulunan reseptörlerle etkileşerek gösterirler. Hücre dışı sinyalin reseptör aracılığı ile plazma zarından hücre içine iletilmesi, en temel hücresel fonksiyonlardan biridir. Bu sürece aracılık eden membran reseptörleri, sinyal iletiminde kullandıkları mekanizmalara göre G proteinlerine kenetli reseptörler (GPKR), iyon kanalı yapısındaki reseptörler, tirozin-kinaz aktivitesi gösteren reseptörler gibi çeşitli gruplara ayrılır. Organizmada en yaygın olarak kullanılan GPKR aracılı sinyal iletim sistemidir. GPKR'ler hücre membranını 7 kez geçen ve 7 heliks yapıdan oluşan integral membran proteinleridir. İnsan genomunda yaklaşık 800 farklı gen tarafından kodlanan GPKR'ler bilinen en geniş sinyal proteini ailelerinden birini oluşturmaktadır (8). İnsan vücudundaki hemen hemen bütün fizyolojik süreçlere aracılık eden GPKR'lerin sinyal yollarındaki aksaklıklar pek çok hastalığın etyopatogenezinde rol oynamaktadır. Bu özellikleri ve farmakolojik olarak hedeflenebilir olmaları nedeniyle GPKR'ler ilaç araştırmalarında üzerinde en çok çalışılan biyolojik hedefler olmuştur ve bugün için FDA tarafından onaylanmış ilaçların %35'i GPKR'ler üzerinden etki göstermektedir (9).

G PROTEİNİ ARACILI SİNYAL İLETİMİ

Reseptörün nasıl aktive olduğu moleküler düzeyde kesin olarak bilinmemekle birlikte reseptör aracılı sinyal iletimini açıklamak için ortaya konmuş birçok model bulunmaktadır. Bunlardan GPKR aracılı ile sinyal iletiminde yaygın olarak kabul gören “Üçlü-kompleks” modeline göre, sinyal iletiminde görev alan; ligand, reseptör ve G-proteini olmak üzere 3 temel bileşen vardır. Bu modele göre, ligand bağlanma bölgesi ve G proteini bağlanma bölgesi olmak üzere reseptörün iki bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Model, reseptörün dört farklı durumda bulunabileceğini varsayar; inaktif form (R), G proteinine kenetli form (RG), agoniste bağlı form (AR) ve hem agonist hem G proteiniyle kenetli form (ARG). Bu modelde reseptörün G proteiniyle kenetli formu aktif kabul edilir. Yani spontan olarak oluşan reseptör-G proteini kompleksi (RG) ve agonist bağlanması ile oluşan ARG kompleksi reseptörün aktif formlarıdır. Reseptörün G proteiniyle bağlı olmayan formları ise inaktif formlarıdır (10). Bazal koşullar altında reseptörün bu iki formu birbirleri ile denge içinde bulunmaktadır (Şekil 2.1). Bu denge nedeni ile ligand uyarısı olmadığı durumlarda bile hücre içine belirli bir oranda sinyal iletimi olmaktadır. Bazal aktivite olarak tanımlanan bu sinyalin büyüklüğü reseptör türüne, miktarlarına ve bulundukları dokuya göre değişiklik gösterebilir. Üçlü kompleks modeli yayınlandığı günden bugüne kadar GPKR aracılı sinyal iletimi ile ilgili yapılan çalışmaların

açıklanmasında temel model olarak kullanılmıştır. Model, zaman içinde çalışmalardan elde edilen çeşitli verileri açıklamak için modifiye edilmiş ve genişletilmiş ve kübik üçlü kompleks modeli gibi çeşitli türevleri oluşturulmuştur (11).



Şekil 2.1 Basit üçlü kompleks modeli

GPCR'lar hücre içi sinyal iletimini G proteini gibi reseptöre kenetlenebilen proteinler aracılığı ile gerçekleştirirler. G-proteini, alfa ($G\alpha$), beta ($G\beta$) ve gama ($G\gamma$) alt birimlerini içeren bir heterotrimerdir. İçerdikleri α -alt birimlerine göre Gs, Gi, Gq ve G12 olmak üzere dört ana sınıfa ayrılırlar. Gs proteini adenilat siklaz enzimini aktive ederek hücre içi cAMP sentezinin artmasına, Gi adenilat siklaz inhibisyonu yaparak hücre içi cAMP miktarının azalmasına, Gq fosfolipaz C enzimini aktive ederek inositol-3-fosfat ve diaçilgliserol oluşumuna neden olur. G12 ise, Rho ailesinin monomerik GTPaz'larını aktive ederek etki gösterir (12).

GPCR aktif formunu aldığı anda, reseptörün hücre içine bakan yüzeyinde G proteini bağlanma bölgeleri açığa çıkar. Bu bağlanma, GDP bağlı G proteininde GDP-GTP değişimi ile sonuçlanır. Bu nükleotid değişimi neticesinde G proteini α alt birimi ile $\beta\gamma$ alt birimi birbirinden ayrılır ve hücre içinde farklı sinyal yollarının aktive edilmesine neden olur. Böylece G-proteinleri reseptörden aldıkları sinyali kenetli oldukları efektör proteinlere aktarırlar. α alt birimi efektör proteini adenilat siklaz ve fosfolipaz C enzimini kullanırken $\beta\gamma$ dimerleri GPCR kinazların (GRK) membrana getirilmesinde, G proteinine-bağımlı içeri doğrultucu potasyum kanallarının (GIRK), voltaja-bağımlı kalsiyum kanallarının regülasyonunda rol oynarlar. Sinyal, $G\alpha$ alt birimine bağlı GTP'nin, proteinin kendine ait GTPaz aktivitesi ile GDP'ye hidroliz olması ve $\beta\gamma$ alt birimleri ile yeniden birleşmesiyle sonlandırılır (13).

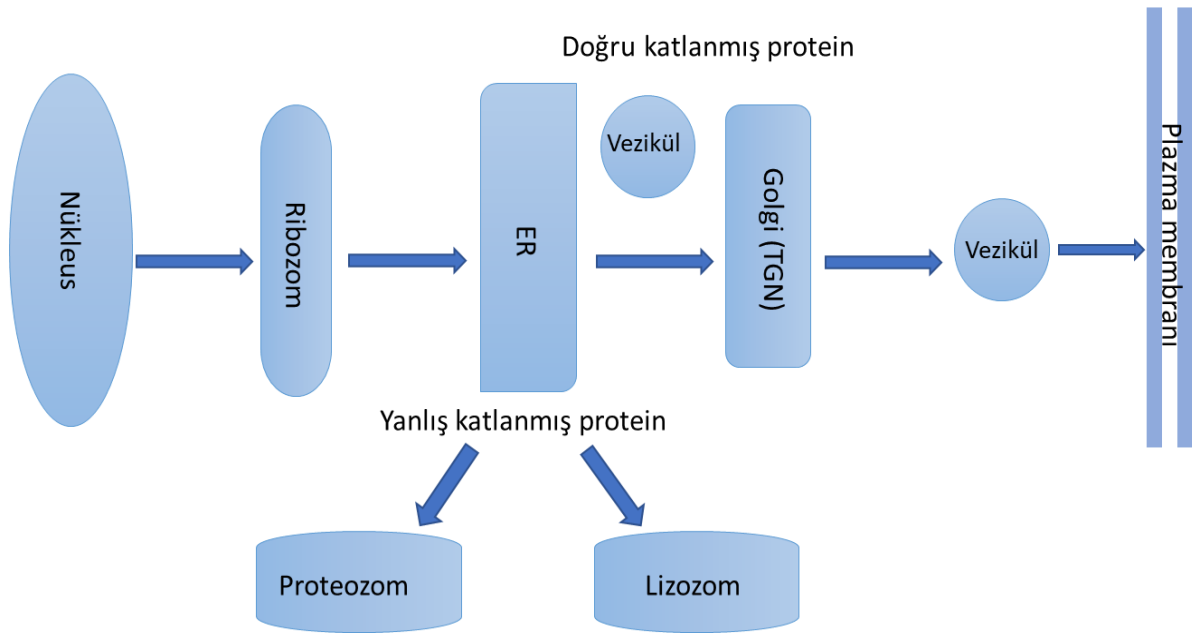
GPCR SENTEZİ VE MEMBRANA TAŞINMASI

GPCR'ler diğer bütün proteinler gibi ribozomda sentezlenirler. Reseptörün fonksiyon gösterebilmesi için sentezden sonra proteinin fonksiyonel üç boyutlu formunu kazanması ve

plazma zarına taşınması gerekir. Reseptörler gibi plazma zarına taşınacak proteinler ribozom-protein kompleksindeki sentez aşaması bitmeden sinyal tanıma partikülü (SRP) adı verilen işaretleyiciler ile endoplazmik retikulum (ER) yüzeyine taşınırlar. SRP'nin yeni sentezlenmiş protein-ribozom kompleksine bağlanması için protein üzerinde 6-12 hidrofobik kalıntı uzantısı içeren 16-30 amino asitten oluşan bir sinyal paterninin olması gerekir (14). SRP-ribozom kompleksinin ER zarı ile birleşmesi, reseptör sentezini yeniden başlatır. Bu birleşme SRP'nin ER zarı üzerinde bir SRP reseptörüne bağlanması ile gerçekleşir. Bu bağlanma sonrası sentezlenen reseptörün hidrofilik kısımları ER lümenine girerken hidrofobik kısımları ER zarında yerleşir. Sentezlenen proteinlerin N- glikozilasyonu ER içinde başlatılır. Yalnızca Asn (asparajin)-X-Ser (serin) veya Asn-X-Thr (treonin) tanıma dizisinin parçası olan ve ER lümeni içinde bulunan asparajinler ER'de glikozile edilebilir. Disülfid bağlarının oluşumu dahil olmak üzere diğer işlemler de ER içinde gerçekleşir (14). ER'de sentezlerini takiben, reseptörlerin biyolojik olarak aktif formlarına dönüşebilmeleri için üç boyutlu yapılarını kazanmaları gerekir. Yeni sentezlenen reseptörlerin doğru katlanmaları, ER içerisinde bulunan şaperonlar, şaperoninler aracılığı ile sağlanır. Doğru üç boyutlu yapısına kavuşan reseptör, ER membranından tomurcuklanan Coat Protein Complex II (COPII) kaplı veziküller aracılığı ile Golgi'ye taşınır (15). Vezikülün Golgi zarına füzyonu, içeriklerinin Golgi'nin lümenine iletilmesi ve yeni sentezlenmiş integral zar proteinlerinin Golgi zarlarına translokasyonu ile sonuçlanır. ER'nin aksine Golgi, en az dört ayrı bölmeden oluşur. Her bölme, kendi yerleşik protein tamamlayıcısını içerir. Reseptörler, Golgi sarnıçları boyunca vezikül tomurcuklanması ve füzyon döngüleri ile taşınırlar. Bu taşınma boyunca her durakta, spesifik oligosakkarit işleme adımları gerçekleşir. Örneğin, N-bağlı oligosakkaritlere N-asetilglukozamin eklenmesi medial Golgi'de meydana gelirken, trans Golgi'de galaktoz eklenir. Golgi'de meydana gelen, proteinlerin hücre içindeki hedeflerine taşınmasını sağlayan veziküllere ayrılması süreci TGN (Trans-Golgi-Network) olarak anılmaktadır. TGN, hücre içi kargoların Golgi aracılığı ile hedeflerine taşınmasında önemli rol oynamakla birlikte, aynı zamanda endositoz ile hücre içine alınan moleküllerin de hedeflerine taşınmasına aracılık eder. TGN'den plazma zarına geçiş, yine vezikül tomurcuklanması ve ardından plazma zarının iç yüzeyine vezikül füzyonu yoluyla gerçekleştirilir. Bu durumda vezikül oluşumuna yardımcı olan kaplama proteini klatrindir. Veziküller içindeki çözünür proteinler daha sonra hücrelerden salınırken, reseptörler integral zar proteinleri gibi plazma zarı ile birleşir (16).

Protein katlanması fonksiyonel bir molekül oluşturulması için geçirilen süreçlerin bütünü kapsar. Bu süreç, dizilimine bağlı olarak hem biyolojik hem de fizikokimyasal olayları içerir. Süreç oldukça karmaşıktır ve bazı durumlarda protein sekansındaki mutasyonlardan kaynaklanan yanlış katlanmanın önüne geçilemez ve birçok hastalığa ve ölümcül bozukluklara

yol açar. Proteinler ER'yi terk etmeden önce ER içerisinde bulunan kalite kontrol sistemi (quality control system) tarafından kontrol edilir. Proteinlerin düzgün katlanmadığı tespit edilirse 'katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response)' aktive edilerek, düzgün katlanmamış proteinler ubiquitin ile işaretlenip sitoplazmada bulunan proteozomlarda yıkıma gönderilir. Proteinlerin ubiquitin ile işaretlenerek degradasyona gönderildiği süreç ERAD (ER-associated degradation) olarak adlandırılmaktadır (17). Proteinlerin ERAD tarafından degrade edilemediği durumlarda ERLAD (ER-to-lysosomes-associated degradation) adı verilen süreç aktive olmakta ve proteinler lizozom aracılı degradasyona gönderilmektedir (Şekil 2.2) (18).



Şekil 2.2 Protein sentezi, taşınması ve yanlış katlanmış protein yanıtı

RESEPTÖR DESENTİZASYONU

Hücreler, reseptör sinyali sonlandırmak ve G proteini aracılı sinyal yollarının aşırı aktivasyonundan kaçınmak için, reseptörlerin GRK'ler tarafından fosforilasyonunu ve ardından fosforile reseptöre β -arrestinlerin bağlanarak içeri alınmasını tetikleyen özel bir mekanizma kullanırlar. Burada kullanılan β -arrestinler sitozolik adaptör proteinlerdir. GPCR'lerin desensitizasyonu ve internalizasyonundan sorumludurlar. Aktif durumdaki reseptörü tanıyan GRK'ler reseptörü çeşitli bölgelerinden, özellikle serin/treonin bölgelerinden fosforile ederler. Bu fosforilasyon paterni β -arrestinler için sinyal görevi görür ve β -arrestinler, reseptörün hem fosforile C-kuyruğuna hem de reseptörün transmembran bölgesinin merkezine (transmembran core) bağlanır (19). β -arrestin'in reseptöre bağlandığı transmembran core, G proteini bağlama bölgesi ile örtüşür. Reseptöre β -arrestin bağlanması, G proteininin reseptöre bağlanmasını ve dolayısıyla reseptör aracılı G protein aktivasyonunu engeller (desensitizasyon). Buna ek olarak

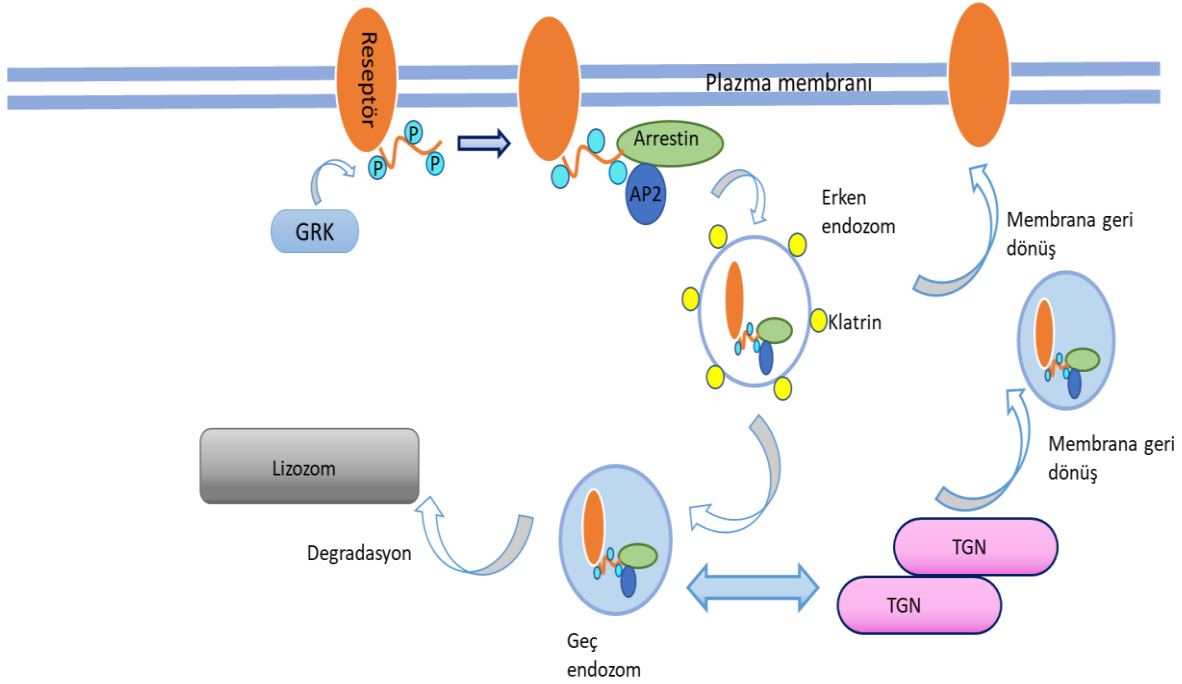
β -arrestinlerin fosforile reseptöre bağlanması onların klatrin kaplı veziküller aracılığı ile internalizasyonuna sebep olur (20). Son on yılda yapılan çalışmalar, reseptörlerin internalizasyonuna aracılık eden β -arrestinlere yardımcı partnerlerin varlığını ortaya koymuştur. Bunlar; Adaptör protein-2 (AP2), N-etilmaleimide duyarlı füzyon proteini (NSF), küçük G proteini ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) ve PI4P kinazlardır (21).

β -arrestin ile kompleks oluşturmuş GPKR'lerin hücre içindeki güzergahı bu etkileşiminin ne kadar istikrarlı oluşuna bağlıdır. GPKR'lerin sitozolik C-kuyruğundaki serin/treonin bölgelerinin fosforilasyon ve ubiquitinasyon paternleri GPKR- β -arrestin kompleksinin stabilitesinin belirlenmesinde önemli bir etkindir. GPKR'ler β -arrestin ile olan etkileşimlerinin gücüne göre iki sınıfa ayrılmışlardır. Anjiyotensin II 1a (AT1a) ve vazopressin-2 reseptörleri (V2R) gibi kümelenmiş fosforilasyon bölgelerini içeren reseptörler B sınıfı GPKR olarak adlandırılırlar, β -arrestinler ile güçlü etkileşerek sıkı kompleksler oluştururlar ve endozomlar içerisinde sürekli (sustained) internalizasyona uğrarlar. β -arrestinler ile uzun süreli etkileşimleri nedeniyle, B Sınıfı reseptörlerin hücre yüzeyine geri dönüşü yavaştır. A sınıfı GPKR'ler ise β -arrestinler ile zayıf etkileşirler, geçici internalizasyona uğrar ve ardından hızlıca plazma zarına geri dönerler (22). Rhodopsin ve β -adrenerjik reseptörler A grubu GPKR'nin prototipik örnekleridir.

Bütün GPKR'ler, reseptörlerin membran ekspresyonunu düzenleyen, adaptif duyarsızlaşma mekanizmasının ana bileşenleri olan β -arrestin proteinleriyle etkileşebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar β -arrestinlerin, duyarsızlaşma mekanizmasındaki temel görevlerinin yanı sıra hücre içine sinyal ileten "transdüserler" gibi çalışabildiğini de göstermiştir. Reseptöre bağlanan β -arrestinlerin sadece sinyalin durdurulmasında değil, başta MAPK yolağı olmak üzere, bazı sinyal yolaklarında görev alan proteinler için adaptör görevi görerek G proteinlerinden bağımsız GPKR yanıtlarında rol oynadıklarını göstermiştir (23).

β -arrestinlerin 4 farklı alt tipi bulunmaktadır ancak reseptör internalizasyonunda rol oynayan β -arrestinler temel olarak β -arrestin1 ve β -arrestin2'dir. β -arrestin1 ve 2 proteinlerinin amino asit sekansları %78 oranında benzerdir. Ancak β -arrestin1 nükleus içerisine girip, spesifik gen promotörlerinde histon asetilasyonunu kolaylaştırarak gen ekspresyonunu düzenleyebilirken, β -arrestin2'nin GPKR stimülasyonuna yanıt olarak çekirdeğe hareket ettiğine dair kanıt bulunmamaktadır (24). Ayrıca GPKR tipine göre etkileştikleri β -arrestin formunun farklı olabildiği bilinmektedir. Örneğin, β 2AR da olduğu gibi bazı GPKR'lerin internalizasyonuna, primer olarak β -arrestin2 izoformu aracılık ederken, anjiyotensin II tip 1A reseptörünün (AT1AR) internalizasyona iki β -arrestin formu da eşit katkı sağlamaktadır (25).

β -arrestin aracılı endositoz ile hücre içine alınan GPKR'lerin hücresel trafiği ile ilgili bilgilerimiz sınırlıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar neticesinde bildiklerimiz şu şekildedir: Reseptörün hücre içine alındığı endozom kompleksleri (erken endozom) ya hızlıca plazma membranına geri dönmekte, ya da geç endozom kompleksi adı verilen bir komplekse dönüşmektedir. Bu geç endozom kompleksi ise ya TGN aracılığı ile tekrar plazma membranına geri dönmekte ya da lizozom ile birleşip içeriğini degrade etmektedir (26) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 β -arrestin aracılı reseptör internalizasyonu ve hücre içi reseptör trafiği

V2R VE MUTASYONLARININ GPKR SİNYALİ ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışmanın konusu olan V2R, bir GPKR'dir ve fizyolojik koşullarda agonisti olan ADH (AVP) ile uyarıldığında Gs-adenilat siklaz-cAMP-Protein kinaz A zincirini harekete geçirerek hücre içine sinyal iletir. Bu sinyal, böbrek medüller toplayıcı kanallarındaki epitel hücrelerinde bulunan AQP2'nin fosforilasyonuna neden olur. Bu fosforilasyon, ilgili hücrelerde AQP2'nin luminal hücre zarına translokasyonuna yol açarak, hücre zarının suya geçirgenlik kazanmasını sağlar. Böylece, medüller hiperosmolarite nedeniyle su geri emilimi sağlanır ve idrar konsantre edilir (27). V2R'de görülen mutasyonlar çeşitli klinik tablolara sebep olmaktadır. Bunlardan en sık görülenleri reseptörde fonksiyon kaybı ile sonuçlanan ve nefrojenik diyabetes insipidus (NDI)'a sebep olan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar reseptörün ADH'ye duyarsızlaşmasına, bu nedenle su geri emiliminin azalmasına ve hipernatremiye sebep olmaktadır. Konjenital NDI vakalarının %90'ı V2R'deki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bugüne kadar NDI hastalarında 250'den fazla V2R mutasyonu rapor edilmiştir. Fonksiyonel özelliklerine ve V2R biyosentezi üzerindeki etkilerine göre bu mutasyonlar kabaca 3 gruba ayrılmıştır; Tip 1; protein

ekspresyon bozukluğu, Tip 2; lokalizasyon bozukluğu, Tip 3; fonksiyonel bozukluk. En yaygın görülen tip V2R proteininin hücre içi trafiğinin bozulması nedeniyle görülen tip 2'dir ve NDI vakalarının %70 kadarında görülür (7). Bu tip mutasyona sahip reseptörler doğru katlanamaz ve proteinin sentezlenmesinden sonra membrana taşınmasına aracılık eden organellerden birinde (çoğunlukla ER'de) birikim gösterirler. Bu nedenle, V2R mutasyonuna bağlı gelişen NDI, genellikle bir katlanma hastalığı olarak adlandırılır. Geri kalan tiplerden tip 1'de mRNA'dan protein sentezi aşamasında, transkripsiyon veya translasyon defektleri nedeniyle azalmış veya budanmış (truncated) protein ekspresyonu gözlenirken, tip 3'te ligand bağlanma defektleri, G protein bağlanma defektleri ve konstitütif endositoza bağlı fonksiyonel bozukluklar gözlenir (28)(29). Bununla birlikte, bu sınıflandırma basite indirgenmiştir ve çoğu V2R mutasyonu kombine bozukluklar içermektedir.

V2R'de görülen diğer bir tip mutasyon ise daha nadir olarak görülen ve reseptörün spontan aktivite kazanmasıyla, yani agonistle uyarılmadığı halde reseptörün sinyal üretmesiyle, sonuçlanan nokta mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar nefrojenik uygunsuz antidiürez sendromu (NSIAD, Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis) olarak adlandırılan bir klinik tabloya yol açmaktadır. Hastalarda, kan ADH düzeyi çok düşük olmasına rağmen reseptör sanki ADH ile uyarılmış gibi hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedir. Sonuç olarak böbrekten su geri emilimi artarken, hastalarda oligüri, hiponatremi ve buna bağlı klinik semptomlar görülmektedir. NSIAD ilk olarak 2005 yılında 2.5 ve 3 aylık akraba olmayan 2 ayrı bebekte tespit edilmiştir. Klinik prezantasyonları kandaki ADH düzeyinin fazlalığını düşündüren ancak kan ADH düzeyleri normal olan bu hastaların DNA'ları izole edilmiş ve V2R geni AVPR2'de mutasyonlar tespit edilmiştir. İki hastada da AVPR2'nin kodon 137'sinde mutasyon gözlenmiş, bir hastada kodon 137'de (R137C) arginin-sistein değişimi gözlenirken diğer hastada, kodon 137'de (R137L) arginin-lösin değişimi gözlenmiştir (6). Daha sonrasında yapılan araştırmalar sayesinde, reseptör bazal aktivitesinde artışa sebep olan NSIAD mutasyonlarına V2R'nin farklı bölgelerinde de rastlanmıştır. Örneğin reseptörün beşinci heliksinin sitoplazmik ucundaki F229V (30), üçüncü heliksdeki I130N (31) ve yedinci heliksdeki L312S (32) mutasyonları da NSIAD fenotipiyle sonuçlanmaktadır. NSIAD mutasyonları, biyolojik ve farmakolojik özelliklerine göre iki farklı fonksiyonel gruba ayrılabilir. İlk grubu kodon 137 bölgesinde görülen mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu mutant reseptörler, azalmış membran ekspresyonu, azalmış AVP yanıtı, konstitütif β -arrestin2 etkileşimi ve orta derecede artmış bazal cAMP sinyal üretimiyle karakterizedir. Bu mutantlarda gözlenen artmış bazal cAMP sinyalinin, tolvaptan gibi invers agonistlere duyarlı olmaması bu grubun en dikkat çekici özelliğidir (33). İkinci grubu ise F229V, I130N ve L312S gibi reseptörün çeşitli bölgelerinde görülen mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu mutantların membran ekspresyonları yaban tip (WT)

V2R'den farklı bulunmamaktadır. Ayrıca bu mutantlar β -arrestin2 etkileşimi bakımından konstitütif aktivite göstermemektedir. Buna karşılık bazal cAMP sinyaline bakıldığında yüksek düzeyli ve tolvaptana duyarlı bir konstitütif aktiviteye sahiptirler.

V2R'deki 137. pozisyondaki arginin, bütün G proteinlerine kenetli reseptörlerde korunmuş olan ve reseptör aktivasyon mekanizmasında önemli rolü olduğu bilinen DRY (aspartat-arginin-tirozin) motifinin bir parçasıdır (34). 137. pozisyonda saptanan başka bir doğal mutasyon olan R137H, NSIAD'den farklı olarak reseptörde fonksiyon kaybıyla sonuçlanmakta ve NDI'ya sebep olmaktadır. R137H mutant reseptörün AVP'ye bağlanma afinitesi WT'ye benzer olmasına rağmen Gs/adenilat siklaz sistemini uyaramamaktadır (35). Bu mutant aynı bölgede görülen R137L/C mutasyonları gibi agonistten bağımsız, β -arrestin aracılı desensitizasyon ve internalizasyona uğramaktadır (36). Yine R137L/C mutantları gibi membran ekspresyonunun az olduğu bilinmektedir. R137H mutasyonunda görülen azalmış membran ekspresyonu hem β -arrestin aracılı endositozdan hem de yanlış katlanmış proteinlerin ER'de birikmesinden (Trapped) kaynaklandığı düşünülmektedir (7). Aynı pozisyondaki bir nokta mutasyonu, orijinal aminoasidin yerine gelen aminoaside bağlı olarak, fonksiyon artışı ya da kaybıyla sonuçlanabilmektedir ve bu durum V2R'de görülen bu mutasyonları, sinyal iletimi çalışmalarında araştırmak için ilginç kılmaktadır.

Çalışmamız kapsamında incelediğimiz R137H, R137L ve F229V V2R mutantlarının iki farklı patolojik fenotipe yol açtığı bilinmektedir: Reseptör fonksiyonunu artıranlar (R137L, F229V) ve azaltanlar (R137H). Birinci grup mutasyon, fenotipik olarak NSIAD'ye, ikinci grup ise NDI'ya yol açmaktadır. Ancak bu mutantlar moleküler düzeyde incelendiklerinde, R137H, R137L mutantlarının hücre içi β -arrestin türleriyle etkileşmek bakımından konstitütif aktiviteye sahip oldukları görülmekte, F229V mutantında ise bu konstitütif aktivite görülmemektedir. Başka bir deyişle, moleküler fenotip ile klinik fenotip tutarsız olabilmektedir. Reseptörün aynı bölgesinde görülen mutasyonların birbirine zıt klinik tablolar oluşturmaları ve konstitütif aktif mutantlardan sadece bazılarının invers agonistlere yanıt vermesi, söz konusu mutasyonların reseptörün moleküler işleyişi üzerindeki etkilerini iyi ya da yeterli düzeyde anlayamadığımıza işaret etmektedir. Bu nedenle, bu mutantların transdüserler, yani Gs ve β -arrestinler ile olan etkileşmelerinin, hücre içi ve membran trafiklerinin iyi karakterize edilmesine gereksinim vardır. Bu karakterizasyon, tedavi stratejilerini geliştirmek ve belirlemek bakımından hayatidir. β -arrestinler, reseptör-G protein etkileşimlerini bloke ederek ve reseptör internalizasyonunu hızlandırarak GPCR'leri duyarsızlaştırır (22). Bu nedenle, β -arrestin2 ile etkileşimin, reseptör aracılı cAMP sinyalini azaltması beklenmektedir. Bununla birlikte, β -arrestinler GPCR sinyallerini hücre içi MAPK yapı iskelesine bağlayan bağımsız sinyal transdüksiyon proteinleri olarak da işlev göstermektedir. Bu nedenle, β -arrestin aracılı sinyalin aktivasyonu, bu tür

mutasyonların patolojik etkisine de katkıda bulunabilir. Eđer yleyse, β -arrestinlerin hücre çekirdeğine girme kabiliyeti farklılık gösterdiğinden ve farklı sinyal yollarını uyarabileceğinden, reseptör aktivasyonunun her iki β -arrestin izoformu ile etkileşmek bakımından farklılık gösterip göstermediğini netleştirmek önemlidir.

Bu tezde sunulan çalışmalarda yukarıda söz edilen V2R mutantlarının: 1) iki β -arrestin tipiyle ve Gs proteiniyle olan etkileşmelerinin, 2) β -arrestin aracılı internalizasyonlarının, 3) ribozomal sentezinden sonra hücre içinde hangi oluşumlar içine taşındığının ve 4) hücre zarındaki lateral mobilitelerinin karşılaştırılmal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Hücre kültürü

Bu proje kapsamında yapılan deneylerin tümü kültür hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, laboratuvarımızda halihazırda bulunan β -arrestin1/2 genleri kalıcı olarak silinmiş (KO) MEF (Mouse Embironal Fibroblast) hücre klonları kullanılmıştır. Kullandığımız hücre klonları şöyledir: 1) β -arrestin KO MEF, 2) Bu hücreye rGFP ile füzyon yapılmış β -arrestin1 ve β -arrestin2 ayrı ayrı transfekte edilerek elde edilmiş iki β -arrestin klonu, 3) rGFP- β -arrestinleri eksprese eden hücrelere, dendra füzyonu yapılmış WT ya da mutant V2R'yi kalıcı olarak transfekte edilmiş β -arrestin+reseptör klonları.

Etiketli reseptörleri ve β -arrestini kalıcı bir şekilde birlikte eksprese eden hücreler Puromisin (1 μ g/ml) ve higromisin B (100 μ g/ml) içeren ortamda üretilerek seçilmiştir. Hücre hatları %10 fetal sığır serumu (FSS), 100 U/ml Penisilin, 100 μ g/ml Streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂'li ortamda çoğaltılmıştır.

5.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler, temin edildikleri firma adları ve katalog numaraları ile EK 1'de verilmiştir.

5.2 Yöntem

5.2.1 Konfokal mikroskopi

Mikroskopik floresans ölçümü için Leica TSC SP5 konfokal mikroskopi sistemi kullanılmıştır. rGFP floresans proteini ile işaretli β -arrestin1/2, ve dendra floresans proteini ile işaretli V2R konstraktlarını içeren hücreler deneyden önce steril lameller üzerine ekilmiş ve hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler mikroskop tablasına yerleşen bir banyoya aktarılmış ve besi yeri 1 ml KRH (NaCl (120 mM), KCl (4.7 mM), CaCl₂ (2.2 mM), Hepes (10 mM), KH₂P04 (1.2 mM), MgSO₄ (2 mM)) tamponu ile değiştirilmiştir. Bütün deneyler canlı hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde yeşil floresans veren rGFP ve fotokonversiyon öncesi dendra proteinini görüntülemek için, hücreler mikroskopta bulunan argon-ion lazerinin 488 nm çizgisi ile uyarılmıştır. Sistemin emisyon ışığı yolu üzerinde bulunan monokromatör kullanılarak 500–550 nm dalga boyu aralığında 1024x1024 veya 2048x2048 spasyal

çözünürlükte 8 bit'lik floresans yoğunluğu içeren görüntüler alınmıştır. Dendra proteininin yeşilden kırmızı forma fotokonversiyonu, mikroskobun standart floresans uyarma yoluna monte edilmiş 100 W cıva ark lambasının (Osram, HBO 103w/2 modeli) tam spektrumu kullanılarak hücrelerin 10 saniye ışınlanmasıyla sağlanmıştır. Kırmızı floresans görüntüsü için mikroskopta bulunan He-Ne lazerin 543 nm çizgisi ile floroforlar eksite edilmiş, 560 nm ve üzerindeki dalga boylarındaki emisyon şiddeti, yukarıda belirtilen çözünürlüklerle kaydedilmiştir.

5.2.2 FRAP deneyleri

FRAP deneyleri, reseptörlerin zarındaki lateral difüzyon katsayılarını tahmin etmek için tasarlanmıştır. Bu deneylerde, hücre zarının mikroskopun optik aksına dik olduğu konfokal kesitler seçilmiştir. Bu kesitlerdeki yeşil floresans, mikroskopa bağlı argon iyon lazerinin 488 nm çizgisi belirli bir zar bölgesine 100 ms boyunca odaklanarak soldurulmuştur. Bu protokolle sağlanan bölgesel (sirküler) soldurmanın çapı ortalama 3 µm olarak ölçülmüştür. Soldurmanın hemen ardından, zar görüntüleri yaklaşık birer saniye arayla kaydedilmiş ve soldurulan bölgeye floresans dolumu değerlendirilmiştir. Bu veriler, deney boyunca oluşan spontan floresans kaybına göre düzeltilmiştir. Düzeltilmiş veriler iki boyutlu difüzyon modeli temel alınarak değerlendirilmiştir. İki boyutlu difüzyon denklemi şöyledir:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \cdot (D \nabla c) = -D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right)$$

Difüzyon katsayısı D 'yi tek parametre olarak içeren bu türevsel denklemin, burada kullanılan deneysel konfigürasyon için çözümü aşağıdaki gibi verilmektedir (37).

$$f(t) = e^{-2\tau/t} \left[I_0 \left(\frac{2\tau}{t} \right) + I_1 \left(\frac{2\tau}{t} \right) \right], \quad \tau = \frac{\omega^2}{4D}$$

Burada $f(t)$, soldurulmuş bölgeden gelen normalize integral floresans, ω soldurulmuş bölgenin yarıçapı, D difüzyon katsayısı, $I_n(x)$ ise

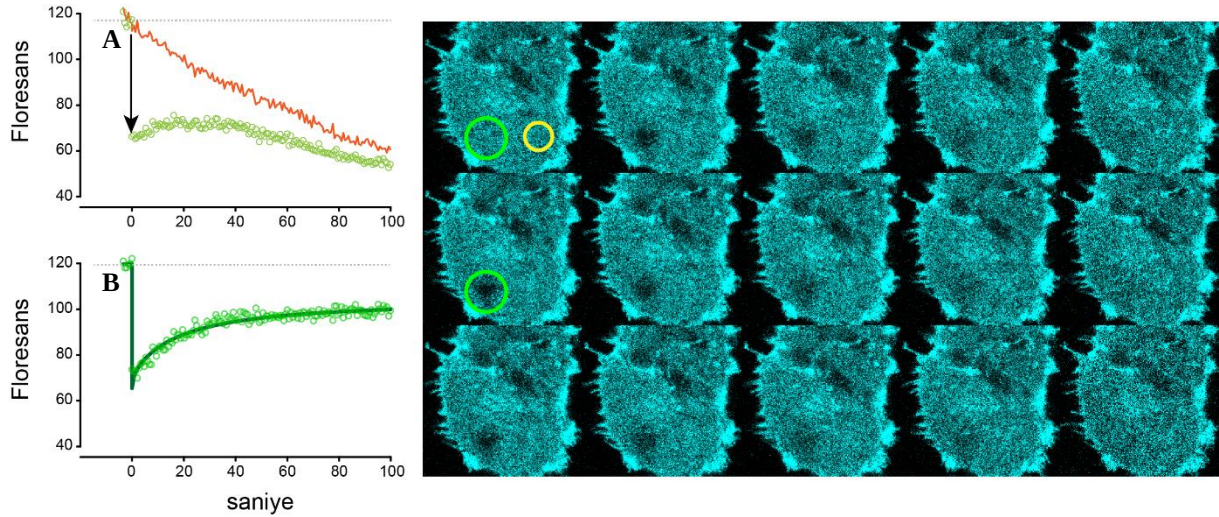
$$I_n(x) = i^{-n} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!(n+k)!} \left(\frac{ix}{2} \right)^{n+2k}, \quad i = \sqrt{-1}$$

şeklinde tanımlanan, n 'inci derece modifiye Bessel fonksiyonları anlamına gelmektedir. $f(t)$ için yukarıda verilen ifadeye deneysel skala parametreleri eklendiğinde aşağıdaki fonksiyon elde edilmektedir:

$$F(t) = f(t)[F_{\infty} - F_0] + F_0$$

Floresans soldurma işleminden hemen sonra ve dolun tamamlandıktan sonra gözlenen floresans değerlerini (yani F_0 ve F_∞) parametre olarak içeren bu fonksiyon, değerlendirmelerimizde regresyon modeli olarak kullanılmıştır.

Yapılan bu analize bir örnek Şekil 5.1’de şematize edilmiştir. Doğrusal olmayan regresyon hesapları MS Excel programı kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 5.1 FRAP deneyleri

Şekil A da kırmızı ile belirtilmiş veri, arka alandaki floresans yoğunluğunun (resimde sarı daire ile belirtilen bölge) zamana bağlı değişimini göstermektedir. Şekil A da yeşille belirtilen çizgi ise soldurulmuş alandaki floresans değişimini göstermektedir. Şekil B ise soldurulmuş alandaki floresans değişimi arka alana göre düzeltildikten sonra elde edilen floresans şiddetini göstermektedir. Şekil B’deki düzgün yeşil eğri, bu veriden tahmin edilen regresyon eğrisidir. A ve B panellerindeki noktalı çizgiler soldurma öncesindeki bölgesel floresans şiddetini göstermektedir. Sağdaki resim, deney boyunca alınan (normalize) görüntü örnekleridir. Görüntülerin arası 6 saniyedir ve görüntüler önce satır, sonra sütun sırasıyla dizilmiştir.

5.2.3 Kolokalizasyon hesabı

V2R-dendra, rGFP- β -arrestin kolokalizasyon hesapları için 1024x1024 spasyal çözünürlükte 8 bit’lik floresans yoğunluğu içeren konfokal görüntüler kullanılmıştır. Dendra proteininin cıva ark lambası altında fotokonversiyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen görüntülerde, kırmızı kanal ile yeşil kanal arasındaki uzaysal korelasyon, Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak belirlenmiştir. İlgili kanallardaki hücreler elle seçilmiş ve korelasyon hesapları her bir hücre için ayrı ayrı yapılmıştır. Korelasyon katsayıları MATLAB programında hesaplanmıştır.

AVP uyarısı sonrası floresans dağılımının zamana bağlı değişimini incelemek için yapılan analizlerde, önce WT V2R- β -arrestin lokalizasyonlarını gösteren kırmızı kanal ve yeşil kanal floresans şiddetleri birbirlerine karşı çizdirilmiş, sonra bu grafiklerde floresans yoğunluğu az olan bölgeler LASX programında elle seçilerek bu verilerden çıkarılmıştır. Perinükleer, periferik ve total korelasyon hesapları için yine ilgili bölgeler LASX programı kullanılarak elle

seçilmiştir. Kırmızı ve yeşil kanal arasındaki korelasyonu gösteren Pearson korelasyon katsayıları yukarıda belirtilen şekilde seçilen verilerden MATLAB programı kullanılarak hesaplanmıştır.

5.2.4 ER-Golgi-lizozom lokalizasyon hesapları

Hücreler ilgili markerlar ile işaretlendikten sonra 2048x2048 spasyal çözünürlükte 8 bit'lik floresans yoğunluğu içeren konfokal görüntüler alınmıştır. Seçtiğimiz markerlar kırmızı floresans verdiğinden V2R-dendra konstrakları UV ile dönüştürülmemiş, yeşil kanaldan gelen β -arrestin ve reseptör sinyalleri ile kırmızı kanaldan gelen ER/Golgi/lizozom sinyalleri arasındaki uzaysal korelasyon, Pearson korelasyon katsayıları hesaplanarak saptanmıştır. İlgili kanallardaki hücreler elle seçilmiş ve korelasyon hesapları her bir hücre için ayrı ayrı yapılmıştır. Korelasyon katsayıları MATLAB programında hesaplanmıştır.

5.2.5 ER-Golgi-lizozom markerları

Bütün konfokal görüntüler canlı hücrede, fiksasyon işlemi yapılmadan, oda sıcaklığında ve KRH solüsyonu içinde alınmıştır. ER görüntüleri, ER boyama kiti (ab139482) kullanılarak ve bu kitin standart protokolü takip edilerek elde edilmiştir. Görüntüler boyama sonrası 20. dakikada alınmıştır. Kırmızı kanaldan alınan ER görüntüleri için He-Ne lazerin 543 nm çizgisi ile floroforlar eksite edilmiş, 560 nm ve üzerindeki dalga boyundaki emisyon şiddeti kaydedilmiştir.

Golgi görüntüleri, Golgi boyama kiti (ab269449) kullanılarak ve bu kitin standart protokolü takip edilerek elde edilmiştir. Görüntüler boyama sonrası 24. saatte alınmıştır. Kırmızı kanaldan alınan Golgi görüntüleri için He-Ne lazerin 543 nm çizgisi ile floroforlar eksite edilmiş, 560 nm ve üzerindeki dalga boyundaki emisyon şiddeti kaydedilmiştir.

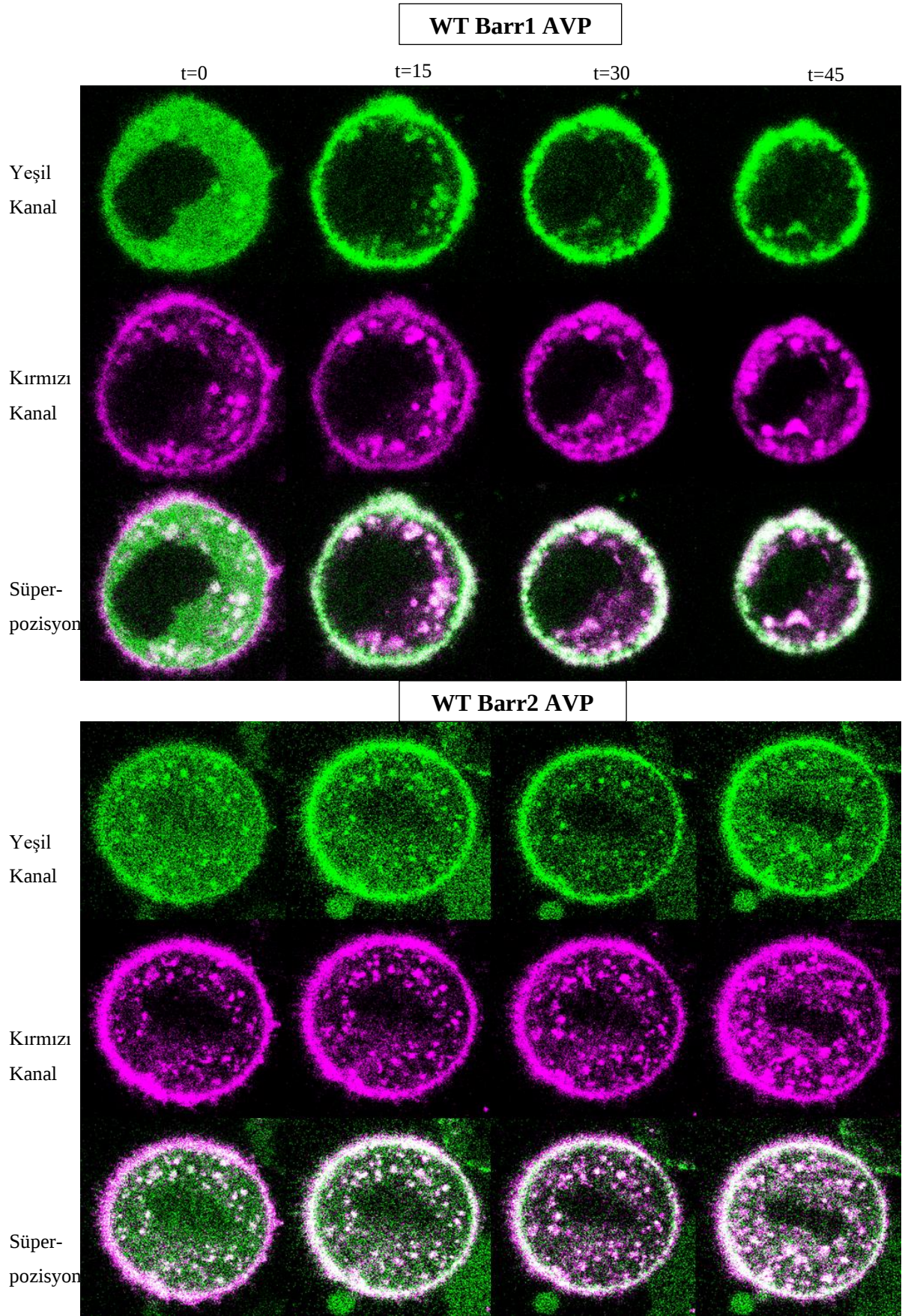
Lizozom görüntüleri, lizozom boyama kiti (ab112137) kullanılarak ve bu kitin standart protokolü uygulandığında elde edilen görüntülerde kırmızı kanal floresans yoğunluğu çok olduğundan, boyama işleminde protokolde belirtilen konsantrasyonun 1/10'u kullanılarak elde edilmiştir. Görüntüler boyama sonrası 30. dakikada alınmıştır. Kırmızı kanaldan alınan lizozom görüntüleri için He-Ne lazerin 543 nm çizgisi ile floroforlar eksite edilmiş, 560 nm ve üzerindeki dalga boyundaki emisyon şiddeti kaydedilmiştir.

6. BULGULAR

Bu çalışmada R137L/R137H/F229V V2R-dendra ve WT V2R-dendra konstraktlarını eksprese eden MEF hücre hatları kullanılmıştır. Mutant reseptörlerin hücresel dağılımına β -arrestinlerin bireysel katkılarını incelemek için β -arrestinleri kalıcı olarak silinmiş (KO) MEF hücreleri temel alınmıştır. Bu hücrelerden yola çıkılarak elde edilen β -arrestin1-rGFP veya β -arrestin2-rGFP konstraktlarını ayrı ayrı eksprese eden diziler, hem mutant reseptörlerin bu proteinlerle birlikteliğini incelemek, hem de β -arrestinlerin reseptör dağılımı üzerindeki bireysel etkilerini incelemek için kullanılmıştır. Sonuçlar WT reseptörün hücresel dağılım paternleri ile karşılaştırılmıştır. β -arrestin1/2-V2R birliktelikleri ve lokalizasyonları konfokal mikroskop ile alınan görüntüler üzerinden korelasyon katsayıları hesaplanarak değerlendirilmiştir. Korelasyon katsayıları hesaplamalarında MATLAB kullanılmıştır ve korelasyon katsayılarındaki artış, incelenen proteinlerin kolokalizasyonundaki artış olarak değerlendirilmiştir.

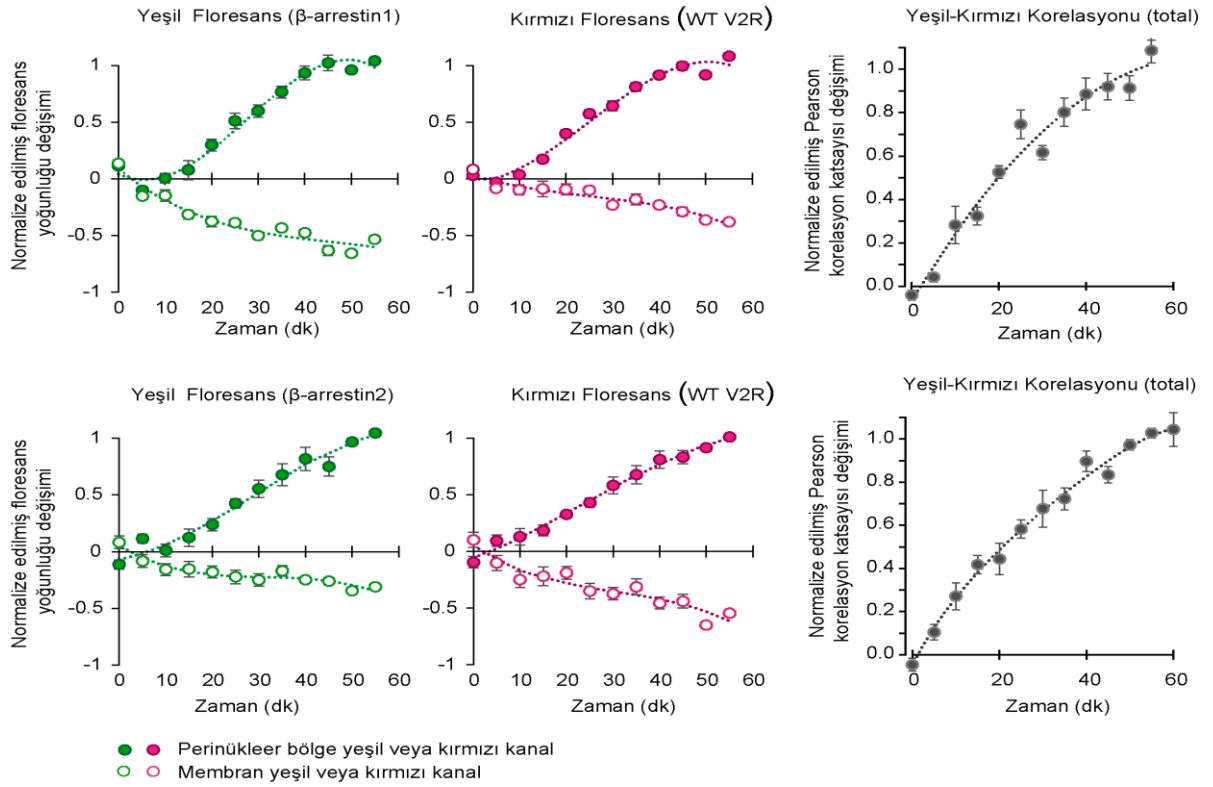
6.1 WT V2R'nin agonist uyarısı sonrası V2R'nin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile birlikteliğinin incelenmesi

Çalışma kapsamında kullanılan WT V2R'nin agonist uyarısı sonrası β -arrestin1 veya β -arrestin2 varlığında hücresel dağılımı Şekil 6.1'de görülmektedir. WT V2R-dendra ve β -arrestin1/2-rGFP eksprese eden MEF hücrelerinde, 1 μ M AVP uyarısı sonrası V2R-dendra ve β -arrestin1/2-rGFP'nin hücre içi dağılımı konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. AVP uyarısının 55 dakika boyunca sebep olduğu değişimler 5 dakikada bir görüntü alınarak incelenmiştir. Reseptörün hücresel dağılımındaki değişimi özetlemek üzere yalnızca 0. dakika, 15. dakika, 30. dakika ve 45. dakikadaki görüntüler şekilde gösterilmiştir. Sıfırıncı dakikada sitoplazmada görünen β -arrestin1/2'nin, AVP uyarısı sonrası sitoplazmadan hücre membranına doğru hareketi görülmektedir. AVP uyarısı sonrası WT reseptörlerin zamanla veziküler oluşumlar içinde hücre içine alındığı (Şekil 6.1 kırmızı kanal) ve hücre içindeki reseptörlerin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile birlikteliğinin arttığı alınan kesitlerde gözlenmektedir. Reseptör- β -arrestin1/2 kolokalizasyonunu göstermek amacıyla WT V2R ve β -arrestin1/2 eksprese eden hücrelerde yeşil ve kırmızı kanal arasında Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmış ve kırmızı kanal ile yeşil kanal arasındaki korelasyonun zamana bağlı değişimi ve WT V2R ile β -arrestin1/2'nin hücresel dağılımının zamana bağlı değişimi Şekil 6.2'de gösterilmiştir. Agonist uyarısı sonrasında hem reseptörün hem de β -arrestinlerin perinükleer bölgedeki konsantrasyonlarının arttığı, buna karşılık membran konsantrasyonlarının azaldığı ve reseptör-



Şekil 6.1 1 μ M vazopressin uyarısı sonrası WT V2R ve β -arrestin dağılımının zamana bağlı değişimi

WT V2R-dendra + β -arrestin1/2-GFP eksprese eden MEF BarrKO hücrelerinde 1 μ M Vazopressin uyarısı sonrası V2R-dendra ve β -arrestin1/2-rGFP'nin hücre içi dağılımı görülmektedir. Kırmızı kanal UV ile dönüştürülmüş V2R-dendrayı, yeşil kanal β -arrestin1/2-rGFP'yi göstermektedir.



Şekil 6.2 1 μ M AVP uyarısı sonrası floresans dağılımının zamana bağlı değişimi

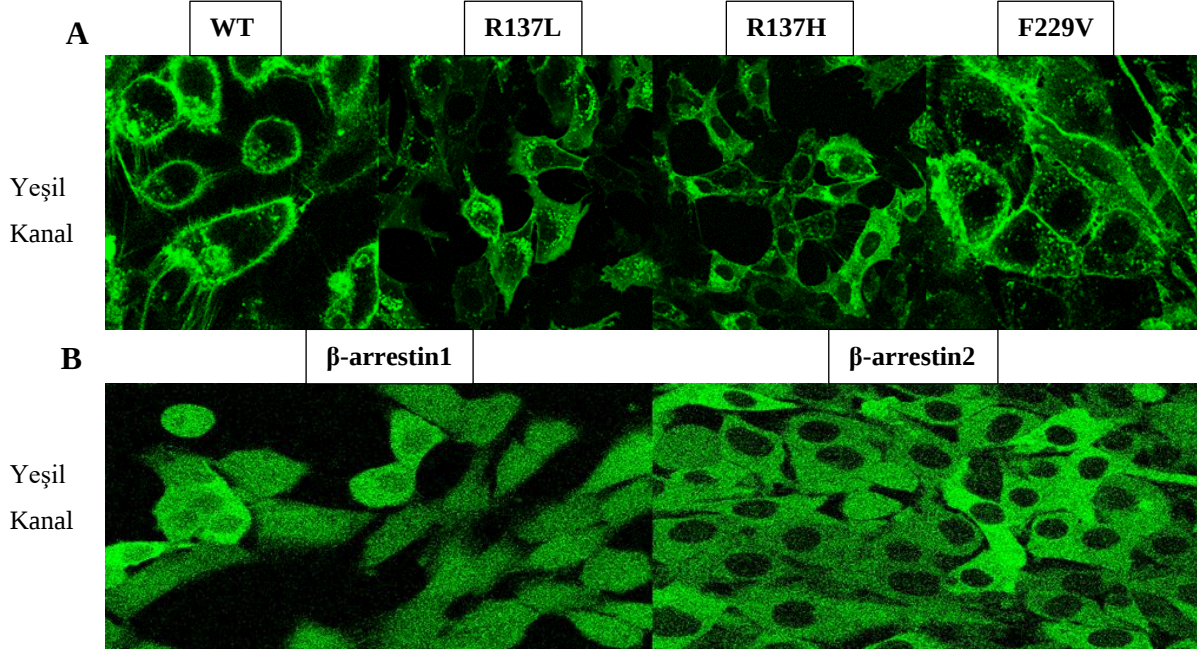
1 μ M AVP uyarısı ($t=0$) sonrası MEF hücrelerinde dendra işaretli WT V2R (kırmızı kanal) ve rGFP işaretli β -arrestin1 veya β -arrestin2'nin (yeşil kanal) hücresel dağılımının zamana bağlı değişimi görülmektedir. Şeklin ilk satırındaki veriler β -arrestin1, ikinci satırındaki veriler ise β -arrestin2 eksprese eden hücrelerden elde edilmiştir. Tüm veriler 12-17 bağımsız deneyin ortalamasıdır. Hata çizgileri ortalamaların standart hatasıdır.

β -arrestin birlikteliğinin ölçüsü olan korelasyonların zamana bağlı olarak arttığı Şekil 6.2'de gözlenmektedir.

6.2 WT ve Mutant V2R'lerin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile birlikteliğinin incelenmesi

Mutant ve WT V2R'lerin konstitütif β -arrestin birlikteliği ve bu reseptörlerin hücresel dağılımı incelenmiş, β -arrestin KO, β -arrestin1 veya β -arrestin2 eksprese eden hücrelerde reseptörlerin ve β -arrestinlerin hücresel dağılımı Şekil 6.3 ve Şekil 6.4'te gösterilmiştir. β -arrestin KO hücrelerde mutant reseptörler ile WT reseptör arasında hücresel dağılım paterni açısından bir fark gözlenmezken, bu hücrelerde reseptörlerin çoğunlukla hücre yüzeyinde eksprese olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.3A). β -arrestin1 varlığında R137 mutant V2R içeren hücrelerde belirgin olmakla beraber, perinükleer bölgede veziküler reseptör birikimleri gözlenmiştir (Şekil 6.4). Ancak bu birikimler reseptörlerin hücresel dağılımını WT'ye kıyasla büyük ölçüde değiştirmemiştir. Buna karşılık β -arrestin2 varlığında R137L ve R137H mutant V2R'lerin hücre içinde olduğu gözlenmiş, bu hücrelerde neredeyse bütün reseptörler hücre içine alındığından membran hatları seçilememiştir (Şekil 6.4). F229V-V2R'de ise β -arrestin1 veya β -arrestin2 varlığı hücresel dağılım paternini değiştirmemiş, F229V mutantı ile WT V2R

arasında dağılım paterni açısından bir fark gözlenmemiştir. Mutant reseptörlerin β -arrestin1/2 ile olan bazal kolokalizasyonu incelendiğinde (Şekil 6.5), R137L ve R137H mutantlarının β -arrestin2 için daha belirgin olmakla birlikte her iki β -arrestin ile olan bazal kolokalizasyonlarının WT'ye kıyasla arttığı gözlenmiştir.

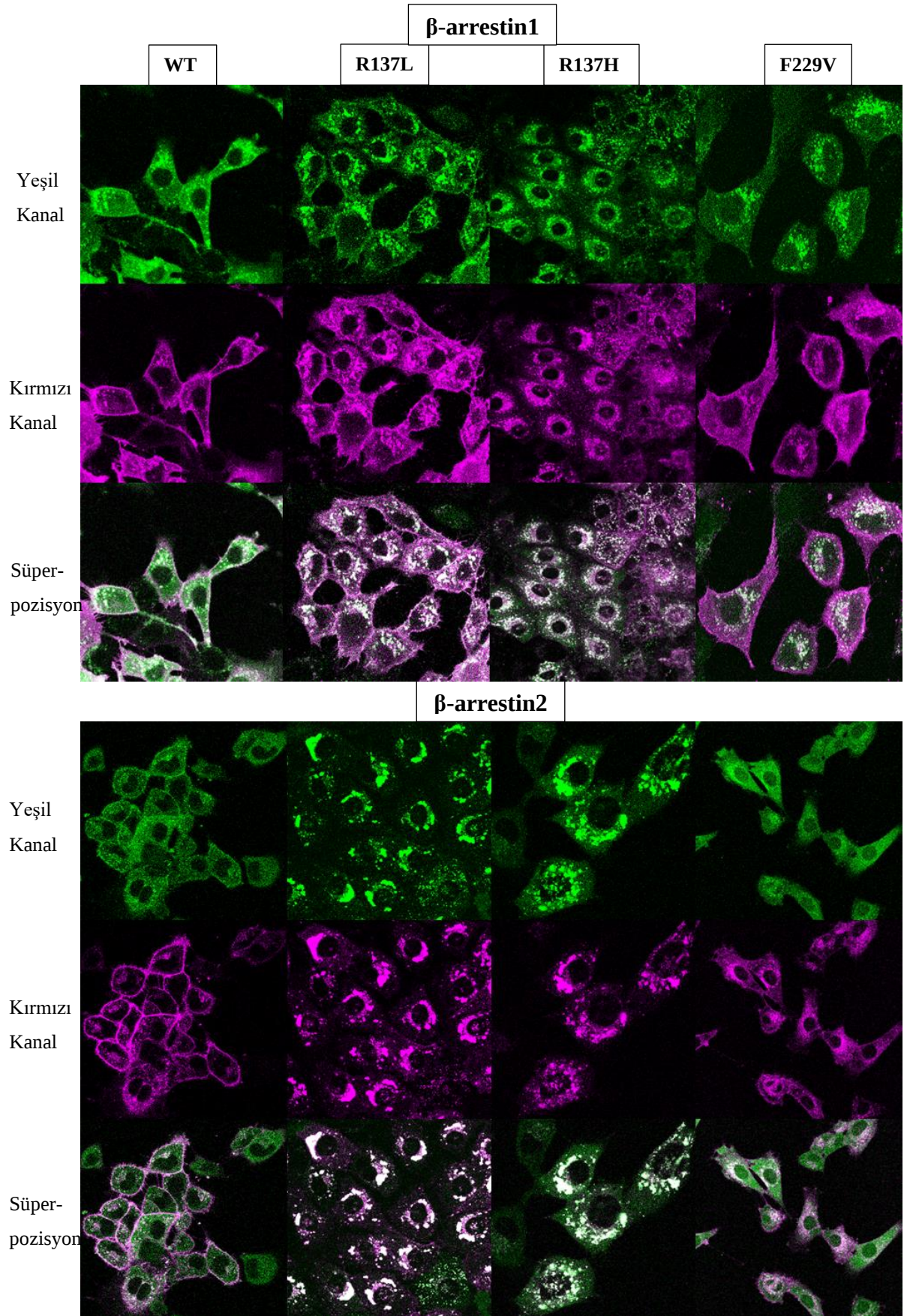


Şekil 6.3 MEF hücrelerinde V2R ve β -arrestinlerin hücresel dağılımı

Şekil A'da β -arrestin KO MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R-dendra'nın hücresel dağılımı gösterilmiştir. Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Bu hücrelerden elde edilen floresans sinyalleri reseptöre eklenmiş dendra proteininden gelmektedir. Şekil B'de β -arrestin KO MEF hücrelerine transfekte edilmiş rGFP işaretli β -arrestin1 veya β -arrestin2'nin hücresel dağılımı gösterilmiştir. Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Bu hücrelerden elde edilen floresans sinyalleri β -arrestin'e eklenmiş rGFP proteininden gelmektedir.

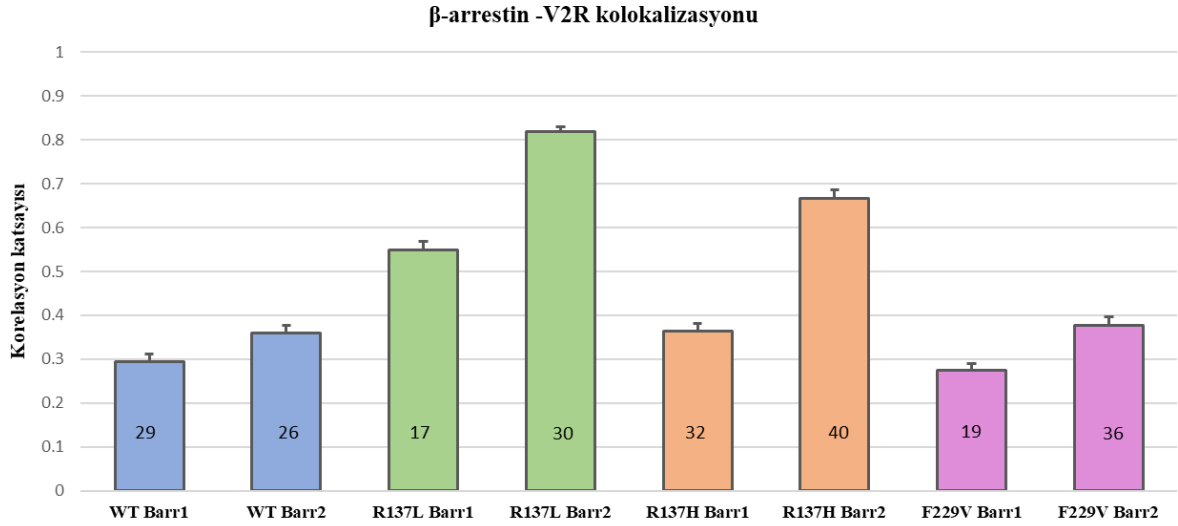
6.3 Mutant V2R'lerin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile birlikteliğinin inverse agonist varlığında incelenmesi

Genel bilgiler bölümünde belirtildiği gibi, R137L-V2R mutantının adenilat siklaz uyarısı ya da β -arrestin etkileşmesi bakımından sahip olduğu bazal aktivite invers agonistlere dirençli görünmektedir. Göreli olarak kısa bir zaman skalasını kapsayan deneylerde saptanan bu direncin, R137 mutantlarında gözlenen bazal β -arrestin1/2-reseptör kolokalizasyonundaki artışı geri çevirebilmek bakımından da geçerli olup olmadığı burada sunulan deneylerde incelenmiştir. Bu amaçla mutant V2R+ β -arrestin1/2 eksprese eden hücreler 24 saat boyunca V2R inverse agonisti olan tolvaaptan (50 nM) ile bekletilmiş ve reseptör- β -arrestin1/2 birlikteliği bu hücrelerden elde edilen konfokal mikroskop görüntülerinde değerlendirilmiştir. Alınan görüntülerin bir örneği Şekil 6.6'da gösterilmiştir. Şekil 6.7'de tolvaaptan varlığının bazal β -arrestin1/2 – V2R kolokalizasyonu üzerine ortalama etkisi sayısal olarak gösterilmiştir. Alınan



Şekil 6.4 β -arrestin1/2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R-dendra'nın hücresel dağılımı

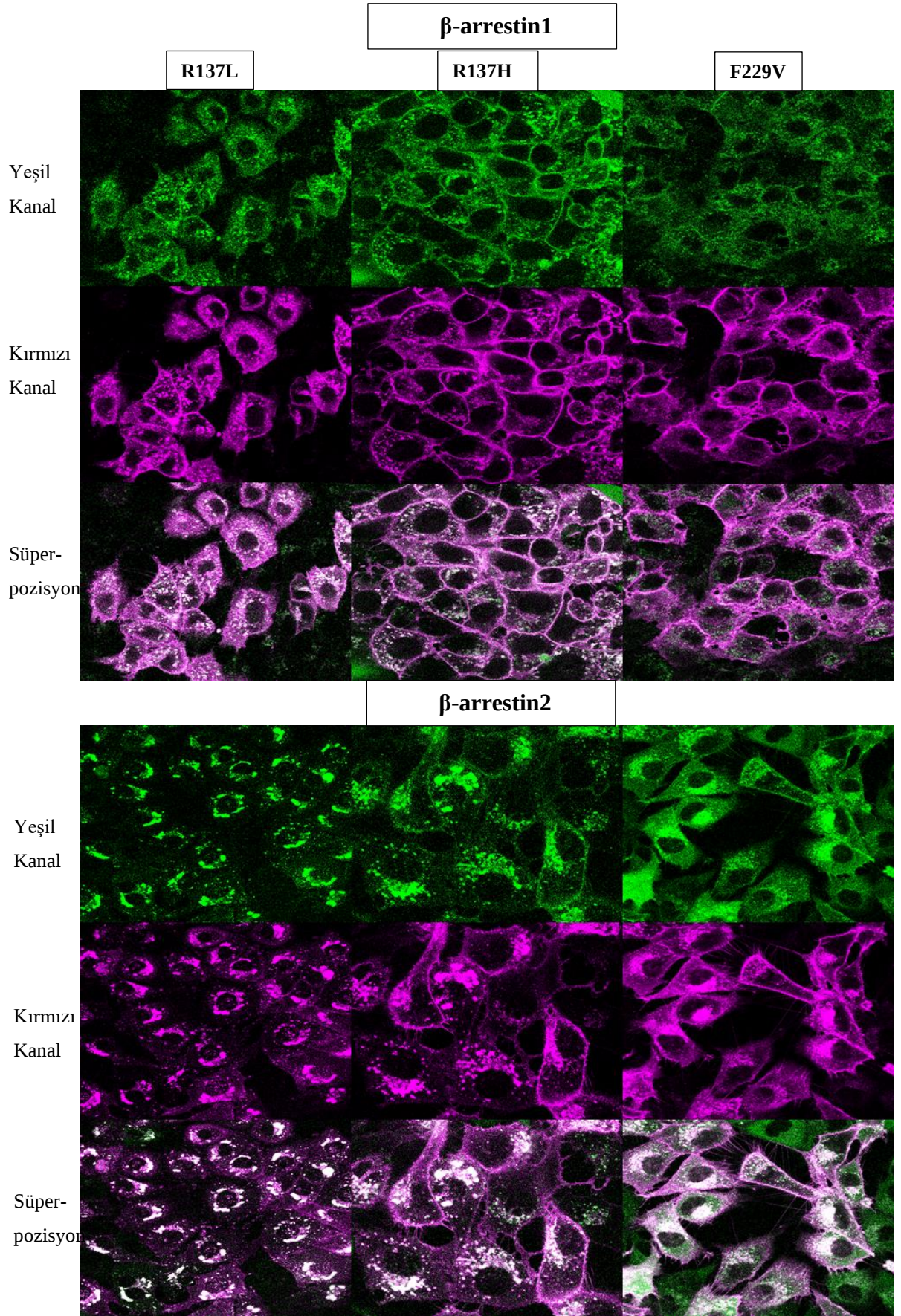
Hücrelerden alınan konfokal kesitlerinin temsili gösterimidir. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal UV ile dönüştürülmüş V2R-dendra'yı, yeşil kanal β -arrestin1/2-rGFP'yi göstermektedir. 1. Sıra β -arrestin1 eksprese eden, 2. Sıra β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R-dendra'nın hücresel dağılımını göstermektedir.



Şekil 6.5 WT/mutant V2R'lerin β -arrestin1/ β -arrestin2 kolokalizasyonu

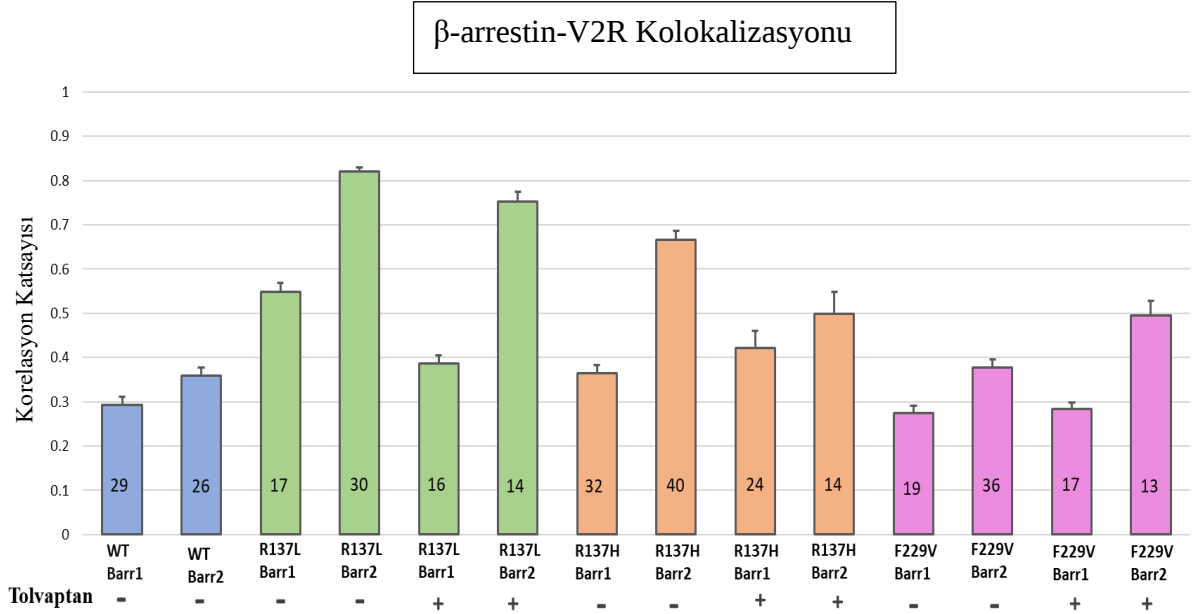
WT V2R-dendra ve mutant V2R'lerin β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile olan kolokalizasyonları (hesaplanan Pearson korelasyon katsayıları cinsinden) bar grafik olarak gösterilmiştir. Reseptör varyantları ayrı renk barlarla kodlanmıştır. Her bir hücre hattında analiz için kullanılan örneklem sayıları grafik üzerinde belirtilmiştir.

konfokal görüntülerinde tolvaptan, reseptörün hücresel dağılımını değiştirmezken, yapılan kolokalizasyon analizinde tolvaptan varlığının bütün V2R mutantlarında β -arrestin2- reseptör kolokalizasyonunu değiştirdiği, özellikle R137H mutantında bu kolokalizasyonu anlamlı ölçüde azalttığı saptanmıştır. β -arrestin1-reseptör kolokalizasyonu değerlendirildiğinde ise, R137L mutantında büyük ölçüde azalma izlenmiş olup, diğer reseptörlerde bir değişim izlenmemiştir. Bu çalışmanın temelini oluşturan ortak çalışmamız kapsamında Tommaso Costa ve ekibi tarafından yapılan deneylerde WT V2R, R137L ve F229V mutant V2R'lerde konstitütif β -arrestin2-reseptör etkileşimine tolvaptanın etkisi incelenmiştir (40). Bu çalışmalardan elde edilen Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) sonuçları Şekil 6.8'e eklenmiştir. BRET deneylerinden elde edilen sonuçlarda tolvaptanın konstitütif β -arrestin2-R137L etkileşimi üzerine bir etkisi gözlenmezken, AVP konsantrasyon yanıt eğrilerini sağa kaydırması gözlenmiştir. Bu bulgu, tolvaptan-(AVP)-reseptör etkileşmesinin bu mutantlarda sağlam olduğunu göstermektedir. Öte yandan, BRET deneylerinde tolvaptanın konstitütif β -arrestin1 V2R etkileşimi üzerine etkisi araştırılmamıştır ve bu nedenle kolokalizasyon analizlerinde görülen R137L V2R- β -arrestin1 lokalizasyonundaki azalmanın burada da devam edip etmediği değerlendirilememiştir. Aynı şekilde tolvaptan varlığında R137H mutasyonunda gözlenen β -arrestin2-reseptör kolokalizasyondaki azalma, BRET deneylerinde böyle bir veri olmadığından karşılaştırılamamıştır.



Şekil 6.6 V2R-dendra ve β -arrestin1/2'nin 24 saat 50 nM tolvaptan sonrası hücresel dağılımı

R137L-R137H ve F229V mutant V2R-dendra'nın 24 saat 50 nM tolvaptan sonrası hücresel dağılımı gösterilmiştir. 1. Sıra β -arrestin1 eksprese eden hücrelerden, 2. Sıra β -arrestin2 eksprese eden hücrelerden alınan konfokal kesitlerinin temsili gösterimidir. Gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal V2R-dendra'yı, yeşil kanal β -arrestin1/2-rGFP'yi göstermektedir.

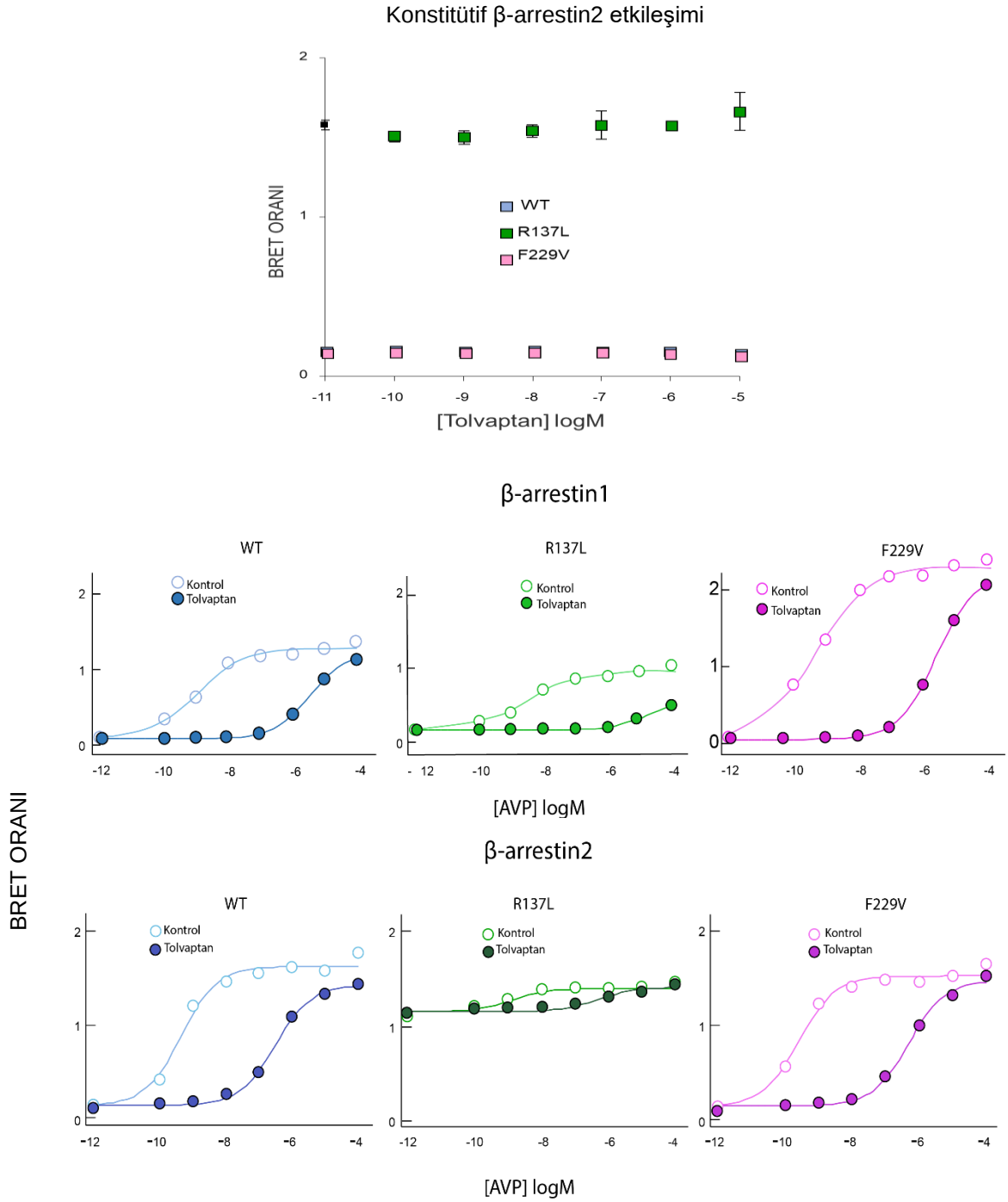


Şekil 6.7 Tolvaptan uygulaması sonrası mutant V2R- β -arrestin1/2 kolokalizasyonu

Mutant V2R'lerin 50 nM Tolvaptan uygulaması sonrası 24. saatte β -arrestin1 ve β -arrestin2 ile olan kolokalizasyonları şematize edilmiştir. Kolokalizasyonu ifade etmek için konfokal görüntülerinden Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Her bir hücre hattında analiz için kullanılan örneklem sayısı grafik üzerinde belirtilmiştir.

6.4 Mutant V2R'lerin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi

Reseptörlerin sentezinden itibaren hücre membranına çıkışı, bazal olarak ya da agonist uyarısıyla hücre içine alınması ve ardından izlediği yol reseptör trafiği olarak adlandırılmaktadır. Çalışmalarımızda R137-V2R mutantları özellikle β -arrestin2 varlığında hücre içinde izlenmiştir. Ancak R137L ve R137H mutasyonları karşılaştırıldığında hücre içi birikim paternleri arasında fark gözlenmiştir (Şekil 6.4). R137L mutantlarında hücre içindeki reseptörler büyük veziküler birikimler halinde izlenirken R137H mutantları küçük veziküllerde gözlenmiştir. Aynı zamanda bu mutantların β -arrestin1/2 birliktelikleri arasında fark gözlenmiştir. Bu reseptör mutasyonlarının birbirine zıt klinik tablolar oluşturduğu da dikkate alınacak olursa reseptörlerin hücre içi sinyal işleme mekanizmalarında etkileştikleri proteinlerin birbirinden farklı olması beklenebilir. Ancak β -arrestin1/2 birliktelikleri arasındaki fark, görülen bu değişimi açıklamada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle reseptörlerin hücre içinde nereye lokalize olduklarını aydınlatmak, reseptör sinyalleri arasındaki farkı açıklamada önemli bir basamak olarak düşünülmüştür. Bu amaçla, reseptör trafiğinde önemli rol oynayan hücre içi organellerden ER, Golgi ve lizozomdaki reseptör lokalizasyonları incelenmiştir. Mutant ve WT V2R içeren hücreler ER, Golgi ve lizozom markerları ile işaretlenmiş, sonrasında β -arrestin KO, β -arrestin1 ve β -arrestin2 eksprese eden hücrelerde bu markerlar ile reseptörler arasında Pearson korelasyonları hesaplanmıştır.

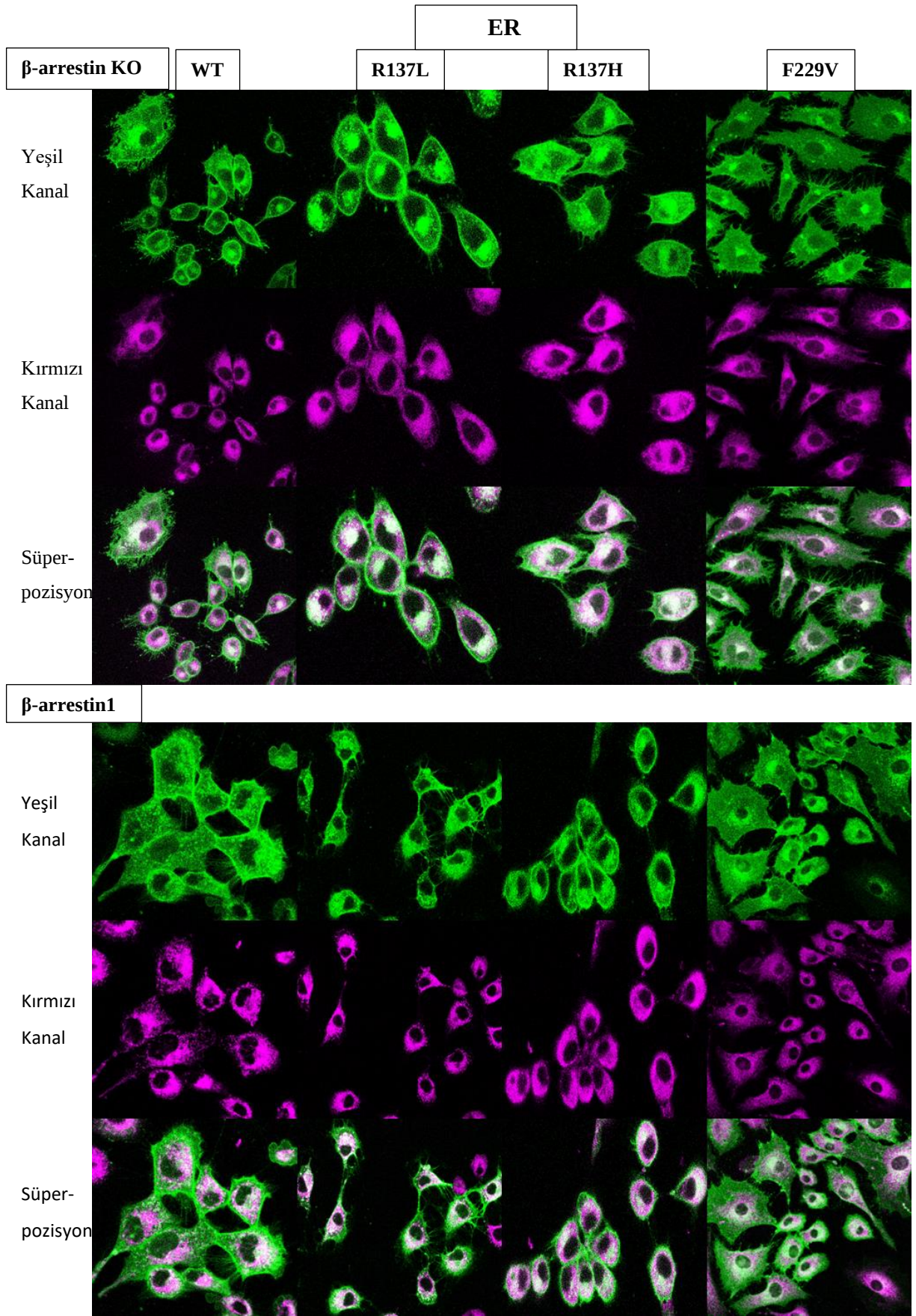


Şekil 6.8 Tolvaptanın reseptör- β -arrestin1/2 etkileşimi üzerindeki etkisi

Üstteki grafik, agonist yokluğunda, rLuc işaretli WT, R137L veya F229V mutant reseptörler ile rGFP- β -arrestin2 arasındaki bazal etkileşimi (BRET sinyali) artıran tolvaptan konsantrasyonuna karşı göstermektedir. Altındaki paneller reseptör- β -arrestin1/2 etkileşimleri, 1 μ M tolvaptan varlığında ve yokluğunda gözlenen AVP konsantrasyon cevap eğrilerini göstermektedir.

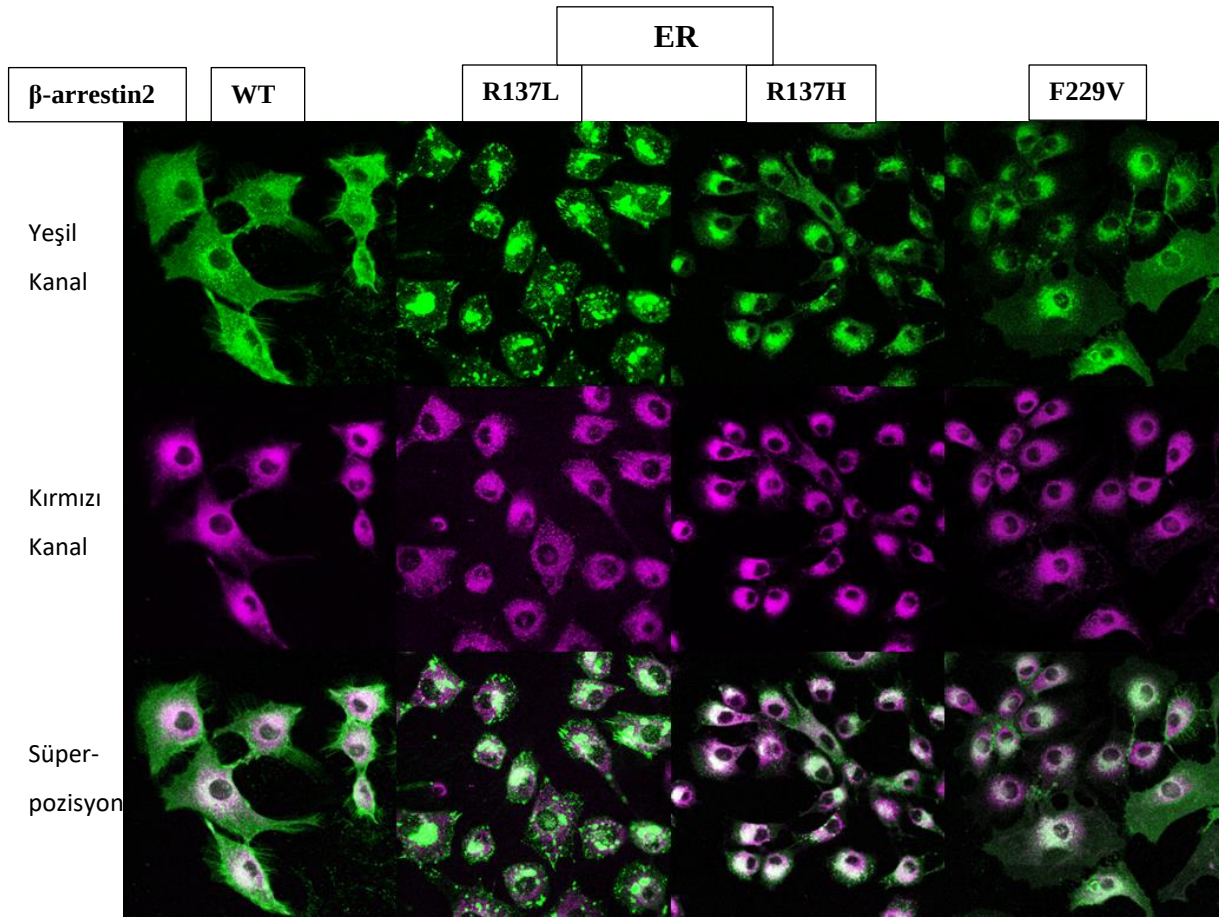
6.4.1 Mutant V2R'lerde ER lokalizasyonunun WT ile karşılaştırılması

MEF hücrelerinde, ER markerı ile hücre içinde bulunan ER görünür hale getirilmiştir. Seçtiğimiz ER markerı kırmızı floresans verdiğinden V2R-dendra konstrakları UV ile dönüştürülmemiş, yeşil kanaldan gelen β -arrestin1/2 ve reseptör sinyalleri ile kırmızı kanaldan



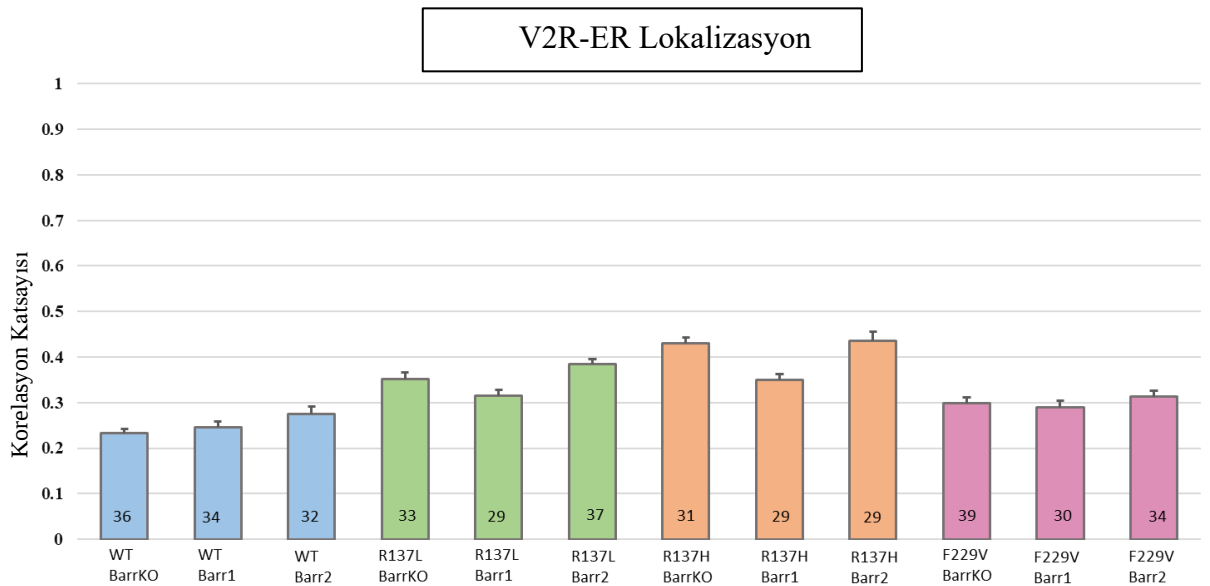
Şekil 6.9 MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin ER lokalizasyon görüntüleri

Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Kesit boyutları birbirinden farklıdır. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal ER'yi göstermektedir. 1. Satırdaki görüntüler β -arrestin1/2 KO hücrelerden elde edilmiş olup, bu hücrelerde yeşil kanal V2R'yi göstermektedir. rGFP ekli β -arrestin1 (2. Sıra) görüntülerinden gelen floresans sinyallerinde ise yeşil kanal V2R-dendra ve β -arrestin1-rGFP'yi göstermektedir.



Şekil 6.10 β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin, ER lokalizasyon görüntüleri

Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Kesit boyutları birbirinden farklıdır. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal ER'yi göstermektedir. Yeşil kanaldan elde edilen floresans sinyalleri ise V2R-dendra ve β -arrestin2-rGFP'yi göstermektedir.



Şekil 6.11 WT ve mutant V2R'lerin ER lokalizasyonu

Konfokal görüntülerinde kırmızı ve yeşil kanal arasındaki Pearson korelasyon katsayısı, lokalizasyon ölçüsü olarak kullanılmıştır. Her bir hücre hattında analiz için kullanılan örneklem sayıları grafik üzerinde belirtilmiştir.

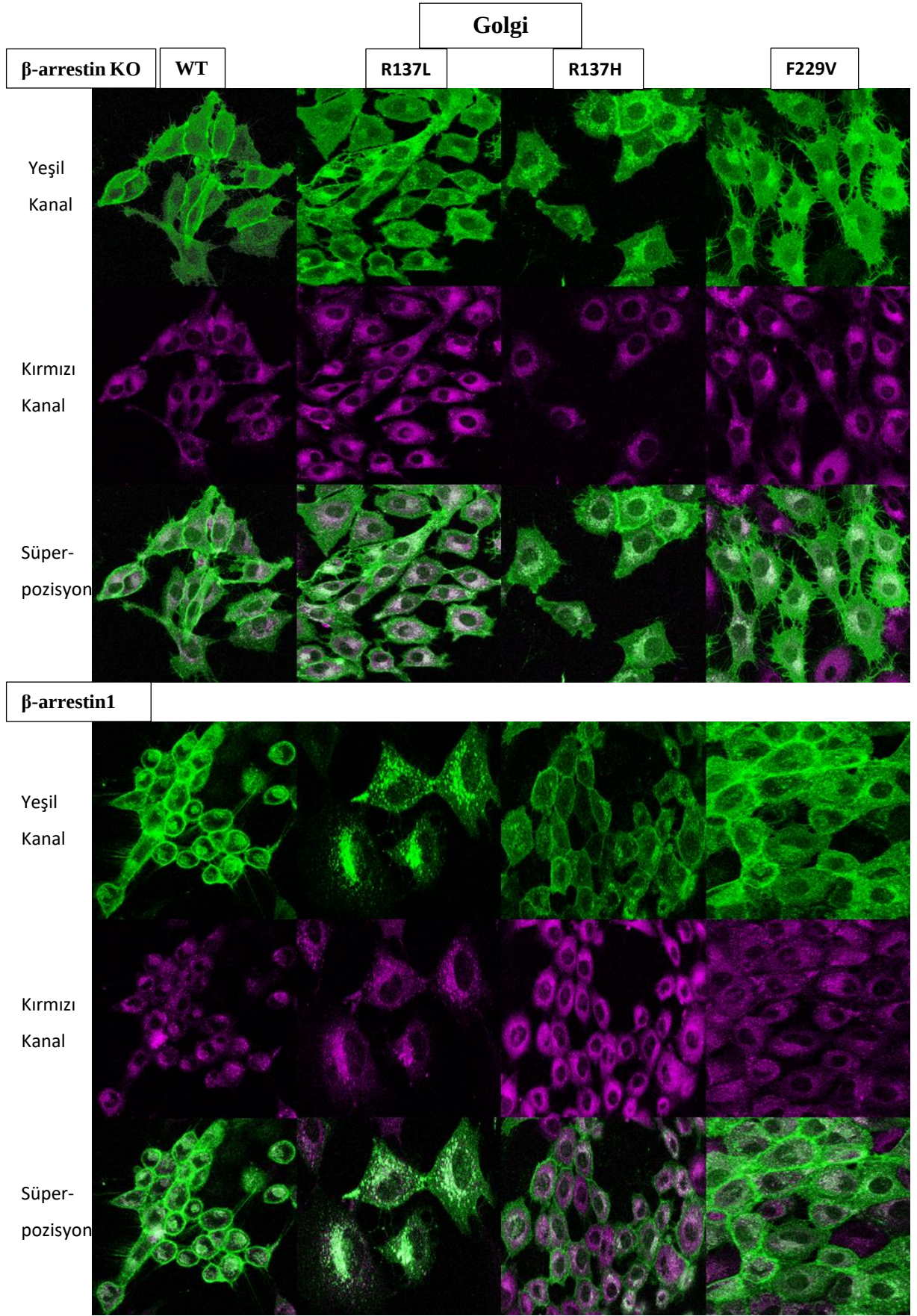
gelen ER sinyallerinin birlikteliği bu proteinlerin ER lokalizasyonu olarak değerlendirilmiştir. Alınan görüntülerden örnek kesitler Şekil 6.9 ve Şekil 6.10'da görülmektedir. Görüntüler üzerinden yapılan Pearson korelasyon analizleri Şekil 6.11'de gösterilmiştir. WT ya da mutant reseptörler β -arrestin KO hücrelerde eksprese edildiklerinde tüm mutantların ER lokalizasyonunun WT'ye göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Aynı deneyler β -arrestin1/2 eksprese eden hücrelerde tekrarlandığında ise R137 mutantlarının ER lokalizasyonu WT'ye göre artmış bulunmuştur. F229V mutantında bu bakımdan bir fark gözlenmemiştir. Mutant reseptörler kendi içerisinde değerlendirildiğinde β -arrestin1/2 ekspresyonu, aynı reseptörü eksprese eden β -arrestin KO hücrede izlenen ER lokalizasyon artışına bir katkıda bulunmamıştır.

6.4.2 Mutant V2R'lerde Golgi lokalizasyonunun WT ile karşılaştırılması

MEF hücrelerinde Golgi markerı ile hücre içinde bulunan Golgi görünür hale getirilmiştir. Seçtiğimiz Golgi markerı kırmızı floresans verdiğiinden V2R-dendra konstrakları UV ile dönüştürülmemiş, yeşil kanaldan gelen β -arrestin1/2 ve reseptör sinyalleri ile kırmızı kanaldan gelen Golgi sinyallerinin birlikteliği bu proteinlerin Golgi lokalizasyonu olarak değerlendirilmiştir. Alınan görüntülerden örnek kesitler Şekil 6.12 ve Şekil 6.13'te görülmektedir. Görüntüler üzerinden yapılan Pearson korelasyon analizlerinin sonuçları Şekil 6.14'te verilmiştir. WT ya da mutant reseptörler β -arrestin KO hücrelerde eksprese edildiklerinde Golgi lokalizasyonu bakımından R137L'de minimal bir artış izlenirken diğer reseptörler ile WT reseptör arasında herhangi bir fark gözlenmemektedir. Buna karşılık, bu hücrelere β -arrestin2 eksprese ettirilmesi R137 mutantlarının (özellikle de R137L'nin) Golgi lokalizasyonunu WT'ye göre artırırken, F229V mutantınıninkini azaltmıştır. Aynı deneyler β -arrestin1 eksprese eden hücrelerde tekrarlandığında, R137 mutantlarının Golgi lokalizasyonları birbirlerine benzer olarak izlenmiş ve WT V2R'ye göre artmış bulunmuştur.

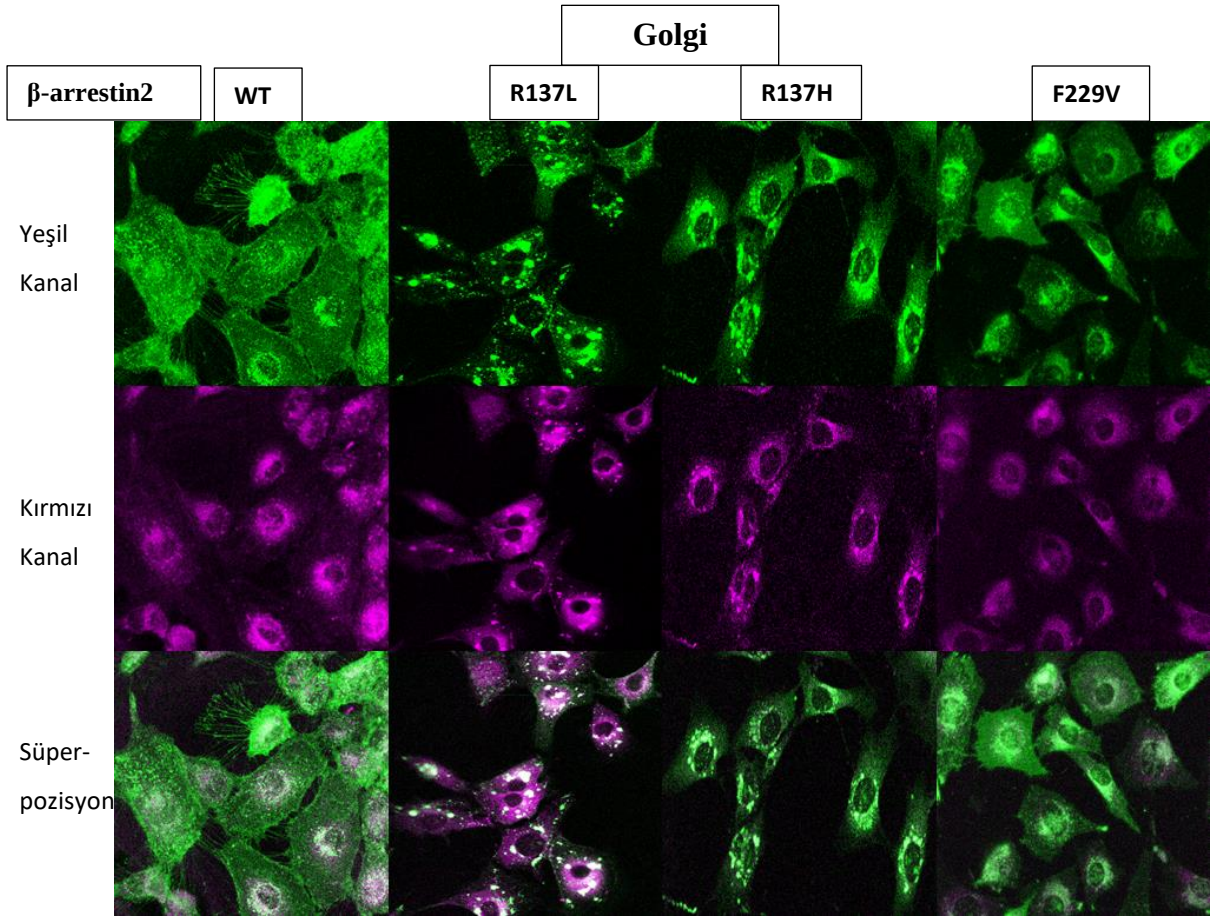
6.4.3 Mutant V2R'lerde lizozom lokalizasyonunun WT ile karşılaştırılması

MEF hücrelerinde lizozom markerı ile hücre içinde bulunan lizozom görünür hale getirilmiştir. Seçtiğimiz lizozom markerı kırmızı floresans verdiğiinden V2R-dendra konstrakları UV ile dönüştürülmemiş, yeşil kanaldan gelen β -arrestin1/2 ve reseptör sinyalleri ile kırmızı kanaldan gelen lizozom sinyallerinin birlikteliği bu proteinlerin lizozom lokalizasyonu olarak değerlendirilmiştir. Alınan görüntülerden örnek kesitler Şekil 6.15 ve Şekil 6.16'da sunulmuştur. Görüntüler üzerinden yapılan Pearson korelasyon analizlerinin sonuçları Şekil 6.17'de verilmiştir. Reseptörlerin ER ya da Golgi lokalizasyonlarının değerlendirildiği,



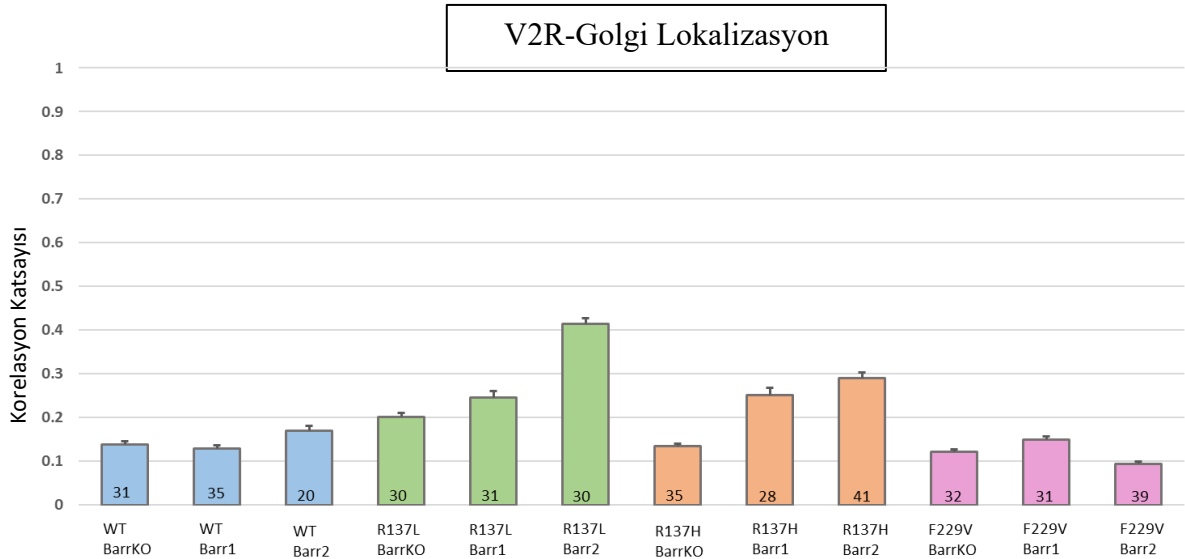
Şekil 6.12 MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin Golgi lokalizasyon görüntüleri

Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Kesit boyutları birbirinden farklıdır. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal Golgi'yi göstermektedir. 1. Satırdaki görüntüler β -arrestin1/2 KO hücrelerden elde edilmiş olup, bu hücrelerde yeşil kanal V2R'yi göstermektedir. rGFP ekli β -arrestin1 (2. Sıra) görüntülerinden gelen floresans sinyallerinde ise yeşil kanal V2R-dendra ve β -arrestin1-rGFP'yi göstermektedir.



Şekil 6.13 β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin, Golgi lokalizasyon görüntüleri

Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Kesit boyutları birbirinden farklıdır. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal Golgi'yi göstermektedir. Yeşil kanaldan elde edilen floresans sinyalleri ise V2R-dendra ve β -arrestin2-rGFP'yi göstermektedir.



Şekil 6.14 WT ve mutant V2R'lerin Golgi lokalizasyonu

Konfokal görüntülerinde kırmızı ve yeşil kanal arasındaki Pearson korelasyon katsayısı, lokalizasyon ölçüsü olarak kullanılmıştır. Her bir hücre hattında analiz için kullanılan örneklem sayıları grafik üzerinde belirtilmiştir.

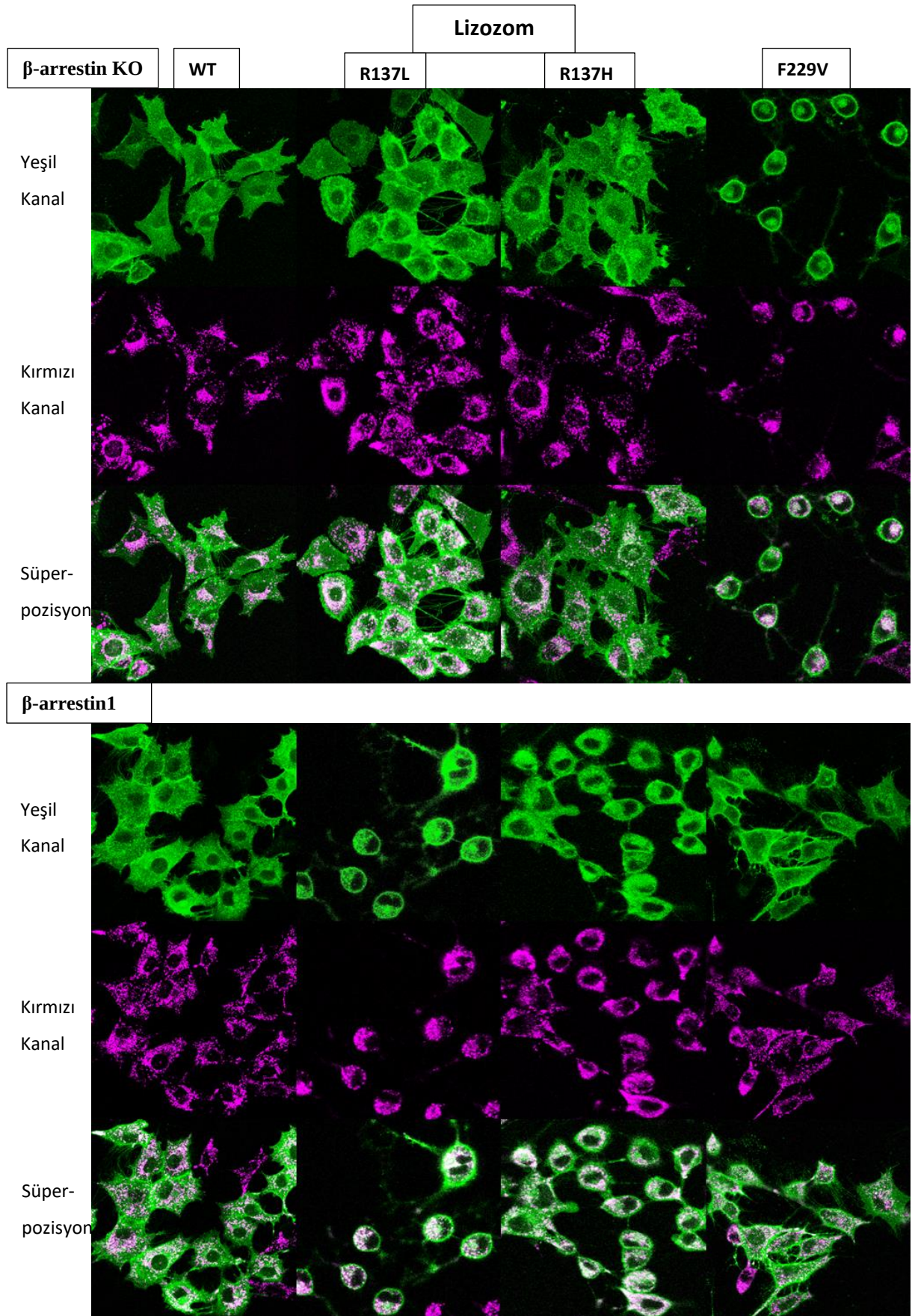
yukarıda belirtilen çalışmalarda olduğu gibi, bu çalışmalarda da reseptörlerin lizozom lokalizasyonları hem β -arrestin KO hücrelerde, hem de iki β -arrestin türünü ayrı ayrı eksprese eden hücrelerde değerlendirilmiştir. β -arrestin KO hücrelerde mutant reseptörlerin lizozom lokalizasyonu, R137L mutantında görülen hafif artışın dışında WT reseptörden farklı bulunmamıştır. Buna karşılık, özellikle β -arrestin2 eksprese eden hücrelerde tüm mutant reseptörlerin lizozom lokalizasyonları WT reseptörünkine göre artmış bulunmuştur (Şekil 6.17).

6.5 WT ve mutant V2R'lerinin hücre zarındaki difüzyon özellikleri

V2R'nin özellikle R137 bölgesindeki mutasyonların, reseptörün hücresel dağılımını belirgin bir şekilde değiştiriyor olması bu mutantların, β -arrestinler dışında bazı hücresel bileşenlerle de farklı şekilde etkileşebiliyor olma olasılığını akla getirmektedir. Hücre iskeletini oluşturan protein ağı bu etkileşimlere aday olabilir. Göreli olarak hareketsiz olan hücre iskeletiyle reseptör etkileşmesinin, reseptörün hücre zarı içindeki hareketliliğini de etkilemesi beklenir. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada reseptör mutantlarının WT'ye göre hareketliliği incelenmiştir. Bu amaçla, hareketliliğin ölçüsü olan iki boyutlu difüzyon katsayıları FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu deneylerin sonuçları Şekil 6.18'de verilmiştir. Şekil 6.18'de WT ve mutant reseptörlerin difüzyon katsayılarının birbirlerinden farklı olmadığı, ayrıca β -arrestin1 varlığının bu reseptör formlarından hiçbirinin hareketliliğini etkilemediği görülmektedir. β -arrestin2 varlığında ise R137 mutant reseptörler membranda bulunmadığından bu hücre serilerinde difüzyon katsayıları hesaplanamamıştır.

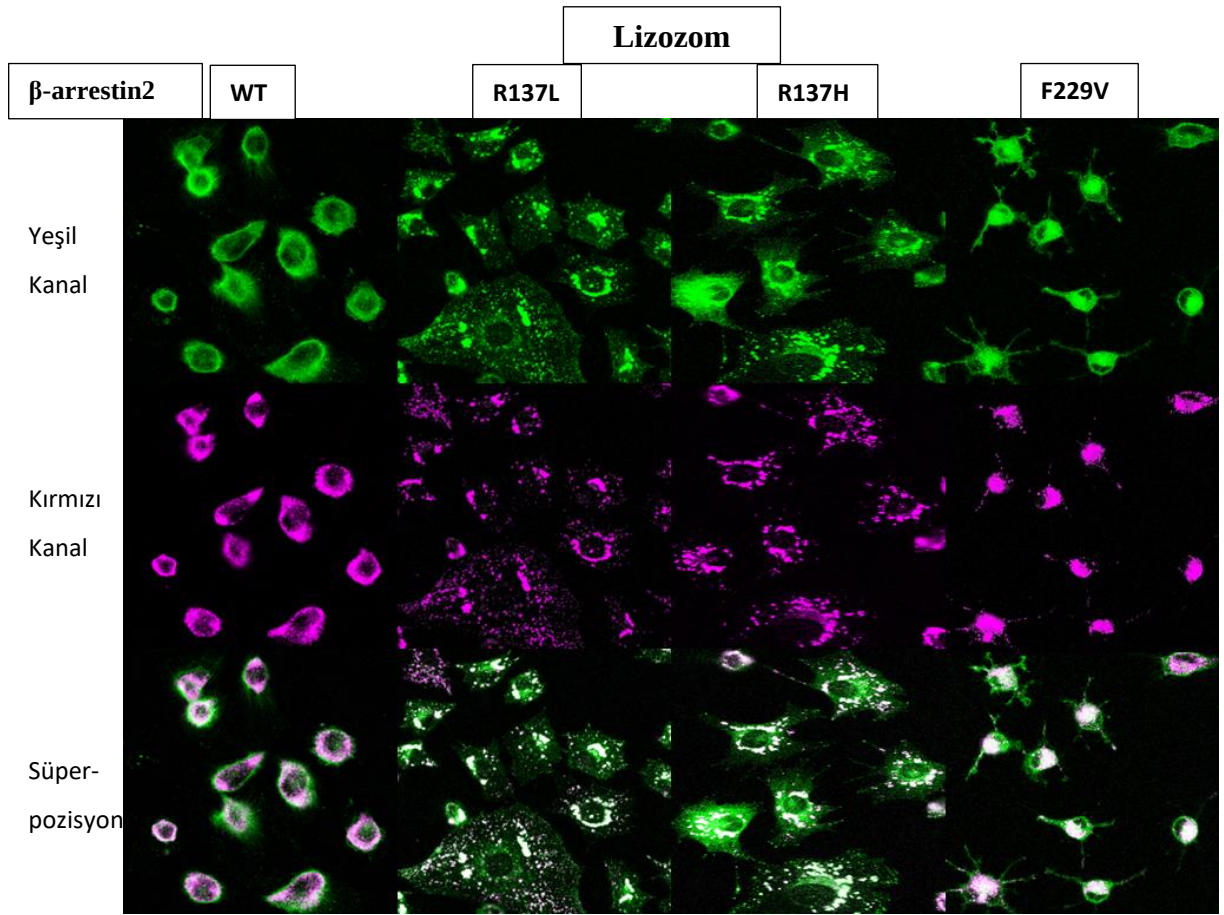
6.6 V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisi

V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisini, agonist ve inverse agonistin mutant reseptörlerdeki cAMP sinyaline etkisini ve bu reseptörlerde gözlenen cAMP sinyalinin β -arrestin'e bağımlı olup olmadığını incelemek amacıyla, Tommaso Costa'nın laboratuvarıyla yaptığımız ortak çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar Şekil 6.19, 6.20 ve 6.21'de gösterilmiştir. Bu deneyler kapsamında ilk olarak cAMP probu Glosensor F22'yi ve G α s'yi stabil bir şekilde eksprese eden 2B2 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler çeşitli V2R'leri kodlayan cDNA'larla geçici olarak transfekte edilmiş, sonrasında gözlenen bazal cAMP sinyali, AVP (1 μ M) ve forskolin (FSK, 100 μ M) uyarısı ile gerçekleşen cAMP yanıtları ve tolvaptan (1 μ M) varlığında bu yanıtların değişimi kaydedilmiştir. Boş vektör (MOCK) transfekte edilmiş hücrelerde ölçülen cAMP sinyali (lüminesans), tüm verilerden çıkarılmıştır. Yanıtlar aynı



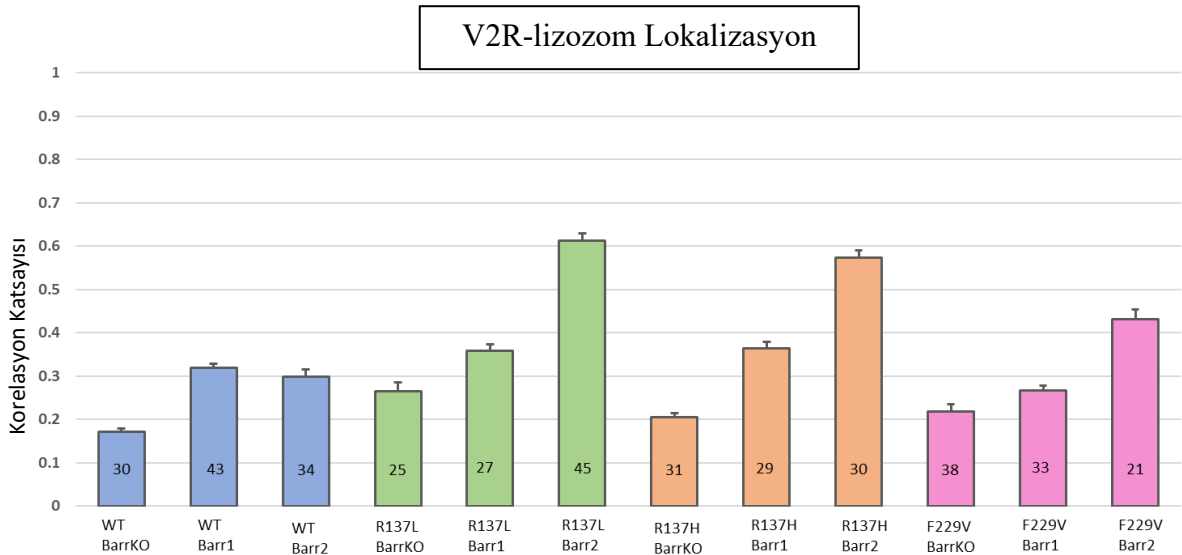
Şekil 6.15 MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin lizozom lokalizasyon görüntüleri

Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Kesit boyutları birbirinden farklıdır. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal lizozomu göstermektedir. 1. Satırdaki görüntüler β -arrestin1/2 KO hücrelerden elde edilmiş olup, bu hücrelerde yeşil kanal V2R'yi göstermektedir. rGFP ekli β -arrestin1 (2. Sıra) görüntülerinden gelen floresans sinyallerinde ise yeşil kanal V2R-dendra ve β -arrestin1-rGFP'yi göstermektedir.



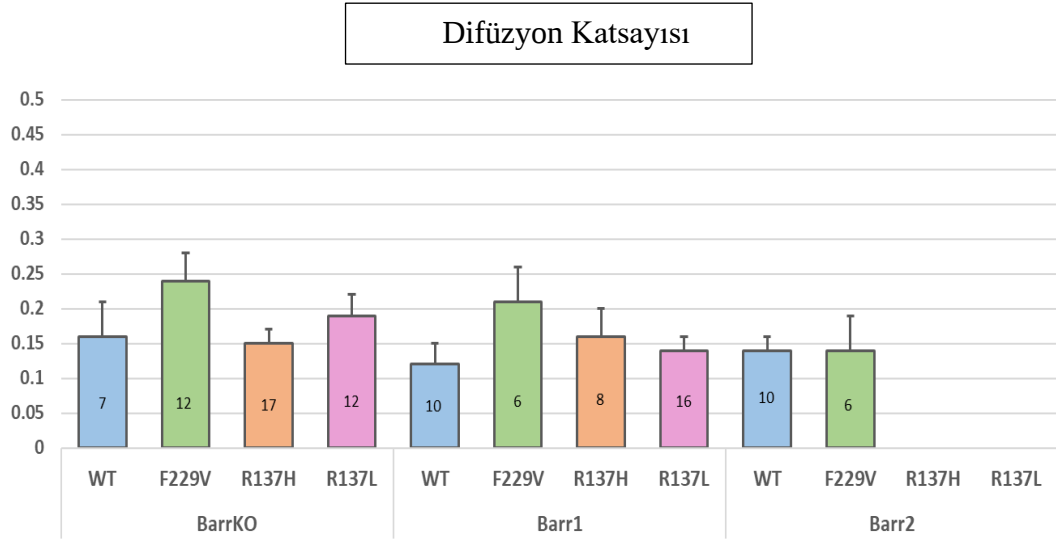
Şekil 6.16 β -arrestin2 eksprese eden MEF hücrelerinde WT ve mutant V2R'lerin, lizozom lokalizasyon görüntüleri

Görüntüler, temsili hücre gruplarının konfokal kesitleridir. Kesit boyutları birbirinden farklıdır. Görüntülerden gelen floresans sinyallerinde kırmızı kanal lizozomu göstermektedir. Yeşil kanaldan elde edilen floresans sinyalleri ise V2R-dendra ve β -arrestin2-rGFP'yi göstermektedir.



Şekil 6.17 WT ve mutant V2R'lerin lizozom lokalizasyonu

Konfokal görüntülerinde kırmızı ve yeşil kanal arasındaki Pearson korelasyon katsayısı, lokalizasyon ölçüsü olarak kullanılmıştır. Her bir hücre hattında analiz için kullanılan örneklem sayıları grafik üzerinde belirtilmiştir.



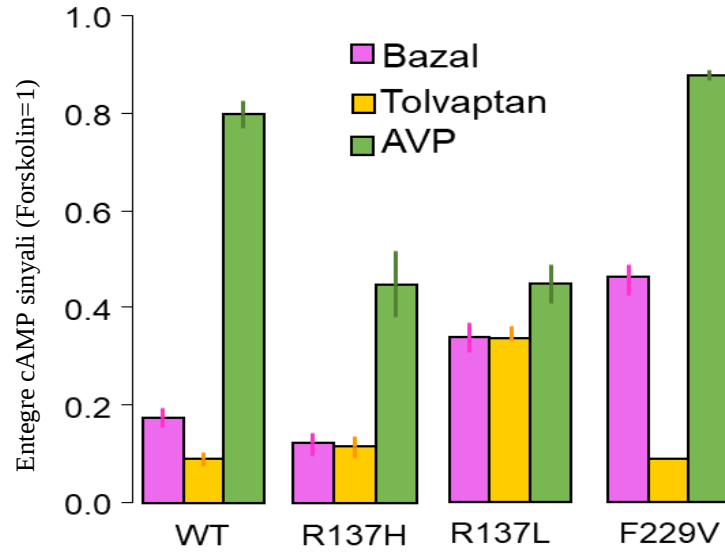
Şekil 6.18 WT ve mutant V2R difüzyon katsayıları

V2R-dendra eksprese eden MEF BarrKO hücrelerinde β -arrestin1-rGFP veya β -arrestin2-rGFP varlığında difüzyon katsayısı hesaplamaları gösterilmiştir. Hücre zarının lamele paralel gözlendiği kesitlerde cıva buhar lambasının UV-bandı kullanılarak seçilen alanda lokal (3 μ m çaplı) hücre membranlarında floresans soldurulmuş, sonrasında aynı alanda yeşil floresans dolumu birer saniye arayla kaydedilmiştir. Difüzyon katsayıları bu bölgedeki floresansın geri doluşuna bakılarak, kaydedilen bu verilerin iki boyutlu difüzyon modeline göre analiz edilmesiyle hesaplanmıştır. R137L/ β -arrestin2 ve R137H/ β -arrestin2 mutantları hücre membranında görülemediğinden difüzyon katsayıları hesaplanamamıştır.

hücrelerde FSK ile elde edilen cAMP sinyaline göre normalize edilmiştir. WT V2R ile karşılaştırıldığında, F229V'de daha belirgin olmakla birlikte R137L ve F229V mutantlarında, konstitütif cAMP sinyalinin büyük olduğu gözlenmiştir. Ek olarak, WT ile karşılaştırıldığında tüm R137 mutasyonlarında, AVP yanıtının az olduğu ve bazal cAMP sinyalinin tolvaptan ile inhibe olmadığı gözlenmiştir. Buna karşılık, F229V mutantında gözlenen AVP aracılı cAMP yanıtı WT'ye benzer olarak gözlenmiş ve artmış bazal cAMP sinyalinin tolvaptan ile güçlü bir şekilde inhibe edildiği kaydedilmiştir (Şekil 6.19).

6.6.1 Gs yokluğunda V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisi

V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisinin Gs'ye bağımlı olup olmadığını ve NSIAD'de görülen artmış cAMP sinyalinin Gs yokluğunda da var olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılan deneylerde cAMP probu Glosensor F22'yi stabil bir şekilde eksprese eden, Gs'leri kalıcı olarak silinmiş (KO) 2B2 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler V2R'leri kodlayan cDNA'lar ile geçici olarak transfecte edilerek cAMP yanıtları ölçülmüştür. cAMP yanıtları geçici transfectasyondan 48 saat sonra AVP (1 μ M) veya 100 μ M FSK varlığında, hem FSK hem AVP varlığında veya her ikisinin de yokluğunda (bazal) ölçülmüş olup, yanıtlar boş vektör transfecte edilmiş hücrelerde FSK ile elde edilen cAMP sinyaline göre normalize edilmiştir.



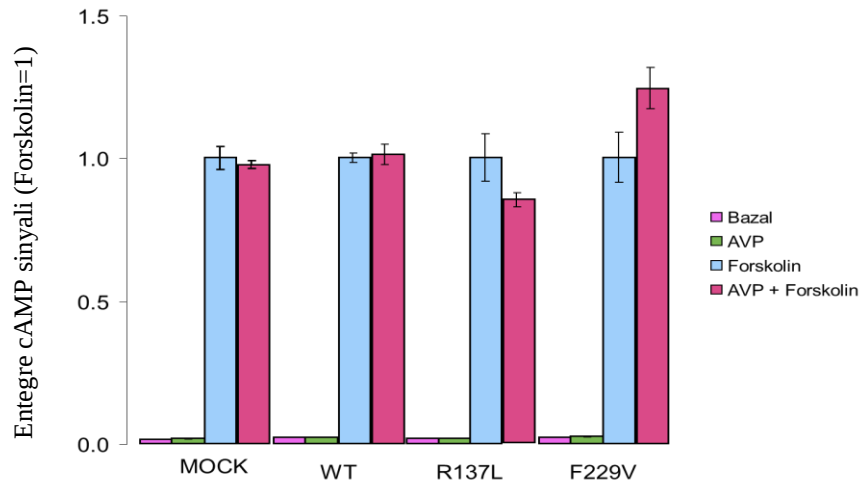
Şekil 6.19 2B2 hücrelerinde entegre cAMP yanıtı

cAMP probu Glosensor F22'yi stabil bir şekilde eksprese eden 2B2 hücrelerindeki cAMP yanıtları gösterilmiştir. İlgili hücreler V2R içeren cDNA'lar ile geçici olarak transfekte edildi, cAMP lüminesansı, AVP (1µM), FSK (100µM) veya tolvaptan (1µM) varlığında kaydedilmiştir. Boş vektörle transfekte edilmiş hücrelerde ölçülen lüminesans, tüm verilerden çıkarılmıştır. Dolayısıyla, şekilde görünen bazal aktivite, gerçekten reseptör varyantlarının bazal aktivitesini yansıtmaktadır. cAMP yanıtları, 80 dakika boyunca kaydedilen lüminesans eğrisinin altındaki alanlar üzerinden hesaplanmıştır. Elde edilen yanıtlar aynı hücrelerdeki FSK yanıtına göre normalize edilmiştir. Grafik, 3 ayrı deneyden elde edilen 9 ölçümün ortalamasını göstermektedir.

Reseptör varyantlarıyla (WT, R137L veya F229V) geçici olarak transfekte edilmiş 2B2 hücrelerinde bazal cAMP sinyali birbirlerine benzer olarak gözlenmiş, NSIAD'ye sebep olan mutant reseptörlerde, yüksek olduğu bilinen bazal cAMP sinyali ise Gs yokluğunda gözlenmemiştir. Aynı şekilde AVP, mutant ve WT V2R'lerde gözlenen bazal cAMP sinyalini değiştirmemiştir (Şekil 6.20).

6.6.2 β-arrestin yokluğunda V2R mutasyonlarının cAMP sinyali üzerindeki etkisi

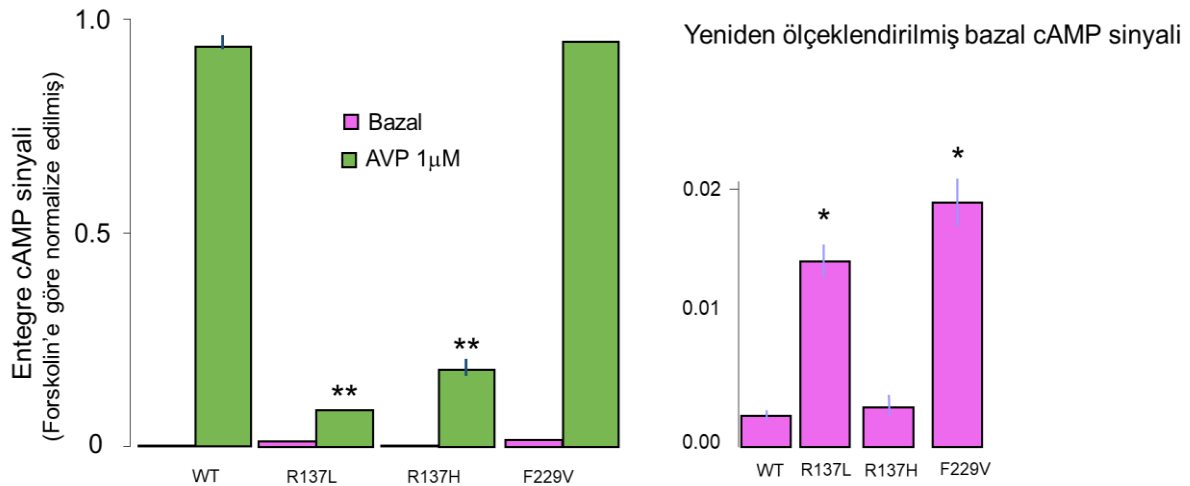
R137L/H mutasyonlarında görülen konstitütif β-arrestin etkileşiminin cAMP sinyaline katkıda bulunup bulunmadığını araştırmak ve yüksek bazal cAMP sinyali görülen mutant V2R'lerde β-arrestin yokluğunda cAMP sinyaline ne olduğunu gözlemek amacıyla yapılan deneylerde cAMP probu Glosensor F22'yi stabil bir şekilde eksprese eden, β-arrestin KO MEF hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler V2R'leri kodlayan cDNA'lar ile geçici olarak transfekte edilerek cAMP yanıtları ölçülmüştür. Bazal cAMP sinyali, AVP (1µM) ve FSK (100 µM) uyarısı ile gerçekleşen cAMP yanıtları kaydedilmiştir. Boş vektör transfeksiyonu ile elde edilen yanıtlar tüm yanıtlardan çıkarmıştır. Yanıtlar aynı hücrelerde FSK ile elde edilen cAMP sinyaline göre normalize edilmiştir. MEF hücrelerinde gözlenen düşük miktardaki endojen Gs ekspresyonu nedeni ile cAMP yanıtları, Gs transfekte edilmiş 2B2 hücrelerindeki



Şekil 6.20 Gs KO 2B2 hücrelerinde entegre cAMP yanıtı

cAMP probu Glosensor F22'yi stabil bir şekilde eksprese eden Gs KO 2B2 hücreleri, V2R veya boş vektörle geçici olarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra cAMP lüminesansı, AVP (1 μ M), FSK (100 μ M) veya hem AVP hem de FSK yokluğunda (bazal) veya varlığında kaydedilmiştir. cAMP yanıtları, 80 dakika boyunca kaydedilen lüminesans eğrisinin altındaki alanlar üzerinden hesaplanmıştır. Yanıtlar boş vektör transfekte edilmiş hücrelerde FSK ile elde edilen yanıtla göre normalize edilmiştir.

kadar belirgin değildir. Ancak gözlenen cAMP sinyal paternleri Şekil 6.19 ile birebir aynıdır. WT V2R ile karşılaştırıldığında F229V ve R137L mutantlarında bazal cAMP sinyali daha büyükken, R137H mutasyonunda bazal cAMP yanıtı WT'ye benzer bulunmuştur. AVP aracılı cAMP yanıtı ise, F229V ve WT reseptörlerinde benzerken, R137 mutasyonlarında azalmış olarak gözlenmiştir (Şekil 6.21).



Şekil 6.21 β -arrestin KO MEF hücrelerinde bazal ve AVP ile indüklenen cAMP sinyali

Glosensor F22'yi stabil bir şekilde eksprese eden β -arrestin KO MEF hücrelerinde bazal ve AVP ile indüklenen cAMP birikimi gösterilmektedir. WT veya mutant V2R ile geçici transfeksiyon sonrası cAMP sinyali, AVP (1 μ M) varlığında ve yokluğunda kaydedilmiştir. cAMP yanıtları, 80 dakika boyunca kaydedilen lüminesans eğrisinin altındaki alanlar üzerinden hesaplanmıştır. Boş vektör transfeksiyonu ile elde edilen yanıtlar total yanıtından çıkarmıştır. Yanıtlar aynı hücrelerde ölçülen FSK yanıtının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Veriler 3 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir.

7. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında ilk olarak R137L, R137H ve F229V V2R mutantlarının β -arrestin1 ve β -arrestin2 aracılı internalizasyonları değerlendirilmiş ve hücresel dağılım paternleri WT V2R ile karşılaştırılmıştır. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar, invers agoniste yanıt vermeyen R137 mutasyonlarının, yanıt veren mutantlardan farklı olarak, konstitütif β -arrestin2 etkileşimlerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, aynı etkileşimin β -arrestin1 için geçerli olup olmadığı nadiren araştırma konusu olmuş ve tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. R137 mutantları- β -arrestin1 etkileşimlerini inceleyen bir çalışmada konstitütif β -arrestin1 etkileşimini incelemek için iki farklı BRET donör/alıcı konfigürasyonu kullanılmış, konstitütif etkileşim bir konfigürasyonda tespit edilmişken diğerinde böyle bir etkileşim bulunamamıştır (38). Ayrıca daha önceki çalışmalarda aynı deney düzeneği içinde V2R mutantları ile β -arrestin1 veya β -arrestin2 etkileşiminin yan yana karşılaştırması yapılmamıştır. Bu tez çalışması iki aşamadan oluşmaktadır; ilk aşamada, ortak çalışmalarımız ve burada sunduğumuz çalışmalar kapsamında V2R mutantlarının β -arrestin1/2 ile etkileşimleri WT V2R ile karşılaştırılmış ve reseptörlerin β -arrestin1/2 etkileşimleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. İkinci aşama ise hücre içine sekestre oldukları gözlenen mutantların nereye sekestre olduklarını saptamak ve reseptörün hücresel trafiğini aydınlatmak üzere yaptığımız çalışmaları içermektedir.

β -ARRESTİN BİRLİKTELİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burada yaptığımız kolokalizasyon deneyleri BRET sonuçları gibi protein-protein etkileşimini göstermekten ziyade, reseptör β -arrestin lokalizasyonlarının birlikteliğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar R137 mutantlarının β -arrestin1/2 birliktelikleri arasında büyük bir fark olduğunu, bu mutantların β -arrestin2 birlikteliklerinin çok daha yüksek olduğunu açıkça göstermektedir. β -arrestin2 varlığında R137L ve R137H mutantlarının veziküler yapılar içerisinde internalize oldukları gözlenmektedir. Yapılan kolokalizasyon hesaplamaları ise bize R137 mutantlarının veziküler yapılar içerisinde β -arrestin2 ile birlikte olduğunu düşündürmektedir (Şekil 6.5). R137 mutasyonların ikisinde de β -arrestin2 etkileşiminin WT'ye göre yüksek olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir ki bizim bulgularımız da bu literatür bilgisini desteklemektedir (39). R137 mutasyonlarının β -arrestin1 ile olan birlikteliğine baktığımızda ise, WT'ye göre yalnızca küçük bir miktarda artış tespit edilmiştir. Bu lokalizasyon birliktelikleri ortak çalışmamızdaki BRET sonuçları ile uyumludur (40).

Şekil 6.4 ve 6.5'teki sonuçlar R137 mutantlarının spontan endositozuna yol açmak bakımından β -arrestin2'nin, β -arrestin1'den çok daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu mutantlar, β -

arrestin2 eksprese eden hücrelerde büyük hücre içi kümeler halinde bir sekestrasyona uğrarken, β -arrestin1 eksprese eden hücrelerde sadece hafif bir endositoz artışı gözlenmektedir. Ek olarak β -arrestin2 eksprese eden hücrelerde R137 mutantlarının hücresel dağılım paterni, AVP aracılı gerçekleşen fizyolojik reseptör internalizasyonunda izlenen paternden oldukça farklıdır. Ancak bu farka yol açabilecek mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. NSIAD'ye sebep olan R137L mutantının konstitütif β -arrestin2 etkileşimi özellikle merak uyandırmaktadır zira β -arrestin etkileşiminin GPCR aracılı sinyal iletimi üzerine negatif etkisi olması beklenmektedir. Oysa bu mutantlarda WT reseptöre göre artmış konstitütif β -arrestin2 etkileşimine rağmen bazal hücre içi cAMP birikiminde artış gözlenmektedir. (36). Özellikle R137L V2R mutantlarında görülen konstitütif β -arrestin2 etkileşimi ve beraberinde görülen yüksek cAMP miktarının nedenin, hücre içinde bulunan mutant reseptörlerin internalize olurken Gs, β -arrestin ve adenilat siklaz ile birlikte 'megapleks' adı verilen kompleksler içinde internalize olmasından ve burada cAMP sinyali oluşturmaya devam etmesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Bu konu daha detaylı olarak aşağıda " β -arrestin ve Gs'nin cAMP yanıtına katkısı" başlığında tartışılmıştır.

LİGAND YANITININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmanın ilk aşamasında R137 mutantlarının AVP aracılı β -arrestin2 ve β -arrestin1 etkileşiminin benzer olduğunu gözlemlemiştik (40). R137 mutantlarında konstitütif olarak gözlenen β -arrestin2 seçiciliğinin, agonist varlığında kaybolduğunu saptamıştık. Ayrıca R137L mutantında gözlenen konstitütif cAMP sinyalinin ve konstitütif β -arrestin2 etkileşiminin invers agonist ile inhibe olmadığını saptamıştık. Ek olarak R137 mutantlarında agonist aracılı cAMP sinyalinin ve β -arrestin1/2 etkileşiminin WT'ye kıyasla azaldığını gözlemiştik. Tersine, aynı çalışmada agonist varlığında F229V mutasyonunun, hem β -arrestin2 hem de β -arrestin1 ile etkileşimlerinin WT V2R'ye kıyasla gözle görülür bir şekilde arttığı saptanmış ve aynı artış cAMP yanıtında gözlenmemiştir. Bu çalışma ile R137 mutantlarında ligand kontrolünde belirgin bir bozulma olduğunu ortaya konmuştur (40). Tez çalışmamızda Şekil 6.7'de gözlemlediğimiz R137L mutantının β -arrestin1 ile olan kolokalizasyonunun tolvaptan varlığında belirgin olarak azalması, β -arrestin1 V2R etkileşimine dair bir bilgi vermemektedir. Tolvaptanın konstitütif β -arrestin1 etkileşimi üzerine etkisi hakkında önceki çalışmalarımızda ve başka hiçbir çalışmada veri bulunmamaktadır. Lokalizasyon azalışının etkileşimdeki azalmadan kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlamak için ek deneylere ihtiyaç vardır. R137H mutantında gözlenen konstitütif β -arrestin2 etkileşimine gelince, bu konuda yapılan en detaylı çalışma SR49059 adı verilen bir vazopressin reseptör antagonistinin β -arrestin2 R137H V2R etkileşimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmadır. Bu çalışmada antagonistin etkisi, konfokal mikroskopta reseptör β -arrestin2 kolokalizasyonu üzerinden değerlendirilmiş ve gözle

görülür bir etkisi olmadığı izlenmiştir. Aynı deneyde reseptör β -arrestin2 etkileşimi BRET sinyali ile incelenmiş ve SR49059 antagonistinin BRET sinyalini hafif miktarda artırdığı gözlenmiştir (41). Başka bir çalışmada ise OP4 (tolvaptan) varlığında R137H mutasyonunda membran ekspresyonunun arttığı gözlenmiş ve bunun OP4'ün farmakolojik şaperon etkisi göstermesinden kaynaklanabileceği iddia edilmiştir (42). Bizim yaptığımız deneylerde tolvaptanın membran ekspresyonunu minimal düzeyde arttırdığı gözlenmektedir. Tolvaptanın membran ekspresyonu üzerindeki etkisi, β -arrestin2 reseptör etkileşiminin azalması sonucunda reseptörün konstitütif internalizasyonunun azalmasından kaynaklanabilir. Her ne kadar Şekil 6.7'deki sonuçlarda β -arrestin2- R137H V2R kolokalizasyonun tolvaptan varlığında azaldığı izlense de bu durumun reseptör β -arrestin2 etkileşiminden kaynaklanıp kaynaklanmadığının anlaşılması için BRET deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır.

β -ARRESTİN VE Gs'İN cAMP YANITINA KATKISI

GPCR sinyalinin yalnızca plazma zarında meydana geldiğine dair klasik görüş, son yıllarda yapılan çalışmalar ile GPCR'lerin erken endozomlar ve Golgi/trans-Golgi ağı dahil olmak üzere hücre içi bölgelerde sinyal üretebildiğini gösteren çalışmalar ile sorgulanmıştır (43). Gerçekten de paratiroid hormon reseptörü (44), β 2-adrenerjik reseptör (45), nörokinin 1 reseptörü (46) ve kalsitonin geni ile ilişkili peptit reseptörleri (47) dahil olmak üzere birçok GPCR'nin endozomlar içerisine alındığı ve burada hedef moleküllerini uyarmaya devam ettikleri gösterilmiştir. V2R'lerin de β -arrestin aracılı internalizasyonu sonrası internalize olduğu endozomlar içerisinde Gs ve β -arrestin ile kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. İnternalize olan bu V2R-Gs- β -arrestin kompleksine “megapleks” adı verilmiştir. Agonist aracılı cAMP yanıtının, sadece membranda bulunan reseptörlere bağlanan invers agonistler ile tamamen inhibe edilememesi nedeniyle, cAMP sinyalinin bir kısmının bu kompleks içerisinde üretildiği öne sürülmüştür (48). V2R'lerde gözlenen bu durum özellikle R137C/L V2R mutantlarında görülen konstitütif β -arrestin2 etkileşimi ve beraberinde görülen yüksek cAMP miktarının nedenin, hücre içinde bu mutant reseptörlerin ‘megapleks’ kompleksi oluşturması ve burada Gs+adenilat siklaz aktivasyonuna sebep olması olasılığını akla getirmiştir. Ayrıca bu mutantlarda görülen ligand duyarlılığındaki azalmanın, mutantların konstitütif internalizasyonları neticesinde membran ekspresyonlarının azalması ve ligandların reseptöre sınırlı erişiminden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, yaptığımız çalışmalarda R137 mutantlarının plazma zarında olduğu ve internalize olmadıkları β -arrestin KO hücre serilerinde, bazal cAMP sinyal paterninin korunuyor olması ve reseptörler membranda bulunmasına rağmen, ligand duyarlılığı kaybının görülmeye devam etmesi bu olasılığı bertaraf etmektedir. Şekil 6.20 ve 6.21'deki verilerden anlaşılmaktadır ki; bazal cAMP

sinyalinin oluşabilmesi için reseptör ve Gs varlığı gereklidir ve Gs varlığında β -arrestin olmaksızın bu reseptörler bazal aktivite gösterebilmektedir. Bu durum, ligand duyarlılığındaki azalma ve invers agonistlere yanıtızılığın, farklılaşmış hücre içi trafikten değil, mutasyona uğramış reseptörlerin moleküler özelliklerinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, R137 mutasyonlarında β -arrestin2 ve β -arrestin1 arasındaki yapısal BRET sinyallerindeki önemli farkın bir başka olası açıklaması, β -arrestinlerin endositoz sonrası reseptörleri farklı hücresel trafik yollarına sokması olabilir. Örneğın; β -arrestin1, reseptörün hızlıca β -arrestin'den ayrıldığı ve membrana yeniden yerleştirildiğı endozomal kompartmana yönlendirirken, β -arrestin2, reseptörü, protein komplekslerinin daha uzun süreli endositozuna sebep olan ve reseptör- β -arrestin yakınlığının çok daha uzun sürebildiğı veziküler bir bölmeye yönlendirebilir. Bu durumda büyük bir BRET sinyal farkı oluşacaktır. Yapılan bir çalışma, R137 mutantlarının hücresel dağılımlarının, endositoz sonrası membrana geri dönmeyen vezikülerin tipik belirteçleri ile örtüşüğünü ileri sürmektedir (32).

MUTANT RESEPTÖRLERİN HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yöntem ve bulgular bölümünde açıklandığı gibi, V2R- β -arrestin'in organellerdeki lokalizasyonunu saptamak için, kırmızı floresans veren organel markerları ile yeşil floresans veren (dendra ya da rGFP ile işaretlenmiş) reseptör ya da β -arrestin floresansları arasındaki spasyal korelasyon katsayıları kullanılmıştır. Bu deneylerde yeşil floresans kaynağı olan β -arrestinlerin reseptörden farklı olarak sitoplazmada diffüz-homojen bir şekilde bulunabildiğı göz önüne alınırsa, arka planda bulunan bu β -arrestin fraksiyonunun da hesaplanan korelasyon katsayılarına katkısının olacağı düşünülebilir. Ancak WT reseptör ve β -arrestin'i birlikte eksprese eden hücrelerde hesaplanan bu korelasyon katsayıları, β -arrestin KO, WT V2R eksprese eden hücrelerle kıyaslandığında görüldüğü üzere bu katkı minimal düzeydedir. Ayrıca mutant reseptörle birlikte β -arrestin eksprese eden hücrelerde görülen korelasyon katsayısındaki artışlar WT'de izlenen β -arrestin kaynaklı bireysel katkının çok üzerindedir. Bu da lokalizasyonda görülen artışın β -arrestin'in hücre içindeki diffüz-homojen varlığından değil, mutant reseptörlerin β -arrestin varlığında ilgili lokalizasyonlara taşınmasından kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca mutant reseptör ve β -arrestin eksprese eden hücrelerde hesaplanan korelasyon katsayıları, aynı β -arrestin alt formunu ve WT V2R'yi eksprese eden hücre serileri ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır; bu da β -arrestinlerin hücre içindeki diffüz varlığından kaynaklanan katkıyı azaltmaktadır. Buna ek olarak, yaptığımız deneylerde özellikle R137 mutantlarının β -arrestin2 varlığında hücre içine sekestre olduğu saptanmış ve organel işaretleyicileri ile özellikle R137 mutantlarının hücre içinde nerelere sekestre oldukları tespit

edilmeye çalışılmıştır. R137 mutantlarının β -arrestin2 ile birlikteliği Şekil 6.4 ve 6.5'te açıkça gösterilmiştir. Bu durumda R137 mutant reseptörlerin hücre içinde β -arrestin2 ile beraberliği oldukça fazla olduğundan, β -arrestin2 bulunan yerde reseptöründe β -arrestin2 ile birlikte aynı lokalizasyonda olduğunu varsaymak yanlış olmayacaktır.

ER LOKALİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

R137 mutantlarında görülen azalmış membran ekspresyonunun, bu mutantların hücresel trafiklerinin bozulması ve spontan β -arrestin2 etkileşimlerinin artmasına bağlı endositoza uğramalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hem HEK 293 hem de COS7 hücrelerinde yapılan çalışmalarda R13L ve R137H mutantlarının membran ekspresyonlarının WT'ye kıyasla azaldığı saptanmıştır. İşlev kaybına yol açan dynamin mutantlarını eksprese eden hücre serileri kullanılarak reseptörlerin agonist aracılı ve konstitütif internalizasyonu engellendiğinde reseptörlerin membran ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (36). Aynı şekilde, reseptörlerin β -arrestinler ile etkileşimi engellendiğinde reseptörün membrandaki varlığı artmıştır (42). Ancak membran ekspresyonunun özellikle R137H mutantında belirgin olmakla birlikte iki mutantta da hiçbir zaman WT seviyesine ulaşmadığı görülmüştür. Bu durum her ne kadar β -arrestin aracılı endositozun membran ekspresyonunun azalmasındaki katkısını gösterse de aynı zamanda bu reseptörlerin sentezlerinden membrana taşınmalarına kadar olan süreçte hücre içinde bir yerde takılabildiklerini düşündürmüştür (36). Özellikle R137H mutantının membrana çıkamamasında büyük bir etkenin, mutasyon nedeniyle yanlış katlanması ve yanlış katlanmış bu proteinin membrana ulaşamaması neticesinde ER'de veya Golgi'de birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (35). Yaptığımız ER lokalizasyon çalışmaları da R137H mutantında belirgin olmakla birlikte her üç mutant reseptörün ER lokalizasyonlarının WT'ye göre arttığını göstermektedir (Şekil 6.11). Özellikle β -arrestin KO hücre serilerinde gözlenen ER lokalizasyonundaki artışın, yanlış katlanmış proteinlerin ER'de takılı kalmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Aynı zamanda ER lokalizasyonunu saptamada kullandığımız korelasyon katsayılarının, β -arrestin1/2 ekspresyonu ile değişmemesi β -arrestinlerin reseptörlerin bu lokalizasyona taşınmasında bir katkısı olmadığını göstermektedir. Bu durum ER lokalizasyonunda gözlenen artışın yanlış katlanmış proteinlerin ER'de alıkonmasından kaynaklandığı hipotezini desteklemektedir.

GOLGİ LOKALİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bir önceki bölümde de tartışıldığı gibi, R137 mutant reseptörlerin hücre yüzeyinde azalmış olarak gözlenmelerinin iki nedeni olabilir: 1) sentezden membrana kadar olan taşınma

sürecinde bir aksaklık vardır, 2) yüzeyden hücre içine alınmada (β -arrestin-aracılı) bir hızlanma vardır. Bu mutantları eksprese eden β -arrestin KO hücrelere β -arrestin1/2 eklenmesinin reseptörün membran ekspresyonunu azaltıyor olması (Şekil 6.4) ikinci mekanizmayı desteklemekle birlikte birinci mekanizmayı dışlamamaktadır. Dolayısıyla, bu mutantlar membrana çıkış yolunda ER’de olmasa da Golgi’de takılıyor olabilirler. Bu olasılığı değerlendirmek için, söz konusu reseptörlerin Golgi lokalizasyonu, β -arrestin1/2 KO hücrelerde WT reseptörle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu reseptörlerin Golgi lokalizasyonları β -arrestin KO hücre serilerinde değerlendirildiğinde sadece R137L mutantının Golgi lokalizasyonunda minimal bir artış gözlenmiştir. Bu artış β -arrestin yokluğunda gerçekleştiğinden, sentezden sonra membrana geçiş sürecinde bir miktar R137L-mutant reseptörün Golgi’de takıldığı söylenebilir. Ancak, bu hücrelere β -arrestin1/2 eklenmesi, R137 mutantlarının Golgi lokalizasyonunu dikkate değer bir şekilde arttırmıştır. Yani, yukarıda belirtilen 2. mekanizma iki mutant için de geçerliymiş gibi görünürken, 1. mekanizma yalnız R137L mutantı için (kısmen de olsa) geçerliymiş gibi görünmektedir.

Bu deneyler ayrıca iki β -arrestin türünün R137 mutantlarının Golgi lokalizasyonunu farklı şekillerde etkilediğini göstermiştir: R137H mutantının Golgi lokalizasyonu β -arrestin1 ya da 2’nin varlığıyla aynı oranda artarken, R137L mutantının β -arrestin2’nin varlığına daha duyarlı bulunmuştur. (Şekil 6.14). Genel bilgilerde açıklandığı üzere reseptörler hücre içine alındıktan sonra oluşan geç endozom kompleksleri TGN aracılığı ile tekrar plazma membranına geri dönebilmektedir. R137 mutantlarında β -arrestin varlığında artmış olarak gözlenen Golgi lokalizasyonu, bu durumun β -arrestinlerin endositoz sonrası R137 mutantlarını daha çok TGN’ye yönlendirmesinden kaynaklanabileceğini ve bir şekilde R137L mutantının endositozundan sonra TGN’ye yönlendirilmesinde β -arrestin2’nin daha fazla rol aldığını düşündürmüştür.

LİZOZOM LOKALİZASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 6.17’deki lizozom lokalizasyonları incelendiğinde, β -arrestin1/2 KO hücre serilerinde sadece R137L mutantının lizozom lokalizasyonunda WT’ye göre hafif bir artış olduğu görülmektedir. Bu artışın, yanlış katlanmış protein yanıtı sonucu reseptörlerin ERLAD üzerinden lizozom aracılı degradasyona gönderilmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Buna karşılık, β -arrestin2 ekspresyonunun bütün mutantlarda, WT’ye kıyasla büyük bir lizozomal lokalizasyon artışına sebep olduğu gözlenmektedir. Bu artış R137 mutantlarında daha bariz olarak izlenmiştir. Dolayısıyla, endositoz sonrası bu mutantların lizozoma taşınmasında β -arrestin2’nin önemli bir katkısı olduğu söylenebilir. Membranda bulunan

reseptörlerin lizozoma taşınmasına aracılık eden yollar içerisinde en iyi tanımlanmış olanı reseptörlerin ubiquitinasyonu.

Agonistlere kronik maruziyet birçok GPCR’de reseptör “down” regülasyonu olarak adlandırılan hücresel bir süreci tetikler. Esas olarak reseptörlerin lizozomal degradasyonu olarak tanımlanabilecek olan bu süreçle, reseptör ekspresyonu önemli bir ölçüde azaltılır. Reseptör degradasyonuna aracılık eden kritik moleküler mekanizmalar yeni keşfedilmeye başlanmıştır ve reseptörlerin ubiquitin ile etiketlenmesinin bu süreçte önemli rol oynadığı saptanmıştır. β 2AR, agonist bağımlı ubiquitinasyonu ve reseptör degradasyonunun gösterildiği ilk memeli GPCR’sidir. β 2AR üzerinde yapılan çalışmalar ile ubiquitinize olmayan reseptörlerin endositoza uğradıkları ancak lizozomlara taşınmadıkları gösterilmiştir. Ubikitin bağlanma bölgelerinde (lizin kalıntıları) mutasyon içeren β 2AR’lerde, reseptörlerin lizozomlarda degrade olmadıkları, ancak bu mutasyonların reseptör internalizasyonu üzerine bir etkisi bulunmadığı gösterilmiştir (49)(50). Buna ek olarak β 2AR’nin agonist aracılı ubiquitinasyonu için, reseptörün fosforilasyonu ve reseptöre β -arrestin bağlanması gereklidir. Yapılan çalışmalar GPCR fosforilasyon bölgelerinde mutasyon olan ve β -arrestinleri bağlamayan β 2AR’lerin, agonist aracılı gerçekleşen ubiquitinasyona ve degradasyona uğramadığını göstermiştir. Bu da β -arrestinlerin aktive edilmiş reseptörlerin ubiquitinasyonu için kritik olduğunu düşündürmektedir (51). Ayrıca β -arrestin1/2’leri silinmiş fare kökenli fibroblast hücrelerinde V2R’lerin ubiquitinize olmadığı ve bu hücrelere tekrar β -arrestin2 eksprese ettirildiğinde V2R ubiquitinizasyonunun onarıldığı gösterilmiştir. Böylece β -arrestin2’nin V2R ubiquitinizasyonu için gerekli bir bileşen olduğu saptanmıştır (52).

Bütün bu bilgiler ışığında mutant V2R’lerde özellikle de R137 mutantlarında gözlenen β -arrestin2 ekspresyonu ile lizozomal lokalizasyon artışının, reseptörün agonist yokluğunda konstitütif olarak ubiquitinize olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu mutantların ubiquitinizasyonları ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. İlerleyen aşamalarda mutant reseptörlerin ubiquitinizasyonlarının araştırılması faydalı olacaktır. Özellikle ubiquitinizasyonun dinamik bir süreç olduğu, E3 ubiquitin ligazlar ve deubikitinasyon enzimleri (DUPs) tarafından kontrol edildiği göz önünde bulundurulursa reseptörlerin ubiquitinizasyonlarının engellenmesinin ve reseptörlerin lizozomal degradasyondan kurtarılmasının nasıl bir hücresel trafiğe ve fonksiyonel sonuca sebep olacağı merak konusudur.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. V2R - β -arrestin1/2 birlikteliği incelendiğinde özellikle R137 mutant reseptörlerin β -arrestin1/2 birliktelikleri arasında büyük bir fark olduğu, spontan etkileşimlerinde β -arrestin2 seçiciliği gösterdikleri izlenmiştir.
2. R137 mutant V2R'lerin β -arrestin2 varlığında hücre içinde büyük veziküler yapılara sekestre oldukları gözlenmiştir.
3. R137L mutantının β -arrestin1 ile olan kolokalizasyonu tol vaptan varlığında belirgin olarak azalmıştır. Ancak bu azalma β -arrestin1 V2R etkileşimine dair bir bilgi vermemektedir.
4. Bütün mutant reseptörlerin β -arrestin KO hücre serilerinde ER lokalizasyonlarının WT'ye kıyasla arttığı ve β -arrestin ekspresyonunun bu lokalizasyon artışı üzerine bir etkisi olmadığı izlenmiştir.
5. Görülen ER lokalizasyon artışı, özellikle R137H mutasyonunda reseptör proteininin yanlış katlanması ve neticesinde ER'de veya Golgi'de biriktiğine dair öne sürülen literatür bilgisini desteklemektedir.
6. R137 mutantlarında β -arrestin1/2 ekspresyonu ile Golgi lokalizasyonlarının WT'ye kıyasla arttığı gözlenmektedir.
7. R137H mutantının Golgi lokalizasyonu β -arrestin1 ya da 2'nin varlığıyla aynı oranda artarken, β -arrestin2'nin varlığı R137L mutantının Golgi lokalizasyonuna daha büyük bir katkıda bulunmaktadır.
8. R137 mutantlarında daha bariz olmakla birlikte β -arrestin2 ekspresyonunun bütün mutantlarda, WT'ye kıyasla büyük bir lizozom lokalizasyon artışına sebep olduğu gözlenmiştir.
9. Gs KO hücre serilerinde, V2R varyantlarının varlığı bazal cAMP birikimini etkilememiştir. Bu hücrelerde AVP, beklendiği üzere herhangi bir cAMP yanıtı oluşturmamıştır.
10. β -arrestin1/2 KO MEF hücre serilerinde, NSIAD'ye sebep olan mutant reseptörleri eksprese eden hücrelerde arttığı bilinen bazal cAMP yanıtı, aynı paternde artmış olarak gözlenmeye devam etmiştir.

9. KAYNAKLAR

1. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003;99(1):25–44.
2. Michel MC, Charlton SJ. Biased agonism in drug discovery-is it too soon to choose a path? *Mol Pharmacol.* 2018;93(4):259–65.
3. Goodman J, Krupnick JG, Santini F, Gurevich V V., Penn RB, Gagnon AW, et al. β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2- adrenergic receptor. *Nature.* 1996;383:447–50.
4. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature.* 1993;361:549–52.
5. Bockenhauer D, Bichet DG. Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(10):576–85.
6. Feldman BJ, Rosenthal SM, Vargas GA, Fenwick RG, Huang EA, Matsuda-Abedini M, et al. Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *N Engl J Med.* 2005;352:1884–90.
7. Makita N, Manaka K, Sato J, Iiri T. V2 vasopressin receptor mutations. *Vitam Horm.* 2020;113:79–94.
8. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256–72.
9. Sriram K, Insel PA. G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: How many targets and how many drugs? *Mol Pharmacol.* 2018 Apr 1;93(4):251–8.
10. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1980;255(15):7108–17.
11. Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14(8):303–7.
12. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(1):4–12.
13. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 1998;273(2):669–72.
14. Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly Of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1985;54(1):631–64.
15. Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: Protein folding, quality control,

- degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1377–408.
16. Brumley LM, Marchase RB. Receptor synthesis and routing to the plasma membrane. *Am J Med Sci.* 1991;302(4):238–43.
 17. Guerriero CJ, Brodsky JL. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev.* 2012;92(2):537–76.
 18. Fregno I, Molinari M. Proteasomal and lysosomal clearance of faulty secretory proteins: ER-associated degradation (ERAD) and ER-to-lysosome-associated degradation (ERLAD) pathways. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2019;54(2):153–63.
 19. Tian X, Kang DS, Benovic JL. β -arrestins and G Protein-Coupled Receptor Trafficking. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;219:173–86.
 20. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. B-Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(9):521–33.
 21. Peterson YK, Luttrell LM. The diverse roles of arrestin scaffolds in g protein-coupled receptor signaling. *Pharmacol Rev.* 2017;69(3):256–97.
 22. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 2002;115(3):455–65.
 23. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol.* 2007;69(1):483–510.
 24. Beaulieu JM, Caron MG. B-Arrestin Goes Nuclear. *Cell.* 2005;123(5):755–7.
 25. Kohout TA, Lin F-T, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ. β -Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(4):1601–6.
 26. Tiulpakov A, White CW, Abhayawardana RS, See HB, Chan AS, Seeber RM, et al. Mutations of vasopressin receptor 2 including novel L312S have differential effects on trafficking. *Mol Endocrinol.* 2016;30(8):889–904.
 27. Treschan TA, Peters J. The vasopressin system: Physiology and clinical Strategies. *Anesthesiology.* 2006;105(3):599–612.
 28. Deen PMT, Marr N, Kamsteeg EJ, Van Balkom BWM. Nephrogenic diabetes insipidus. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000;9(6):591–5.
 29. Robben JH, Knoers NVAM, Deen PMT. Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2005;289(2 58-2):265–73.
 30. Carpentier E, Greenbaum LA, Rochdi D, Abrol R, Iii WAG, Bichet DG, et al. Identification and Characterization of an Activating F229V Substitution in the V2

- Vasopressin Receptor in an Infant with NSIAD. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1635–40.
31. Erdélyi LS, Mann WA, Morris-Rosendahl DJ, Groß U, Nagel M, Várnai P, et al. Mutation in the V2 vasopressin receptor gene, AVPR2, causes nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis. *Kidney Int*. 2015;88(5):1070–8.
 32. Tiulpakov A, White CW, Abhayawardana RS, See HB, Chan AS, Seeber RM, et al. Mutations of vasopressin receptor 2 including novel L312S have differential effects on trafficking. *Mol Endocrinol*. 2016;30(8):889–904.
 33. Kocan M, See HB, Sampaio NG, Eidne KA, Feldman BJ, Pflieger KDG. Agonist-Independent Interactions between β -Arrestins and Mutant Vasopressin Type II Receptors Associated with Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *Mol Endocrinol*. 2009;23(4):559–71.
 34. Gitelman SE, Feldman BJ, Rosenthal SM. Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis: A Novel Disorder in Water Balance in Pediatric Patients. *Am J Med*. 2006;119:54–8.
 35. Rosenthal W, Antaramian A, Gilbert S, Birnbaumer M. Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1993;268(18):13030–3.
 36. Rochdi MD, Vargas GA, Carpentier E, Oligny-Longpré G, Chen S, Kovoov A, et al. Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: Implications for treatments. *Mol Pharmacol*. 2010;77(5):836–45.
 37. Soumpasis DM. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J*. 1983;41(1):95–7.
 38. Tenenbaum J, Ayoub MA, Perkowska S, Adra-Delenne AL, Mendre C, Ranchin B, et al. The constitutively active V2 receptor mutants conferring NSIAD are weakly sensitive to agonist and antagonist regulation. *PLoS One*. 2009;4(12):1–6.
 39. Kocan M, See HB, Sampaio NG, Eidne KA, Feldman BJ, Pflieger KD. Agonist-Independent Interactions between-Arrestins and Mutant Vasopressin Type II Receptors Associated with Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *Mol Endocrinol*. 2009;23:559–70.
 40. Vezzi V, Ambrosio C, Grò MC, Molinari P, Süral G, Costa T, et al. Vasopressin receptor 2 mutations in the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis show different mechanisms of constitutive activation for G protein coupled receptors. *Sci Rep*. 2020;10(9111):1–12.
 41. Bernier V, Lagacé M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG, Bouvier M. Functional

- rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol.* 2004;18(8):2074–84.
42. Takahashi K, Makita N, Manaka K, Hisano M, Akioka Y, Miura K, et al. V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists. *J Biol Chem.* 2012;287(3):2099–106.
 43. Calebiro D, Koszegi Z, Lanoiselee Y, Miljus T, O'Brien S. G Protein-coupled Receptor-G Protein Interactions: A Single-Molecule Perspective. *Physiol Rev.* 2021;101:857–906.
 44. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* 2009;5(10):734–42.
 45. Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature.* 2013;495(7442):534–8.
 46. Jensen DD, Lieu TM, Halls ML, Veldhuis NA, Imlach WL, Mai QN, et al. Neurokinin 1 receptor signaling in endosomes mediates sustained nociception and is a viable therapeutic target for prolonged pain relief. *Sci Transl Med.* 2017;9(392):1–15.
 47. Yarwood RE, Imlach WL, Lieu TM, Veldhuis NA, Jensen DD, Herenbrink CK, et al. Endosomal signaling of the receptor for calcitonin gene-related peptide mediates pain transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(46):12309–14.
 48. Thomsen ARB, Plouffe B, Cahill Iii TJ, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, et al. GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell.* 2016;166(4):907–19.
 49. Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science (80-).* 2001;294(5545):1307–13.
 50. Shenoy SK. Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ Res.* 2007;100(8):1142–54.
 51. Marchese A, Paing MM, Temple BRS, Trejo JA. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:601–29.
 52. Martin NP, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Regulation of V2 Vasopressin Receptor Degradation by Agonist-promoted Ubiquitination. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45954–9.

10. EKLER

EK1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Madde adı	Firma	Katalog No
DMEM	Biological Industries	11-055-1K
AVP	Sigma	V9879
Tolvaptan	Sigma	T7455
ER marker	Abcam	ab139482
Golgi marker	Abcam	ab269449
Lizozom marker	Abcam	ab112137
Fötal Sığır Serumı	Gibco	10270
Higromisin	Roche	10 843 555 001
Puromycin	ChemCruz	Sc-108071A