

1999-216

**G-PROTEİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

PROJE NO: SBAG -1710

Prof.Dr.BEKİ KAN
Doç.Dr.ZEHRA SAYERS
Dr.BAHİRE KÜÇÜKKAYA
Dr.OYA ORUN

MART 1999
İSTANBUL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
1. ÖZET.....	2
2. ABSTRACT.....	4
3. GİRİŞ.....	6
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1 G-Proteinleri.....	7
4.2 G-Proteinleri Üzerine Yapılan Yapısal Çalışmalar.....	9
4.3 Hematopoiesis.....	11
4.4 Eritropoiesis.....	12
4.5 G-Proteinleri ve Farklılaşma.....	13
4.6 Aminometiltransferaz (T-) Proteini.....	14
4.7 Sinkrotron X-Işınları ile küçük açı saçılması: teori ve yapı analizinde kullanılması.....	15
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
5.1 G-Proteinlerinin Eritroid Hücre Farklılaşmasındaki Rolü.....	29
5.1.1 K562 İnsan Eritrolösemi Hücrelerinin Çoğaltılması.....	29
5.1.2 K562 Hücrelerinin Farklılaşmaya İndüklenmesi.....	29
5.1.3 Benzidin Boyama Yöntemi.....	30
5.1.4 Hemoglobın Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	30
5.1.5 Ham Zar Kesimlerinin Hazırlanması.....	30
5.1.6 Sıçan Beyin Dokusundan Zar Kesimi Eldesi.....	30
5.1.7 Toplam RNA İzolasyonu.....	31
5.1.8 RNA Miktar Tayini.....	31
5.1.9 Poli (A ⁺) RNA (mRNA) İzolasyonu.....	33
5.1.10 RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	34
5.1.11 %1 Formaldehit Agaroz Gelinin Hazırlanması.....	34
5.1.12 Northern Transfer İşlemi.....	34
5.1.13 Oligonükleotit Probların İşaretlenmesi.....	35
5.1.14 Hibritleme İşlemi.....	35
5.2 G _α - ve T- Proteinlerinin Saflaştırılması ve T-Proteininin X-ışınları İle Yapı Analizi.....	36
5.2.1 Kültür ve Ekspresyon.....	36

5.2.2 Plazmid İzolasyonu ve Transformasyon.....	37
5.2.3 Protein Saflaştırma İşlemi.....	38
5.2.4 Küçük Açık Saçılması.....	41
5.3 Her İki Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	43
5.3.1 GTPyS Bağlama Testi.....	43
5.3.2 Elektroforetik Analiz (SDS-PAGE).....	43
5.3.3 Elektroforetik Transfer.....	43
5.3.4 İmmünojenik Belirleme – Western Blot.....	44
5.3.5 Dansitometrik Analiz.....	44
5.3.6 Protein Tayini.....	44
6.BULGULAR.....	45
6.1 Eritroid Hücre Farklılaşmasında G Protein Ekspresyonu Üzerine Çalışmalar.....	45
6.1.1 K562 Hücrelerinin Çoğalma Eğrileri.....	45
6.1.2 Hemoglobin Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	46
6.1.3 K562 Hücrelerinin Zar Kesimlerinde Guanin Nükleotit Bağlanma Etkinlikleri.....	46
6.1.3.1 Protein Derişim Eğrisi.....	46
6.1.3.2 Zaman Kinetiği.....	47
6.1.3.3 GTP'nin [³⁵ S]GTPyS Bağlama Tepkimesine Etkisi.....	48
6.1.3.4 K _d ve B _{max} Değerlerinin Saptanması.....	49
6.1.4 Kontrol ve Farklılaşmış Hücrelerde G-Protein Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	50
6.1.4.1 G protein α Alt Birimlerinin Ekspresyonu.....	50
6.1.4.2 G protein βγ Alt Birimlerinin Ekspresyon Düzeyleri.....	52
6.1.4.3 G _{oα} Proteininin Ekspresyonu.....	53
6.1.4.4 G _{sz} Düzeylerinin Saptanması.....	57
6.1.4.5 Eritroid Hücre Farklılaşmasında G _{i2α} Düzeylerinin Saptanması.....	60
6.1.4.6 G _{qα} Düzeylerinin Saptanması.....	65
6.1.4.7 G _{i2α} Protein Ekspresyonu.....	68
6.1.5 K562 Hücrelerinde G _{sz} Ekspresyonunun Northern Blot Analizi İle İncelenmesi.....	69
6.1.5.1 Toplam RNA Örneklerinin %1 Formaldehit Agaroze Gel Elektroforezi İle İncelenmesi.....	69

6.1.5.2 mRNA Örneklerinin Agaroza Gel Elektroföresi İle İncelenmesi	69
6.1.5.3 Oligonökleotit Probların İncelenmesi	70
6.1.5.4 RNA Miktar ve Kalitesinin 28S rRNA Oligonökleotit Probu İle İncelenmesi	71
6.1.5.5 Eritroid Hölre Farklılaşmasında G_{α} mRNA Dölzeylerinin Karşılaştırılması	71
6.2 G_{α} ve T-Proteinlerinin Saflaştırılması, T Proteininin Ölzeltideki Yapısının İncelenmesi	73
6.2.1 G_{α} 'nın Saflaştırılması	73
6.2.2 T-Proteini'nin (Aminometiltransferaz) Saflaştırılması	86
6.2.3 T-Proteini'nin Ölzeltideki Yapısal Parametrelerinin X-Işın Küçük Açılı Saçılma Yöntemiyle Analizi	91
7.TARTIŞMA	96
7.1 Eritroid Hölre Farklılaşmasında G-Proteinlerinin Rolöl	96
7.2 G_{α} ve T-Proteinlerinin Saflaştırılması, T Proteininin Ölzeltideki Yapısının İncelenmesi	101
8.SONUÇLAR	109
8.1 Eritroid Hölre Farklılaşmasında G-Proteinlerinin Rolöl	109
8.2 G_{α} ve T-Proteinlerinin Saflaştırılması, T Proteininin Ölzeltideki Yapısının İncelenmesi	109
9. EKLER	111
9.1 BL21(DE3) Hölcrelerinde G_{α} Ekspresyonu	111
9.2 pT7/NdeI/ G_{α} Plazmid İzolasyonu ve BL21(DE3)pLysS ve BL21(DE3)pLysE Soylarında G_{α} Ekspresyonu	114
10.KAYNAKLAR	117

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Tablo 4.1: Memeli G-protein α -altbirimlerinin özellikleri.....	8
Şekil 4.1: $G_{i\alpha}$ GDP yapısının şematik gösterilişi.....	11
Tablo 5.1: K562 hücrelerinde ham zar kesimlerinin eldesi.....	32
Tablo 5.2: mRNA eldesi.....	33
Tablo 5.3: $G_{o\alpha}$ ve aminometiltransferaz'a ait başlıca saflaştırma basamakları.....	39
Şekil 5.1: X-ışın küçük açı saçılma düzeneğinin şematik gösterimi.....	42
Şekil 6.1: K562 hücrelerinin çoğalma eğrileri.....	45
Tablo 6.1: K562 hücrelerinin ham zar kesimlerinde GTP γ S bağlanma pmol değerleri.....	46
Tablo 6.2: Zar kesimlerinde zaman kinetiğinin pmol değerleri.....	47
Şekil 6.2: GTP γ S bağlanma etkinliğinin protein miktarına bağımlılığı.....	47
Şekil 6.3: GTP γ S bağlanma kinetiği.....	48
Tablo 6.3: Zar kesimlerinde GTP'nin artan derişimlerinde GTP γ S'in pmol bağlanma değerleri.....	48
Şekil 6.4: GTP'nin GTP γ S bağlanma tepkimesine etkisi.....	49
Tablo 6.4: K562 zar kesimlerinde GTP γ S'in derişime bağımlı bağlanması.....	49
Şekil 6.5: K562 hücre zar kesimlerinde [35 S]GTP γ S bağlanması.....	49
Şekil 6.6: K562 hücre alt-kesimlerinde G_{ortak} altbirimlerinin Western blot analizi.....	50
Şekil 6.7: Ham zar kesimlerinin anti- $G_{ortak\alpha}$ ile etkileşimi.....	51
Tablo 6.5: K ve F K562 hücre zarlarında $G_{ort\alpha}$ altbirim düzeyleri.....	51
Şekil 6.8: Ham zar kesimlerinin anti- $G_{p\gamma}$ ile etkileşimi.....	52
Tablo 6.6: K ve F hücre zarlarında $G_{p\gamma}$ altbirim düzeyleri.....	52
Şekil 6.9: K562 hücrelerinde $G_{o\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	53
Şekil 6.10: K562 hücre zar kesimlerinin anti- $G_{o\alpha}$ ile etkileşimi.....	54
Şekil 6.11: K562 hücre kesimlerinde $G_{o\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	54
Şekil 6.12: Artan zar protein miktarlarıyla $G_{o\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	55
Şekil 6.13: K562 hücrelerinde $G_{o\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	56
Şekil 6.14(A): $G_{s\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	57
Tablo 6.7: K ve F K562 hücre zarlarında $G_{s\alpha}$ altbirim düzeyleri.....	58
Şekil 6.14(B): $G_{s\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	59
Tablo 6.8: K ve F K562 hücre zarlarında $G_{s\alpha}$ altbirim düzeyleri.....	60
Şekil 6.15: $G_{i2\alpha}$ proteininin Western blot analizi.....	61
Şekil 6.16: Zar kesimlerinin anti- $G_{i2\alpha}$ ile etkileşimi.....	62
Tablo 6.9: K ve F K562 ham zar kesimlerinde $G_{i2\alpha}$ düzeyleri.....	62
Şekil 6.17 (A): Farklılaşma sürecinde $G_{i2\alpha}$ ekspresyonunun Western blot analizi.....	63
Şekil 6.17 (B): Farklılaşma sürecinde $G_{i2\alpha}$ ekspresyonunun Western blot analizi.....	64
Tablo 6.10: K ve F K562 hücre zarlarında $G_{i2\alpha}$ düzeyleri.....	64
Tablo 6.11: K ve F K562 hücre zarlarında $G_{i2\alpha}$ düzeyleri.....	65
Şekil 6.18: Anti- $G_{q\alpha}$ ile Western blot analizi.....	65

Şekil 6.19: Anti- $G_{q\alpha}$ ve anti- $G_{i2\alpha}$ ile Western blot analizi.....	66
Tablo 6.12: K ve F beşinci gün ham zar kesimlerinde $G_{q\alpha}$ düzeyleri.....	67
Şekil 6.20: (K) K562 hücrelerinde anti- $G_{q\alpha}$ etkileşiminin protein miktarına bağımlılığı.....	67
Şekil 6.21: (F) K562 hücrelerinde anti- $G_{q\alpha}$ etkileşiminin protein miktarına bağımlılığı.....	68
Şekil 6.22: Toplam RNA örneklerinin %1 formaldehit agaroz gel elektroforezi.....	69
Şekil 6.23: mRNA örneklerinin %1'lik agaroz gel elektroforezi.....	70
Tablo 6.13: 28S rRNA ve $G_{sc\alpha}$ oligonükleotit problemlerinin $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ varlığında işaretlenme verimleri.....	70
Şekil 6.24: RNA örneklerinin 28S rRNA probu ile hibritleme işlemi.....	71
Şekil 6.25: K562 hücrelerinde $G_{sc\alpha}$ ekspresyonu.....	72
Şekil 6.26: Deney 1, Fenil-Sefaroz toplama grafiği.....	74
Şekil 6.27: Deney 1, Fenil-Sefaroz, SDS-PAGE.....	74
Tablo 6.14: Deney 1, Saflaştırma aşamalarında çeşitli basamaklarda elde edilen değerler.....	75
Şekil 6.28: Deney 1, Gel Filtrasyon toplama grafiği.....	76
Şekil 6.29: Deney 1, Gel Filtrasyon, SDS-PAGE.....	76
Şekil 6.30: Deney 1, Resource Q toplama grafiği.....	77
Şekil 6.31: Deney 1, Resource Q, SDS-PAGE.....	78
Şekil 6.32: Deney 1, Resource Q, Western blot.....	78
Şekil 6.33: Deney 1, Hidroksiapatit kromatografisi toplama grafiği.....	79
Tablo 6.15: Deney 2, Saflaştırma aşamalarında çeşitli basamaklarda elde edilen değerler.....	80
Şekil 6.34: Deney 2, Fenil-Sefaroz toplama grafiği.....	81
Şekil 6.35: Deney 2, Resource Q toplama grafiği.....	82
Şekil 6.36: Deney 2, Resource Q ve Gel Filtrasyon, SDS-PAGE.....	83
Şekil 6.37: Deney 2, Resource Q ve Gel Filtrasyon, Western blot.....	83
Tablo 6.16: Çeşitli G_{α} saflaştırma deneylerinde elde edilen $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ bağlama testi sonuçları.....	85
Şekil 6.38: T-protein, Fenil-Sefaroz toplama grafiği.....	86
Şekil 6.39: T-protein, Fenil-Sefaroz , SDS-PAGE.....	87
Şekil 6.40: T-protein, Gel Filtrasyon toplama grafiği.....	88
Şekil 6.41: T-protein, Gel Filtrasyon, SDS-PAGE.....	88
Şekil 6.42: T-protein, Mono Q toplama grafiği.....	89
Şekil 6.43: T-protein, Mono Q, SDS-PAGE.....	90
Tablo 6.17: T-protein, Saflaştırma aşamalarında çeşitli basamaklarda elde edilen değerler.....	90
Şekil 6.44: T-proteini ve BSA için küçük açılı saçılma desenleri.....	92
Şekil 6.45 A: T-proteini için saçılma eğrisi (1) ve dağılım fonksiyonu (2).....	93
Şekil 6.45 B: BSA için saçılma eğrisi (1) ve dağılım fonksiyonu (2).....	94
Tablo 6.18: T-protein ve BSA'ya ait girasyon yarıçapları ve saçılma şiddet değerlerinin karşılaştırılması.....	95
Şekil 6.46: T-proteini ve $G_{i\alpha}$ için ölçülen X-ışın saçılma desenlerinin karşılaştırılması.....	95

ÖNSÖZ

Bu projede G-proteinlerinin hücre büyümesi ve farklılaşmasındaki rolünü ve G_{α} proteininin yapı-işlev bağlantısını aydınlatmayı amaçlayan iki farklı çalışma paralel olarak yürütülmüştür.

Çalışmalar Marmara Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'nın olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı), Minnesota Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Bölümü, M.Ü. Biyokimya ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalları , İ.Ü. Biyofizik Anabilim Dalı olanaklarından yararlanılmıştır.

Proje TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Fonu kapsamında SBAG-1710 no'lu proje ile desteklenmiştir.

1.ÖZET

Heterotrimerik guanin nükleotit bağlayıcı proteinler (G-proteinleri), pek çok hücre yüzey reseptörünü hücre içi efektör proteinlere bağlayan aracı proteinlerdir. G-proteinleri aracılığıyla gerçekleşen olaylar dizisi duyuşsal algılama, nöronal etkinlik, hormonal etkinlik, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi çeşitli sistemlerin düzenlenmesi ile sonuçlanır.

Bu projede iki farklı çalışma paralel olarak yürütülmüştür:

- 1- G proteinlerinin eritroid hücre farklılaşmasındaki rolünün incelenmesi.
- 2- Merkezi sinir sisteminde en yaygın bulunan G-protein tipi olan G_o proteininin α altbiriminin saflaştırılması ve T-proteini'nin (aminometiltransferaz) saflaştırılarak X-ışınları ile yapı analizinin yapılması.

Yapılan çalışmaların özeti aşağıda verilmektedir:

- 1- Birinci çalışmada hücre kültürlerinde çoğaltılan K562 hücreleri hemin ile farklılaşmaya indüklendikten sonra santrifüjlenerek ham zar kesimleri elde edildi ve bu kesimlerde $GTP\gamma S$ bağlanma tepkimesi incelendi.

Kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden çeşitli hücre alt kesimleri elde edildi ve bu kesimler G proteinlerinin α ve $\beta\gamma$ altbirimlerine özgün antikorlarla etkileştirildi. G protein α altbirimlerinin tümünü tanıyan antikor ile K grubunda, F grubuna göre daha kuvvetli bir bant elde edildi ancak, $\beta\gamma$ altbirim miktarları açısından önemli bir fark olmadığı gözlemlendi.

K562 hücrelerinde, $G_{s\alpha}$ 'nın kısa formunun (S), sıçan beyin zarının aksine, uzun formundan (L) daha fazla bulunduğu ve farklılaşmış hücrelerdeki toplam $G_{s\alpha}$ miktarının kontrollere kıyasla beşinci günde %50, altıncı günde %20 arttığı belirlendi.

K562 hücrelerinde $G_{i1\alpha}$ ve $G_{o\alpha}$ ekspresyonu belirlenmedi, $G_{i2\alpha}$ düzeylerinin ise farklılaşma ile % 12 oranında azaldığı gözlemlendi. $G_{q/11\alpha}$ düzeylerinin farklılaşmaya koşut olarak % 22 oranında arttığı belirlendi. $G_{s\alpha}$, $G_{i2\alpha}$ ve $G_{q\alpha}$ 'nın K562 farklılaşma sürecinde değişen düzeyleri bir çok sistemde olduğu gibi eritroid hücre farklılaşmasında da G proteinlerinin katkısı olduğunu düşündürdü.

2- Diğer çalışmada rekombinant $G_{0\alpha}$, *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinde pT7/Nde1/ $G_{0\alpha}$ vektörü kullanılarak sentezlendi. Ekspresyon seviyesi Western blot ve GTP γ S bağlama yöntemleriyle belirlendi ve IPTG'den bağımsız olduğu saptandı.

Protein izolasyonu çalışmalarına indüklenmemiş geniş ölçekli kültürlerde, Lee ve ark. tarafından verilen yöntem izlenerek başlandı. Bu yönteme dayanarak saflaştırma DEAE-Sefasel, amonyum sülfat çökeltme, Fenil-Sefaroz, Q-Sefaroz ve hidroksiapatit aşamaları izlenerek gerçekleştirildi.

Bu çalışmalarda değişik aşamalarda Lee ve ark.'na uygun sonuçlar alınmadığından ve görülen safsızlıklar nedeniyle bazı değişiklikler yapıldı. Bu değişimler $G_{0\alpha}$ ile aynı molekül ağırlığına sahip ve *E.coli* glisin parçalama enzim sisteminin bir üyesi olan T-proteininin de $G_{0\alpha}$ ile birlikte saflaşmasına yol açtı. $G_{0\alpha}$ saflaştırma çalışmalarına paralel olarak X-ışınları küçük açı saçılma deneyleri için T-protein kullanıldı. Analiz sonuçları bu proteinin yapısı ile GDP bağlı aktif olmayan yapıdaki heterotrimerik bir kimerik G-proteinin α -altbiriminin yapısı arasında yüksek benzerlik olduğunu ortaya koydu.

Anahtar Sözcükler: farklılaşma – K562 – eritroid – G protein – Goalfa – kristalleşme
– saflaştırma - ekspresyon

2. ABSTRACT

Heterotrimeric guanine-nucleotide binding proteins (G-proteins) have essential roles in coupling many cell surface receptors to effector molecules inside the cell. The cascade of events mediated by G-proteins ultimately lead to the regulation of physiological systems such as sensory perception, neuronal and hormonal activity, cell growth and differentiation.

Two different studies on G-proteins were carried on in this project :

1. A study on the role of G-proteins in erythroid cell differentiation
2. Purification of the α -subunit of G_o protein; the most abundant G- protein in the central nervous system and purification and X-ray structural analysis of T-protein (aminomethyltransferase).

The results of this work may be summarized as follows:

1. In the first study, K562 cells grown in suspension culture were induced to differentiate with hemin, centrifuged to obtain crude cell membranes and assayed for GTP γ S binding activity. Various cell fractions obtained from differentiated and undifferentiated cells were analyzed for G protein α and $\beta\gamma$ subunits by Western blot analysis. Immuno-reactivity with anti- G_{sa} common antibody was stronger in differentiated cells than in their nondifferentiated counterparts but the $\beta\gamma$ signals were similar in both groups.

The content of the long form of G_{sa} was lower than that of G_{sa-S} , in contrast to the contents in the rat brain membrane. The level of G_{sa} in differentiated cells was found to be 50 % higher on the fifth day and 20 % higher on the sixth day after induction with hemin.

$G_{i1\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ could not be determined by immunoblot analysis. Upon differentiation, the levels of $G_{i2\alpha}$ were found to decrease by 12% whereas those of $G_{q/11\alpha}$ increased by 22%. The change in the levels of G_{sa} , $G_{i2\alpha}$ and G_{qa} during K562 differentiation implies that G proteins are also involved in erythroid cell differentiation.

2- In the second study, recombinant G_{α} was expressed in *E.coli* BL21(DE3) cells transformed with pT7/Nde1/ G_{α} plasmid. Expression levels were determined by Western blot analysis and GTP γ S binding tests and it was established that the level of expression was not dependent on IPTG concentration.

Protein isolation studies using large scale cultures which were not induced were initially carried out according to the method described by Lee et al. According to this method, DEAE-Sephacel, ammonium sulphate precipitation, Phenyl-Sepharose, Q-Sepharose and hydroxyapatite steps were performed during purification.

Due to the inconsistencies with the results of Lee et al. and due to inhomogeneities of the final product, some modifications were introduced to this procedure. These modifications resulted in co-purification of an *E.coli* protein of nearly the same molecular weight, the T-protein of glycine cleavage system.

Parallel to G_{α} purification studies, T-protein was used for XSAS measurements. Analyses indicated to a high similarity between T-protein structure and the structure of GDP-bound inactive form of α -subunit of a chimeric heterotrimeric G-protein.

Key Words: differentiation – K562 – erythroid – G protein – G_{α} – crystallization – purification - expression

3.GİRİŞ

Heterotrimerik guanin nükleotit bağlayıcı proteinler (G-proteinleri), *ras* p21 gibi küçük monomerik GTP-bağlayıcı proteinleri de içine alan geniş GTPaz ailesinin üyesi olup, pek çok hücre yüzey reseptörünü hücre içi efektör proteinlere bağlayan aracı proteinlerdir. Bu proteinler sayıları birkaç yüzü bulan serpentin (membranı yedi kez kateden) reseptörlerle etkileşerek, görme,koku,tat alma gibi duyuusal algıların yanı sıra, hücre büyümesi, nöronal aktivite ve hormonal yanıt oluşturma gibi birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesine katkıda bulunurlar (24,21). Özgün reseptörleriyle etkileşerek aktive olan G-proteinleri reseptörden gelen sinyali enzimler ve iyon kanalları gibi çeşitli efektör moleküllere iletirler. Bu efektör moleküller ise siklik nükleotitler, Ca^{+2} , inozitol fosfatlar ve diaçilgliserol gibi hücre içi ikincil ulakların işlevlerini düzenlerler (24).

G-proteinlerinin aracılığıyla gerçekleşen olaylar arasında bazı hücrelerin farklılaşması yer almaktadır. Örneğin, HL-60 ve U-937 monositlerinde G_i miktarlarının farklılaşmaya koşut olarak arttığı gözlenmiştir (56). Bir başka çalışmada ise, $G_{i2\alpha}$ miktarlarının artmasıyla fare embriyon kök hücrelerinin adipositlere farklılaştığı gözlenmiştir (65). Nöroblastoma X glioma hibrit hücrelerinde hücre farklılaşmasıyla birlikte G_o 'da artış belirlenmiştir (47). Son yıllarda yürütülen bazı çalışmalar ise eritroid hücre gelişmesi için gerekli faktörlerden Epo ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in erken etkilerinin G_i ailesine ait G-proteinleri aracılığıyla gerçekleşebileceğini düşündürmüştür (44).

Özellikle beyinde, adrenal medulla'da ve sinir dokularında bulunan G_o 'ın ise nöronal kalsiyum kanallarını kontrol ettiği, K^+ -kanallarının uyarılmasında rol aldığı ve hücre gelişmesinde doğrudan etkili olduğu düşünülmektedir (29). G_o 'ın sinir sisteminde yaygın olarak bulunması ve nöroendokrin tümörlerde G_o düzeyindeki artışlar (36), Alzheimer hastalığında öncül bir protein olan APP reseptörü ile etkileşimi (49) gibi çeşitli hastalıklarda oynadığı rolleri de gözönüne alındığında bu proteinin üç boyutlu yapısı ile işlevi arasında nasıl bir bağ bulunduğunun açığa çıkarılması önem kazanmaktadır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1 G-Proteinleri

Heterotrimerik guanin nükleotit bağlayıcı proteinler (G-proteinleri) pekçok hücre yüzey reseptörünü hücre içi efektör proteinlerine bağlayan aracı proteinlerdir. Bu proteinler, sayıları birkaç yüzü bulan serpentin (membranı yedi kez kateden) reseptörlerle kenetlenerek görme, koku, tat alma gibi duyuşsal algıların yanı sıra, hücre büyümesi, nöronal aktivite ve hormonal yanıt oluşturma gibi birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesine katkıda bulunurlar.

Heterotrimerik G-proteinleri α, β, γ altbirimlerinden oluşurlar. α ve $\beta\gamma$ altbirimlerinin birbirinden ayrılarak fonksiyon göstermesi eşzamanda iki ayrı efektörün kontrolüne olanak tanımaktadır. Ayrıca G-proteinlerinin işleyiş özellikleri sinyal çoğaltımına izin vermektedir (10).

G_α -altbirimlerinin molekül ağırlıkları 39-50 kDa arasında değişmektedir. α -altbirimleri guanin-nükleotitlerini bağlama bölgesini ve doğal GTPaz aktivitesinden sorumlu bölgeyi içerirler ve G-proteininin reseptör ve efektörlerle etkileşimlerinin özgünlüğünü belirlerler (Tablo 4.1). β -altbirimlerinin molekül ağırlıkları 35-39 kDa arasında, γ -altbirimlerinin ağırlığı ise 7-9 kDa arasında değişmektedir (54). β -altbirimlerinin beş tanesi arasında %80 benzerlik vardır. Memeli γ -altbirimlerinin dokuz tipi arasındaki ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5, \gamma_7$, iki γ_8 ve γ_{12}) benzeşme oranları ise oldukça değişkendir. Örneğin γ_4 cDNA dizisi γ_1 ile %34, γ_2 ile %75, γ_3 ile %67 benzerlik göstermektedir (12). Farklı $\beta\gamma$ kompleksleri arasındaki işlevsel farklılığın β 'dan çok γ altbirimine dayandığı düşünülmektedir (46).

Rodbell ve arkadaşları tarafından ilk tanımlanan G-proteini, adenilat siklazin hormonal uyarısında rol oynadığı için "stimulatory" (uyarıcı) olarak adlandırılan G_s 'dir. G_{sc} 'nin biri 45 kDa (G_{sc-S} (kısa)) , diğeri 52 kDa ağırlığında (G_{sc-L} (uzun)) olmak üzere iki formu saptanmıştır. Hormon ve koku reseptörleri, G_s ailesinin (G_s ve G_{olf}) üyeleri ile etkileşerek adenilat siklazi uyarır ve cAMP sentez hızını artırır. Bunlara ek olarak G_{sc} iskelet kasındaki dihidropiridine duyarlı voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarını uyarır ve kardiyak Na^+ kanallarının baskılanmasına yol açar (41,61).

Tablo 4.1: Memeli G-protein α -altbirimlerinin özellikleri (24)

Altbirim	Kütle (kDa)	Doku Dağılımı	Reseptörler	Efektörler
G_s				
$\alpha_s(S)$	44,2	Her yerde	β AR, glukagon,	$\uparrow$ Adenilat siklaz
$\alpha_s(L)$	45,7	Her yerde	diğerleri	$\uparrow$ Ca ⁺² kanalları
α_{olf}	44,7	Koku epiteli	Odorant	$\downarrow$ Na ⁺ kanalları $\uparrow$ Adenilat siklaz
G_i				
α_{i1}	40,3	Hemen hemen her yerde		$\uparrow$ K ⁺ kanalları
α_{i2}	40,5	Her yerde	M ₂ Cho, α_2 AR,	$\downarrow$ Ca ⁺² kanalları
α_{i3}	40,5	Hemen hemen her yerde	diğerleri	$\downarrow$ Adenilat siklaz
α_{oA}	40,0	Beyin, diğerleri	Met-Enk, α_2 AR,	$\uparrow$ Fosfolipaz C
α_{oB}	40,1	Beyin, diğerleri		$\uparrow$ Fosfolipaz A ₂
α_{t1}	40	Retinal çubuk hücreleri	Rodopsin	$\uparrow$ cGMP'ye özgü fosfodiesteraz
α_{t2}	40,1	Retinal koni hücreleri	Koni opsin	
α_g	40,5	Tat alma tomurcukları	Tat alma (?)	?
α_z	40,9	Beyin, adrenal plateletler	M ₂ Cho (?), diğerleri (?)	$\downarrow$ Adenilat siklaz (?), diğerleri (?)
G_q				
α_q	42	Hemen hemen her yerde	M ₁ Cho, α_1 AR,	$\uparrow$ Fosfolipaz C- β_1 ,
α_{11}	42	Hemen hemen her yerde	diğerleri	- β_2 , - β_3
α_{14}	41,5	Akciğer, böbrek, karaciğer	?	diğerleri (?)
α_{15}	43	B hücreleri, miyolid hücreleri	?	$\uparrow$ Fosfolipaz C- β_1 , - β_2 , - β_3
G₁₂				
α_{12}	44	Her yerde	?	?
α_{13}	44	Her yerde	?	?

$\alpha_s(S)$ ve $\alpha_s(L)$ sırasıyla kısa ve uzun formlara karşılık gelmektedir.

β AR : β -adrenerjik ; M₁Cho : M₁-muskarinik kolinerjik ; M₂Cho: M₂- muskarinik kolinerjik;

α_1 AR: α_1 -adrenerjik; α_2 AR: α_2 -adrenerjik; met-enk: met-enkefalin

G_i terimi ise ilk olarak adenilat siklazin baskılanmasından sorumlu G-proteinlerini belirtmek için ortaya atılmıştır. Günümüzde ise G_i , boğmaca toksini (pertussis toksin) substratı olan yüksek benzerlikte, ancak birbirinden farklı işlevlere sahip proteinleri içine almaktadır: G_{ai} ($G_{ai1}, G_{ai2}, G_{ai3}$), G_{ao} (G_{aoA}, G_{aoB}), G_{at} , G_{agust} , G_{az} . Bu gruptaki proteinlerin işlevleri kesin olarak belirlenmiş değilse de geniş bir reseptör grubuyla etkileştikleri ve adenilat siklaz, fosfolipazlar ve iyon kanallarını da içeren birçok efektör sistem üzerinde etkiye bulundukları bilinmektedir (21). G_i ailesinden olan G_{oa} beyin zar proteinlerinin % 1-2' sini oluşturur ve daha çok nöronal konilerde bulunur. Koku alma epitelyumunda bulunan ve koku reseptörleri ile bağlantılı G_{of} proteini adenilat siklazin kokuya özgün formu ile etkileşir. Fotoreseptör hücrelerinin dış segmentinde bulunan rodopsin ise ışık ile uyarılır ve transdusin 1 (G_{t1})' i aktive eder. Uyarılmış G_{t1} cGMP-özgün fosfodiesterazı uyararak cGMP' nin sitoplazmik derişiminde azalmaya yol açar. Retinal konilerde bulunan G proteini ise transdusin 2 (G_{t2}) olarak isimlendirilir. G_{t2} koni opsinleri ile bağlantılıdır ve farklı bir fosfodiesterazı aktive eder. Transdusine benzer bir başka G proteini sadece tat alma tomurcuklarında ekspres edilir ve "gusducin" G_g olarak anılır. G_g ile transdusin amino asit dizileri % 80 benzerlik göstermektedir (42).

4.2 G-Proteinleri Üzerine Yapılan Yapısal Çalışmalar

G-proteinlerinin klonlanması, ekspresyonu ve mutasyon analizleri bu proteinlerin reseptör ve efektörlerle olan etkileşimlerini, GTP hidroliz mekanizmasını ve G-proteinlerinin membrana bağlanmasında rol alan yapısal bileşenleri büyük ölçüde aydınlatmıştır (5). Bununla beraber, hücrenin belli bir uyarıya verdiği yanıtın sorumlu bu anahtar moleküllerin çeşitli reseptör ve efektör moleküllerle etkileşimlerinde gösterdikleri özgünlüğün moleküler temeli, G_α - $G_{\beta\gamma}$ etkileşiminin nasıl gerçekleştiği, GTP-hidrolizini belirleyen parametrelerin ne olduğu gibi birçok soru henüz yanıt beklemektedir. G-proteininin yapı-işlev bağlantısını inceleyerek bu sorulara açıklık kazandırmayı amaçlayan yapı çalışmaları son yıllarda yoğunluk kazanmıştır (5). Bugüne dek G_{at} -GTP γ S (50), G_{at} -GDP (35), G_{at} -AlF₄ (62), G_{ai} -GTP γ S, G_{ai} -AlF₄ (11), G_{ai} -GDP (45)'nin aktif ve aktif olmayan formlarının kristal yapıları çözülmüştür.

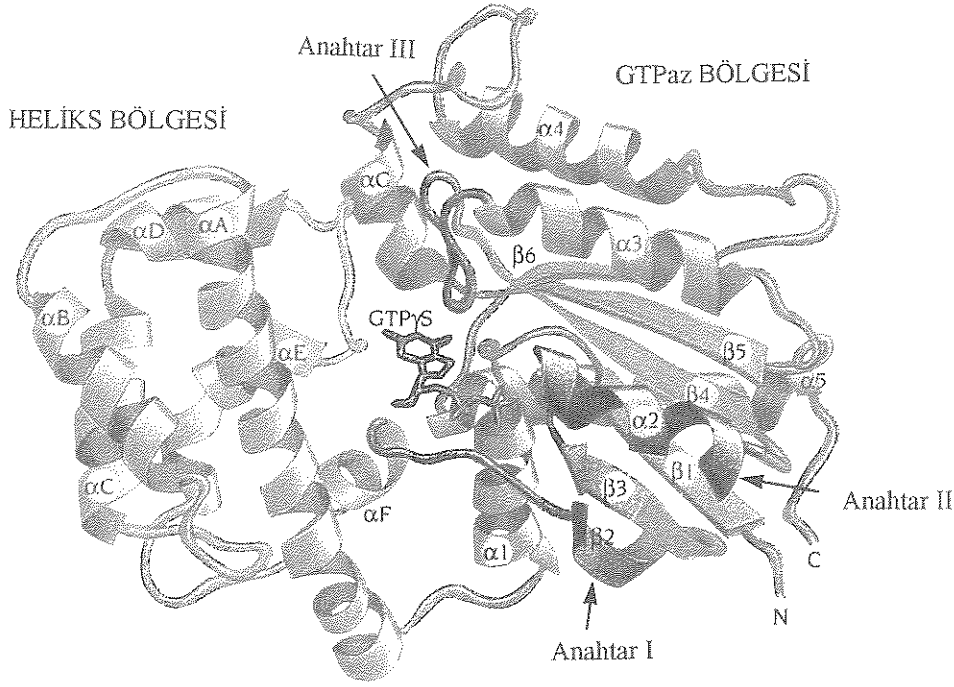
G_{α} 'nın ekspresyonu ve saflaştırılması çalışmaları daha önce gerçekleştirilmişse de (37), henüz yapısal bir çalışma yayınlanmamıştır.

Transdüsin kristalleri ile yapılan yapı analizleri α -altbiriminin iki bölgeden oluştuğunu göstermektedir. GTPaz ailesine üye tüm proteinlerde gözlenen ortak bir GTPaz bölgesi ve heterotrimerik G-proteinlerine özgü α -heliks bölgesi.

GTPaz bölgesi altı uzun β -şeridi ($\beta 1$ - $\beta 6$) çevreleyen beş α -heliks'ten oluşmuştur ($\alpha 1$ - $\alpha 5$). β -şeritlerinin beşi birbirine paralel, bir tanesi ise ($\beta 2$) diğerlerine anti-paraleldir. Heliks bölgesi tümüyle α -helikal ikincil yapıya sahiptir ve uzun bir merkezi heliks (αA) beş kısa heliks tarafından çevrelenmiştir (αB - αF) (Şekil 4.1). Bunlar da bağlaç 1 (54-58) ve bağlaç 2 (173-179) bölgeleri ile GTPaz bölgesine bağlanmışlardır. Bu iki bölgenin arasında nükleotitlerin sıkıca bağlanabileceği derin bir yarık vardır. Altbirimin Mg^{+2} ve GTP-bağlı formlardaki fosfatlarla etkileşmesinde ise anahtar I, II ve III bölgeleri olmak üzere üç önemli bölge tanımlanmıştır (57). Ser 173-Thr 183 bölgesi anahtar I; Phe 195-Thr 215 bölgesi anahtar 2; Asp 222-Arg 238 arasındaki halka anahtar 3 bölgesi olarak adlandırılmıştır (57).

G_{β} altbirimi yapısal olarak N-ucundaki yaklaşık 20 amino asit içeren α -heliks yapısındaki bir bölge ile yedi kez tekrar eden bir motiften oluşan pervane şeklindeki bir başka bölge olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Yedi kez tekrarlanan dizi WD tekrarı olarak adlandırılır ve pekçok farklı hücresel süreçte rol alan WD40 ailesine üye proteinlerde görülür.

Heterotrimer yapıda, merkezi kanalın dar ucunda β ile iki temas bölgesine sahip α -altbirimi yer alır. G_{α} 'nın N-ucu normalde serbest ve düzensiz bir yapıdayken, β -altbirimiyle etkileşerek kararlı hale ulaşır. α -altbirimi, γ -altbirimine tam zıt yönde bulunduğundan, aralarında bağlantı yoktur. γ -altbiriminin amino ucu β -altbiriminin α -heliks yapıdaki bölgesiyle sarmal oluşturur.



Şekil 4.1 : G_{α} -GDP yapısının şematik gösterilişi. GTPaz bölgesini oluşturan α -heliks ve β -şeritleri *ras* p21'e göre numaralandırılmıştır. G_{α} 'ya özgü heliksler ise A-G arasındaki harflerle gösterilmiştir (57).

4.3 Hematopoiesis

Kemik iliğindeki çok-yönlü (pluripotent) hemopoietik kök hücreden, çeşitli kan hücrelerinin oluşum ve gelişim aşamalarını içeren sürece hematopoiesis denir. Çok-yönlü kök hücre seyrek olarak normal bir şekilde bölünerek ya "self renewal" (kendini yenileyici çok-yönlü hemopoietik kök hücre) veya koloni oluşturan hücreleri (colony-forming cells (CFCs)-committed progenitor cells) oluşturur. Bu öncül hücreler, özgün büyüme faktörleri tarafından büyümeye indüklenerek, bölünme yeteneklerini kaybederler ve terminal olarak kan hücrelerine farklılaşırlar. Çok-yönlü kök hücrenin bölünmesiyle oluşan lenfoid kök hücrelerden, T lenfositleri ve/veya B lenfositleri oluşur.

Farklı kök hücrelerin büyüme ve çoğalmaları büyüme faktörleri olarak adlandırılan çok sayıda protein tarafından kontrol edilir. Bu bölünmeyi uyaran protein hormonları, hematopoietik büyüme faktörleri (HGFs: hematopoietic growth factors) olarak isimlendirilir. Bu hormonlardan birisi eritrosit yapımını uyaran eritropoietin' dir. Bir diğer grup ise kemik iliğindeki öncül hücreleri uyarak koloni oluşumuna neden olan koloni uyarıcı faktörlerdir (colony-stimulating factors; CSF) (1,23).

Hematopoietik büyüme faktörleri, kan hücrelerinin işlevini artırırlar ve bu hücreler kemik iliğinden kana serbestlenirler. HGF' ler, kan hücrelerinin farklılaşmasını değil büyümeyi kolaylaştırırlar. Farklılaşma indükleyicileri adını alan bir diğer grup protein de hücrelerin farklılaşmasını kolaylaştırma işlevini üstlenir. Bunların her biri kök hücrelerin bir tipinin, erişkin kan hücrelerin son tipine doğru bir veya daha fazla basamakta farklılaşmasına neden olur. Büyüme faktörleri ve farklılaşma indükleyicilerinin salgılanması kemik iliği dışındaki faktörler tarafından kontrol edilir.

4.4 Eritropoiesis

Eritrosit kandaki en yaygın hücre tipidir. Pratik olarak olgun eritrositte çekirdek, endoplazmik retikulum, mitokondri ve ribozomlar bulunmaz sadece hemoglobin bulunur. Bu yüzden olgun eritrosit büyüyemez ve bölünemez. Eritrositler karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından fagositoz yoluyla sindirilerek yok olur.

Eritrosit yokluğunda veya oksijen eksikliğinde, böbrekteki kılcal damar endotel hücrelerinden (ve çok az miktarda karaciğerden) eritropoietin hormonu kana serbestlenir. Eritropoietin hormonu öncül eritrosit hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve bu hücreler eritrosite farklılaşır. Miyeloid kök hücrenin eritroid farklılaşmaya yönlendirilmesi için eritroid öncü hücrede bir dizi gelişimsel aşamanın başlangıcına ihtiyaç duyulur. *In vitro* şartlarda gösterildiği gibi, eritroid öncülerin bu farklı aşamaları proliferasyon yetenekleri, çeşitli büyüme faktörleri ve eritropoietin hormonuna yanıtlarıyla ayırt edilmektedir .

ve *in vivo* gösterilen eritropoietin, hem mitojenik hem de farklılaştırma işlevleri taşıyıcı (1,23).

4.5 G Proteinleri ve Farklılaşma

G proteinleri büyüme, farklılaşma ve gelişme gibi önemli biyolojik aşamaların kontrolünde merkezi rol oynarlar (40). Sinir büyüme faktörüyle işlem görmüş Pheochromocytoma PC12 hücrelerinde G_o ' ın büyüme konilerinde yerleşik bulunması, G proteinlerinin büyüme ve gelişimde rolü olabileceğini düşündürmüştür (63). Bunun arkasından PC12 hücrelerinde G_o ekspresyonunun baskılanması ile sinir büyüme konilerinin çıktığı bildirilmiş (64), nöroblastoma X glioma hibrid NG 108-15 hücre soylarında G_o düzeylerinde artışın farklılaşma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (47).

3T3-1 fibroblast hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşmasında G_{sa} , G_{oa} ve G_{ia} gibi bazı G protein α alt birim düzeylerinde değişikliklerin olduğu belirlenmiştir (18,72). Bu hücrelerin yağ hücrelerine indüklenmesi ile G_{sa} düzeyinde azalma saptanmış, G_{sa} ' ya antisens oligonükleotitlerin farklılaşmayı hızlandırdıkları ayrıca herhangi bir indükleyici ajan olmadan da tek başına adipogenez uyardıkları gösterilmiştir (71). $G_{i2\alpha}$ ekspresyonundaki artışın terminal farklılaşmayı uyardığının gösterilmesi de G_{sa} ve $G_{i2\alpha}$ proteinlerinin adipogenezde zıt etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür. Bir başka çalışmada ise $G_{q/11\alpha}$ ekspresyon düzeyleri adipogenezin konfluent öncül yağ hücreleri, farklılaşmış öncül yağ hücreleri ve olgun yağ hücreleri olmak üzere üç farklı aşamasında karşılaştırılmıştır (14). Retinoik asit ile farklılaşmaya indüklenmiş F9 tetratokarsinoma hücrelerinde farklılaşmayı $G_{i2\alpha}$ ' ın baskıladığı G_{sa} ' ın ise uyardığı gösterilmiştir (15,17).

Eritropoietine-duyarlı fare eritrolösemi soyu RED-1 hücrelerinde yapılan çalışmalarda terminal farklılaşmanın $G_{i3\alpha}$ kaybı ve $G_{i2\alpha}$ ' ın sitozolik formundaki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (32). Normal insan miyeloid öncülleri ve olgun kan hücreleri ile yürütülen bir başka çalışmada granülositik ve eritroid farklılaşmanın her aşamasında G_{sa} , $G_{i2\alpha}$ ve $G_{q/11\alpha}$ proteinlerinin yüksek düzeylerde, $G_{i2\alpha}$ ve $G_{i6\alpha}$ proteinlerinin ise soya özgün bir şekilde ekspres edildikleri belirlenmiştir (67). Normal hematopoietik hücrelerde hücre farklılaşması esnasında $G_{i6\alpha}$ proteinlerinin her iki formunun ekspresyonunda farklılıklar belirlenmiştir.

Eritropoietine-duyarlı fare eritrolösemi soyu RED-1 hücrelerinde yapılan çalışmalarda terminal farklılaşmanın G_{13a} kaybı ve G_{12a} 'nın sitozolik formundaki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (32). Normal insan miyeloid öncülleri ve olgun kan hücreleri ile yürütülen bir başka çalışmada granülositik ve eritroid farklılaşmanın her aşamasında G_{9a} , G_{12a} ve G_{q11a} proteinlerinin yüksek düzeylerde, G_{12a} ve G_{16a} proteinlerinin ise soya özgün bir şekilde ekspres edildikleri belirlenmiştir (67). Normal hematopoietik hücrelerde hücre farklılaşması esnasında G_{16a} proteinlerinin her iki formunun ekspresyonunda farklılıklar belirlenmiştir.

4.6 Aminometiltransferaz (T-) Proteinini:

Glisin parçalama sistemi, glisin'in tersinir olarak oksitlenmesini katalize ederek karbondioksit, amonyak, metilentetrahidrofolat ve indirgenmiş piridin nükleotitinin oluşmasına yol açan çok enzimli bir komplekstir. Sistem P-, H-, T- ve L- proteinleri olarak adlandırılmış dört proteinden oluşmaktadır (52).

P-proteini glisinin piridoksal P-bağımlı dekarboksilasyonunu katalizleyerek geri kalan aminometil grubunun H-proteininin lipoil prostetik grubuna aktarılmasını sağlar. T-proteini (aminometiltransferaz) H-proteinine bağlı ara üründen amonyağın serbestlenmesini ve tetrahidrofolat varlığında metilentetrahidrofolat'ın sentezini katalizler. L-proteini oluşan H-proteininin dihidrolipoil kalıntısının yeniden oksitlenmesini ve NAD'nin indirgenmesini katalizleyen bir lipoamid dehidrojenaz'dır.

E. coli'de glisin parçalama sistemi eksojen glisin tarafından indüklenebilir. P-, H- ve T- proteinleri *gcv* yapısal genleri tarafından kodlanır. *gcv* operonunun promotörü tarafından yönlendirilen ekspresyon *gcvT*, *gcvH* ve *gcvP* gen ürünleri olan T-proteini (363 amino asit, 40 kDa), H-proteini (128 amino asit, 13.6 kDa), ve P-proteini (956 amino asit, 104.2 kDa)'nin sentezlenmesini başlatır (52).

T-proteinlerinin H_4 folat bağlama bölgeleri, H-proteini ve glisin kırma sisteminin diğer bileşenleriyle etkileşim bölgeleri üzerine pek az bilgi vardır. Yapısal çalışmaların çok miktarda enzimatik olarak aktif proteine ihtiyaç göstermesi nedeniyle araştırmalar bu proteinin klonlanma ve saflaştırma çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır (53, 8).

4.7 Sinkrotron X-ışınları ile küçük açı saçılması: teori ve yapı analizinde kullanılması

Sinkrotron radyasyonu ışık hızına yakın hızlarda hareket eden yüklü parçacıkların ivmelerindeki değişimle yayımlanan beyaz ışıktır . Bu ışığın karakteristik özellikleri çeşitli kitap ve kaynaklarda anlatılmıştır (33,34).

Sinkrotron radyasyonunun yüksek spektral parlaklığı , dalgaboyunun ayarlanabilirliği ve atmalı zamansal yapısı (pulsed time structure) depolama halkalarının X-ışın deneylerinde tercih edilmesine yol açmaktadır. Bunlara ek olarak , iyi odaklanabilir olması , örnek üzerinde yoğun bir monokromatik foton akısı elde edebilmek amacıyla kristal monokromatörlerin ve toplam yansıma aynalarının kullanımını olanaklı kılmaktadır. Yüksek foton akısı, biyolojik örneklerin düşük saçma gücü ve kısa yaşam sürelerinin neden olabilecekleri belirsizliklerin giderilmesini sağlar.

X-ışınları kristalografisi, kristalleri oluşturulabilen malzemelerin statik 3 boyutlu yapısı hakkında en detaylı bilgiyi veren yöntemdir. X-ışınları küçük açı saçılması ise kristalize olmayan biyolojik makromoleküllerin çözelti içindeki yapıları ve çeşitli etkileşimler sırasında ortaya çıkan zamana bağlı yapı değişikliklerini izlemekte kullanılmaktadır (59).

Bir örnek üzerine düşen X ışınları örneğin elektron yoğunluğunun dağılımına bağlı olarak saçılırlar. Saçılma vektörü, s , saçılma açısı θ 'nın (gelen ışın ile saçılan ışın arasındaki açı) bir fonksiyonudur ve $|s| = 2\sin\theta / \lambda$ bağıntısı ile verilir. λ gelen ışının dalga boyudur (9).

Saçılan X-ışınlarının şiddeti ($I(s)$) ve örnekteki elektron yoğunluğunun dağılımı arasındaki ilişki

$$\begin{aligned} I(s) &= |F(s)|^2 \\ &= \left| \sum_{i=1}^N f_i \exp(2\pi i(s \cdot r)) \right|^2 \end{aligned}$$

şeklindedir . $F(s)$, N atomdan oluşan bir molekülün saçılma genliği; f_i , i. atoma ait elektron yoğunluğunun Fourier transformu ve r , molekül içerisindeki atomlar arası mesafeleri göstermektedir (60).

İdeal çözeltilerde tüm çözünen parçacıkların eş ve yönelimlerinin rasgele olduğu kabul edilir. Bu nedenle saçılma deseni çözünen parçacıkların yalnızca $p(r)$ uzaklık dağılım fonksiyonu ile temsil edilen, küresel ortalama yapıları ve şekilleri hakkında bilgi verir. $p(r)$, çözünen parçacıklardan kaynaklanan fazla elektron yoğunluğu $\rho(r)$ 'ın küresel ortalama otokorelasyon fonksiyonudur ve $p(r) r^2$ parçacığın içerisindeki bir noktayı r ve $r+dr$ uzaklık aralığında bulma olasılığıdır (60).

Küresel bir parçacık için $p(r)$ iki bölgeye sahiptir :

- (a) komşu atom çiftlerinin neden olduğu keskin dalgalanmalar bölümü ($0.1 \text{ nm} \leq r \leq 0.5 \text{ nm}$) ve yapısal bölgelere (örn. α -heliks) karşılık gelen sönümlü salınımlar bölgesi.
- (b) Daha geniş molekül içi vektörlere karşılık gelen yumuşak bölge. r 'nin belli bir değeri geçmesi durumunda ($r = D_{\max}$) , $p(r)$ kaybolur ve bütün vektörler tampondan kaynaklanır.

Küresel parçacıkların saçılma eğrilerinin analizi çoğunlukla Guinier yaklaşımına dayanmaktadır. Bu yaklaşıma göre, çok küçük açılarda, saçılma eğrisi aşağıdaki eşitlik ile temsil edilebilir:

$$I(s) = I(0) \exp(-4\pi^2 R_g^2 s^2 / 3)$$

$I(0)$, saçılmadan geçen ışın şiddetidir ve parçacığın molekül ağırlığıyla orantılıdır. R_g ise girasyon yarıçapıdır. Buradan görüleceği gibi, molekülden büyük ölçülerde ve özgün olmayan herhangi bir kümelenme saçılma deseninde büyük sapmalara yol açar. Saçılma yoğunluğunun homojen olduğu parçacıklar için bu yaklaşımlar geçerli sonuçlar vermektedir.

[†]Koyu yazılı harfler vektörel büyüklükleri temsil etmektedir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Radyoizotoplar

[γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l), Amersham

[³⁵S]GTP γ S (1000 Ci/mmol, 1 μ Ci/ μ l), Amersham

Elektroforetik Gereçler

Deneylerin bir kısmı Bio-Rad mini gel elektroforez düzeneği (dikey), büyük gel elektroforez düzeneği (dikey), Bio-Rad elektroforez gel düzeneği (yatay) ve elektroforetik transfer aleti kullanılarak, bir kısmı ise Novex elektroforez sisteminden yararlanılarak gerçekleştirildi.

Oligonükleotit Problar:

28S rRNA probunun dizisi: 5' AAC GAT CAG AGT AGT GGT

ATT TCA CC 3'

G_{sa} probunun dizisi: 5' TCC AGA GGT CAG GAC ACG GCA

GCG AAG CAG GTC CTG GTC 3'

G Protein Antikorları:

Anti-G_{αontak} sentetik peptit (P960)*, GTSNSGKSTIVKQMK

Anti-G_{βγ} (S217)

Anti-G_{sa} (RM/1), NEN-Dupont NEI-805**

Anti-G_{i12α} (AS7-Transducin), NEN-Dupont NEI-801

Anti-G_{αα} (GC/2), NEN-Dupont NEI-804

Anti-G_{qa}, İnternal (115-113), Calbiochem

Anti-G_{qa}, AS 339***

*P960 ve S217, Prof. Alfred Gilman' ın laboratuvarından temin edilmiştir.

**A.Ü. Tıp Fak. 'den Dr. Ongun Onaran 'nın hediyesidir.

***Dr. Nürnberg tarafından temin edilmiştir.

Kromatografi Maddeleri:

DEAE-Sephacel (Pharmacia)

Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow, High&Low Subst. (Pharmacia)

HiLoad 26/10 Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)

HiLoad 26/60 Superdex 75& Superdex 200 prep grade (Pharmacia)

Mono-Q preppacked HR5/5 (Pharmacia)

Resource Q (Pharmacia)

Hidroksiapatit (Econo-Pac CHT-II Cartridge, Macro-Prep CHT-II, 80 µm, Bio-Gel HTP, Bio-Rad)

pT7/NdeI/G_{0α} plazmidini içeren BL21(DE3) hücreleri Dr. Joel Moss (NIH) , plazmid içermeyen kontrol BL21(DE3) hücreleri Dr. Füsun Gümüşel (TÜBİTAK) tarafından sağlanmıştır.

Kimyasallar

Saf G _{0α}	Calbiochem
Plazmid izolasyon kolonu	Qiagen
LB besi ortamı	Gibco
Agaroz	Bio-Rad
Alkalen fosfataz kojuge anti-tavşan IgG	Sigma
Amphoteresin B	Sigma
Aprotinin	Sigma
Bakır sülfat	Sigma
Benzidindihidroklorür	Sigma
Bromokloroindolil fosfat (BCIP)	Promega
Fetal dana serumu	Sera-Lab
Hemin	Sigma
Löpeptin	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Nitroblutetrazolyum (NBT)	Promega

Dupl.

1999-216

**G-PROTEİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

PROJE NO: SBAG –1710

Prof.Dr.BEKİ KAN
Doç.Dr.ZEHRA SAYERS
Dr.BAHİRE KÜÇÜKKAYA
Dr.OYA ORUN

MART 1999
İSTANBUL

Oligo (dT) selüloz	Gibco
Otoradyogram filmi (X-Omat AR)	Kodak
Penisilin streptomisin	Sigma
Poloroid film (667)	Polaroid
RPMI Ortam 1640	Sigma
Sığır serum albumini (BSA)	Sigma

Diğer tüm kimyasallar Sigma ve Merck ürünleridir.

Çalışmada Kullanılan Aletler

pH metre	(Hanna)
Manyetik Karıştırıcı	(Hanna)
Su banyosu	(Kotterman)
Güç kaynağı	(Dan-Kar Corp.)
Vorteks	(Thermodyne)
Derin dondurucu	(So-Low)
Laminer Akım Kabini	(Kutay)
Karbondioksit inkübatörü	(Forma Scientific)
Spektrofotometre	(LKB Biochrom)
Işık mikroskobu	(Olympus-CH)
Etüv	(Mettler)
Filtre yıkama sistemi	(Millipore)
Vakum pompası	(Millipore)
Ultrasantrifüj	(Sorvall)
Distile su cihazı	(GFL-2002)
Hassas terazi	(Oertling)
Fotoğraf makinası	(Kodak)
Soğutmalı santrifüj	(Hettich)
Amicon ve Centricon yoğunlaştırma sistemleri	
FPLC	(Pharmacia-Biotech)

Saflaştırma aşamaları DESY’de yerleşik EMBL (Hamburg)’da, küçük açı saçılma deneyleri ise DESY (Hamburg) HASYLAB’daki sinkrotron X-ışın kaynağı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi

Hücre Yıkama Tamponu, (PBS) pH 7.4

140 mM NaCl
8 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄
3 mM KCl

Benzidin Boya Stok Çözeltisi

0.5 M Glasiyel Asetik Asit
%0.2 (w/v) Benzidin dihidroklorür

1 mM Hemin Çözeltisi, pH 8.0

6.5 mg Hemin
0.25 ml KOH (1N)
0.1ml Tris-HCl, pH 7.8
8.89 ml Etilen glikol
0.2 ml 1 N HCl
0.4 ml distile su

RPMI Ortam 1640

RPMI 1640 10.4 g
% 10 (v/v) Fetal Dana Serumu
20 mM Hepes
2 mM L-Glutamin
% 0.1 (w/v) Sodyum Bikarbonat

100 Ü/ml Penisilin
100 µg/ml Streptomisin
Amphoteterisin B

Homojenleştirme Tamponu

20 mM Hepes pH 8.0
1 mM EDTA
0.1 mM PMSF
10 µg/ml Leupeptin
2 µg/ml Aprotinin

Beyin Yıkama Tamponu (A Cözeltisi)

10 mM Tris-HCl, pH 7.5
5 mM EDTA

Beyin Homojenleştirme Tamponu 1 (B Cözeltisi)

10 mM Tris-HCl pH 7.5
5 mM EDTA
300 mM Sukroz
0.1 mM PMSF

Beyin Homojenleştirme Tamponu 2 (C Cözeltisi)

10 mM Tris-HCl, pH 7.5
2 mM EDTA
300 mM Sukroz

TED Cözeltisi

20 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA
0.1 mM PMSF
1 mM DTT

Elektroforez Tamponu (2x)

Tris	59 g
Glisin	270 g
Sodyum Dodesilsülfat	18 g
Distile su ile 18 litreye tamamlanır.	

PAGE (Büyük) Ayırışım Geli (% 10)

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
% 10 (w/v) Sodyum Dodesilsülfat	0.1 ml
Akrilamit/Bisakrilamit (30:0.8)	3.35 ml
% 10 (w/v) Amonyum Persülfat(APS)	80 µl
Temed	6 µl
Distile su	4.0 ml

PAGE (Büyük) Derişim Geli (% 4)

1 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
% 10 (w/v) Sodyum Dodesilsülfat	0.1 ml
Akrilamit/Bisakrilamit (30:0.8)	1.3 ml
% 10 (w/v) Amonyum Persülfat	80 µl
Temed	12 µl
Distile su	7.35 ml

SDS-PAGE Örnek Tamponu (4x)

1 M Tris-HCl, pH 6.8	2.0 ml
Gliserol	3.2 ml
% 20 (w/v) Sodyum Dodesilsülfat	1.0 ml
% 0.2 (w/v) Bromfenol Mavisi	0.4 ml
Distile su	1.4 ml

Gel Boyama Cözeltisi

- %0.2 (w/v) “Coomassie” Mavisi
- % 50 (v/v) Metanol (Ya da % 25 izopropil alkol)
- % 10 (v/v) Asetik asit

Gel’ den Boya Cıkarma Cözeltisi

- % 25 (v/v) İzopropil alkol
- % 10 (v/v) Asetik Asit

Transfer Tamponu (TB), pH 8.3

- 25 mM Tris
- 192 mM Glisin
- % 20 (v/v) Metanol

Tris-Tuz Tamponu (TBS), pH 8

- 37 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 25 mM Tris

Anti-G_{aortak} çözeltisi

- % 3 (w/v) BSA
- % 0.2 (w/v) NP40
- % 0.2 (w/v) Sodyum Azide
- 130 mM CaCl₂
- 60 mM NaCl
- Anti-tavşan G_{aortak} 10 µl
- 14 ml TBS içerisinde hazırlandı.

Blok Tamponu

- % 0.05 (v/v) Tween-20
- % 1 (w/v) BSA

TBS tamponunda hazırlandı.

İkincil Antikor Cözeltisi

Anti-tavşan IgG-Fc Alkalen fosfataz konjuge TBS içerisinde 7500 kez seyreltilerek hazırlandı.

Gelistirici "Developer" Tampon

100 mM Tris-HCl, pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

Örnek Seyreltme Tamponu

20 mM HEPES, pH 8.0

1 mM DTT

1 mM EDTA, pH 8.0

Nitroselüloz Filtreleri Yıkama Tamponu

20 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM NaCl

25 mM MgCl₂

Ponso-S Boyama Cözeltisi

Asetik Asit 2.5 ml

Ponso-S 0.05 g

Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4M Guanidyum Tiyosiyanat Cözeltisi (GITC)

4 M Guanidyum tiyosiyanat

25 mM Sodyum Sitrat pH 7.0

0.5 % (w/v) N-Loril Sarkozin

10XMOPS Tamponu pH 7.0

0.1 M MOPS

50 mM Sodyum Asetat

10 mM EDTA

% 1 Formaldehit-Agaroz Gel

Agaroz

2.7 g

10XMOPS

13.5 ml

% 37 (v/v) Formaldehit

21.7 ml

DEPC' li su

234.9 ml

RNA Örneklerini Yükleme Tamponu

1XMOPS pH 7.0

% 6 (v/v) Formaldehit

% 50 (v/v) Deiyonize Formamit

10X RNA İzleme Boyası

% 90 (v/v) Gliserol

% 0.5 (w/v) Bromfenol Mavisi

% 0.5 (w/v) Ksilen Siyanol

1 mM EDTA, pH 7.0

20XSSC, pH 7.0

3 M NaCl

0.1 M Na-Sitrat

10XKinaz Tamponu

500 mM Tris-HCl, pH 7.4

100 mM MgCl₂

50 mM DTT

Luria-Bertani besi ortamı

%1 w/v tripton

%0.5 w/v maya özütü

%1 w/v NaCl, pH: 7.2

Zenginleştirilmiş Luria-Bertani besi ortamı

%1 w/v tripton

%0.5 w/v maya özütü

%1 w/v NaCl, pH: 7.2

%0.2 gliserol

%0.4 glukoz

50 mM potasyum fosfat, pH: 7.2

P1 Tamponu

28 mM Tris, pH: 8.8

10 mM EDTA

0.1 mg/ml RNase

P2 Tamponu

200 mM NaOH

%1 SDS

P3 Tamponu

3 M potasyum asetat, pH: 5.5

QBT Tamponu

750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH: 7

%15 etanol

%0.15 Triton X-100)

QC Tamponu

1 M NaCl

50 mM MOPS

%15 etanol,pH:7.0

QF Tamponu

1.25 M NaCl

50 mM Tris

%15 etanol,pH:8.5

Parçalama Tamponu (TEDP)

50 mM Tris, pH:8.0

1 mM EDTA

2 mM DTT

0.1 mM PMSF

0.1 mg/ml lizozim

DEAE-Sefasel Toplama Tamponu

400 mM NaCl içeren TEDP

Fenil-Sefaroz Başlama Tamponu (FS Tampon A)

1 M amonyum sülfat ve 25 μ M GDP içeren TEDP

Fenil-Sefaroz Toplama Tamponu (FS Tampon B)

%35 gliserol ve 25 μ M GDP içeren TEDP

Q-Sefaroz Başlama Tamponu (QS Tampon A)

50 mM Tris,pH:8.0, 2 mM DTT

Q-Sefaroz Toplama Tamponu (QS Tampon B)

300 mM NaCl içeren başlama tamponu

Hidroksiapatit Başlama Tamponu (H Tampon A)

10 mM Tris, pH:8.0 / pH:6.8
10 mM potasyum fosfat, pH:8.0 / pH:6.8
2 mM DTT

Hidroksiapatit Toplama Tamponu (H Tampon B)

10 mM Tris, pH:8.0 / pH:6.8
200 mM potasyum fosfat, pH:8.0 / pH:6.8
2 mM DTT

Gel Filtrasyon Tamponu

50 mM Tris, pH:8.0
2 mM DTT
150 mM NaCl

Mono Q ve Resource Q Başlama Tamponu (MQ , RQ Tampon A)

50 mM Tris, pH:8.0
2 mM DTT

Mono Q Toplama Tamponu (MQ Tampon B)

300 mM NaCl içeren başlama tamponu

Resource Q Toplama Tamponu (RQ Tampon B)

500 mM NaCl içeren başlama tamponu

GTPyS Bağlama Testi Örnek Seyreltme Tamponu

20 mM Na-Hepes, pH:8.0
1 mM EDTA
1 mM DTT
%0.1 v/v lubrol

GTP γ S bağlama karışımı (30 μ l)

50 mM Na-Hepes, pH:8.0

60 mM MgCl₂

2 mM EDTA

200 mM NaCl

2 mM DTT

1 μ M GTP γ S

[³⁵S] GTP γ S, 10⁵ sayım.dak⁻¹

Filtre Yıkama Cözeltisi

20 mM Tris-HCl, pH:8.0

100 mM NaCl

25 mM MgCl₂

Yöntemler:

5.1 G-Proteinlerinin Eritroid Hücre Farklılaşmasındaki Rolü

5.1.1 K562 İnsan Eritrolösemi Hücrelerinin Çoğaltılması

Sıvı azotta (-170°C) dondurularak saklanan K562 hücreleri 37°C'ta su banyosunda çözöldü ve hemen RPMI medyum 1640 içerisine alınarak santrifüj edildi ve dondurma işlemi sırasında kullanılan dimetilsülfoksit'in ortamdan uzaklaşmasını sağlamak için, RPMI 1640 medyumla 350xg'de iki kez yıkandı. Çökeleğe 5 ml medyum eklenerek, kültür şişelerine pasaj yapıldı.

5.1.2 K562 Hücrelerinin Farklılaşmaya İndüklenmesi

K562 hücreleri, başlangıçtaki sayıları 1X10⁵ hücre/ml olacak şekilde 20 μ M hemin varlığında farklılaşmaya indüklendi.

5.1.3 Benzidin Boyama Yöntemi

Benzidin boyası, benzidin boya stok çözeltisinden 2.5 ml, %35'lik H_2O_2 'den 10 µl alınarak taze olarak hazırlandı. 1 ml hücre süspansiyonuna 0.1 ml boya ilave edildi ve beş dakika bekletilerek 100xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlem sonrasında mavi renk alanlar hemoglobinin sentezinin arttığı farklılaşmış (benzidin pozitif) hücreler olarak belirlendi (22). Bundan sonra çökelek hemositometreye yayılarak ışık mikroskopunda sayım yapıldı.

5.1.4 Hemoglobin Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Kontrol ve farklılaşmış (beşinci gün) K562 hücrelerinin çökelekleri ($\sim 2 \times 10^6$ hücre) 3 kez 0.15 M NaCl ile yıkandı ve 3-4 kez dondurma-çözünme yöntemiyle lize edildi. Bu lizat üzerine 1 ml su ve 0.2 ml benzidin çözeltisi (5 M asetik asit içerisinde %0.2 benzidin dihidroklorür ve %0.2 H_2O_2) ilave edildi (16).

5.1.5 Ham Zar Kesimlerinin Hazırlanması

Hücre süspansiyonları 300xg'de 10 dakika santrifüjlenerek medyumlardan uzaklaştırıldı (Tablo 5.1). Hücre çökelekleri hücre yıkama tamponu, PBS ile iki kez yıkandı ve homojenleştirme tamponu içerisinde alınarak 20 dakika buzda bekletildikten sonra el homojenizatörü ile patlatıldı. Elde edilen hücre özütleri 400xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (sitoplazmik kesim-S4) 12000xg'de 30 dakika santrifüjlenerek, çökelek (ham zar kesimi-P12) homojenleştirme tamponu ile iki kez yıkandı ve hücre kesimleri $-70^\circ C$ 'da saklandı (6).

5.1.6 Sıçan Beyin Dokusundan Zar Kesimi Eldesi

Tüm işlemler proteaz inhibitörü PMSF varlığında $0-4^\circ C$ 'de yürütüldü. Kafaları kesilerek öldürülen sıçanların beyin dokusu hemen çıkarılarak $+4^\circ C$ 'ta A çözeltisi içine alındı, kandan arındırıldı ve tartıldı. Bir ağırlık birimine iki hacim B çözeltisi eklenerek, doku küçük parçalara kıyıldı ve el poteri ile homojenize edildi. Homojenleşmiş doku Dupont-Sorvall Combi ultrasantrifüjünde T-875 tipi rotorla 30000xg'de 60 dakika santrifüjlendi. Çökelek TED çözeltisi içinde el poteri ile 3 kez homojenize edildi, %1 (w/v) Na-deoksikolat eklendi ve manyetik karıştırıcı ile $0^\circ C$ 'ta

30 dakika yavaşça karıştırıldıktan sonra 142000xg'de 75 dakika santrifüjlendi. Çökelek atıldı, üst sıvı (S142) -70°C'ta saklandı (28).

5.1.7 Toplam RNA İzolasyonu

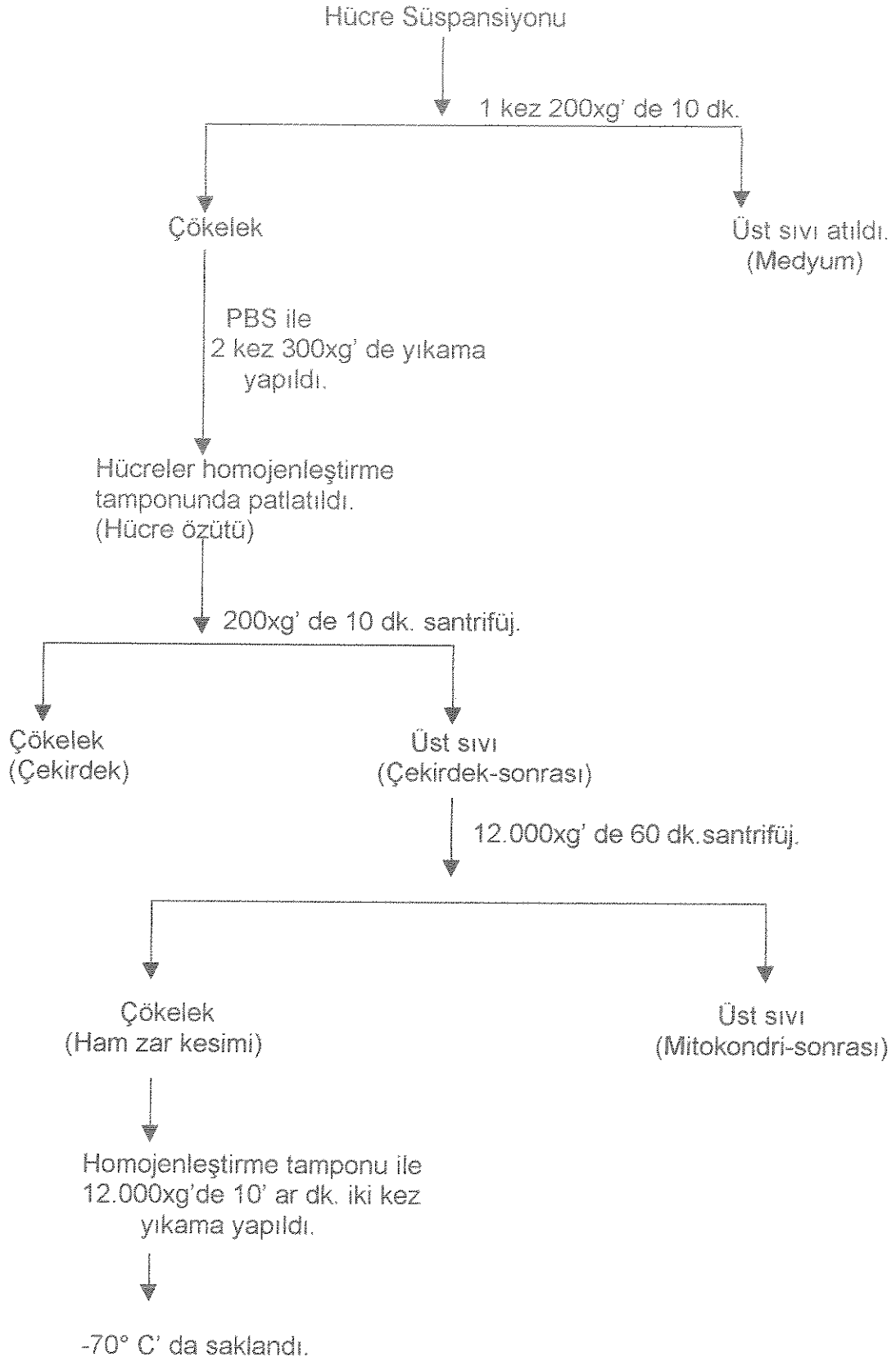
Tüm işlemler +4°C'ta yürütüldü. Kontrol ve farklılaşmış hücreler (5×10^7 hücre) altıncı günün sonunda toplanarak fosfat-tuz tamponuyla (PBS) 300xg'de, 10'ar dakika santrifüjlenerek 2 kez yıkandı. Çökelek 4 M guanidyum tiosiyanat (GITC) ve 0.1 M β -merkaptoetanol varlığında homojenize edildikten sonra sırasıyla 0.1 M sodyum asetat, pH 4.0, su ile doymuş fenol ve 1 ml kloroform-izoamilalkol (49:1) karışımı eklendi. 20 dakika buzda bekletilerek iki fazın oluşumu sağlandı ve örnek 20°C'ta gece boyu bekletildi. 10000xg'de çözülerek -20°C'ta gece boyu bekletildi. Çöken RNA 10000xg'de 10 dakika santrifüjlenerek toplandı ve 150 μ l, %75 (v/v) etanol içinde çözüldü. 10000xg'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra, çökelek dietilpirokarbonat ile işlem görmüş distile su içinde çözüldü (51).

5.1.8 RNA Miktar Tayini

Beşinci günün sonunda K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış gruplarından elde edilen RNA örneklerinin 260 nm dalgaboyundaki absorbands değerleri ölçüldü ve mililitredeki μ g RNA miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{RNA Miktarı } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki absorbands} \times 40 \mu\text{g} \times (\text{seyreltme faktörü/ml})$$

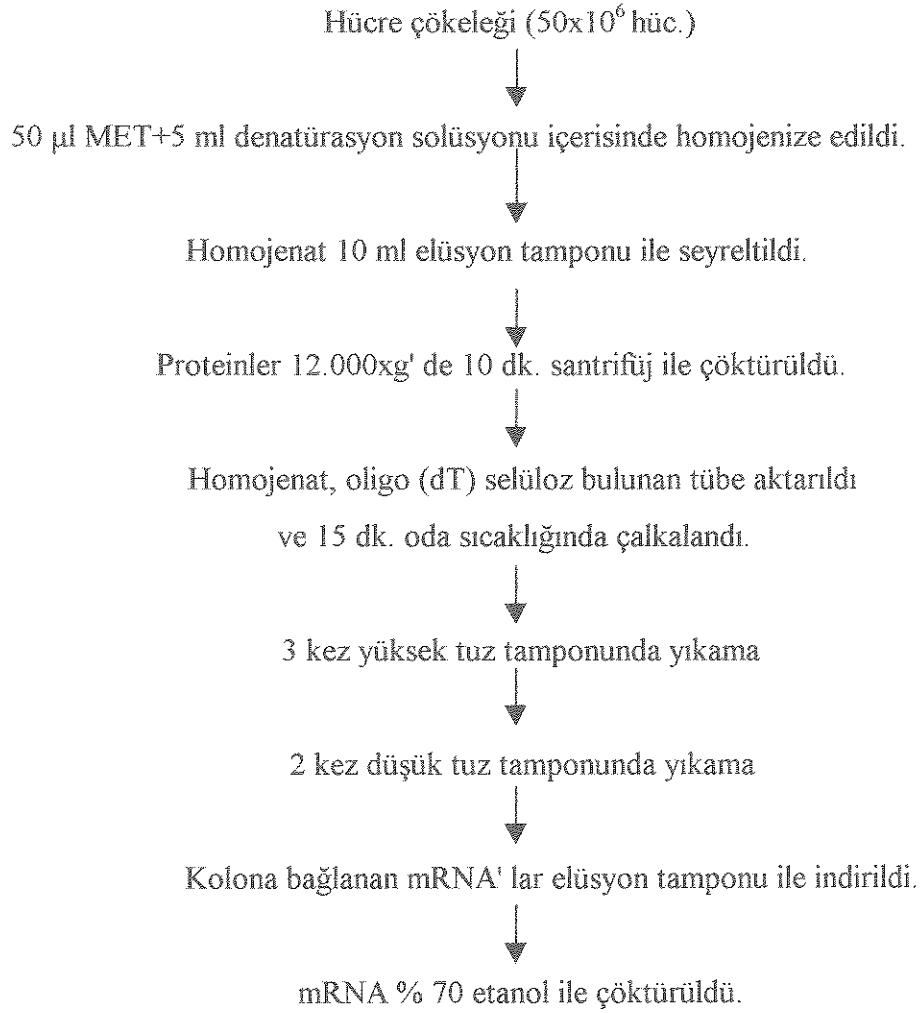
İzole edilen RNA'nın saflığını belirlemek amacı ile $A_{260/280}$ oranları okundu. $A_{260/280}$ oranı 1.65 ile 2.0 arasında değişen RNA örnekleri ile Northern transfer işlemi yapıldı.



Tablo 5.1. K562 hücrelerinde ham zar kesimlerinin eldesi.

5.1.9 Poli(A⁺)RNA (mRNA) İzolasyonu

Kontrol ve faklılaşmış hücrelerden mRNA Stratagene'nin mRNA izolasyon kiti kullanılarak elde edildi. Saflaştırma işlemi aşağıdaki akış diyagramı ile gösterilmiştir (Tablo 5.2).



Tablo 5.2: mRNA eldesi

5.1.10 RNA Örneklerinin Hazırlanması

5.7 µl RNA örneğine (RNA örnek hacmi uygun seyreltme ile 5.7 µl'ye getirildi ve RNA örnek hacminin 10 µl'yi aşmamasına dikkat edildi) 14.3 µl yükleme tamponu eklendi. 20 µl içerisindeki RNA örnekleri 55°C'ta, su banyosunda 15 dakika inkübe edildi ve 2 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra üzerine 2 µl, 10XRNA izleme boyası eklendi ve buzda bekletildi.

5.1.11 %1 Formaldehit Agaroz Gelinin Hazırlanması

2.7 g agaroz, 221.4 ml DEPC'li su ve 13.5 ml 10XMOPS içerisinde kaynatıldı, 16.1 ml %37 formaldehit ilave edildi ve 55°C'ta su banyosunda 15 dakika bekletildi. Karışım sonra gel tabağına döküldü ve 1-2 saat bekletildi. Denatüre RNA örnekleri formaldehit agaroz geline yüklendi, 40 volt'ta 30 dakika yürütüldükten sonra gece boyu 30 volt'ta yürütüldü. Elektroforez gece boyu, yaklaşık 20 saat yapıldı. Gel, elektroforez tankından çıkarıldıktan sonra, içerisine 500 ml dd(H₂O) ve 500 µl, 5 mg/ml EtBr bulunan pyrex tabakta oda ısısında 20 dakika çalkalandı. 500 ml, %20'lik etanol içerisinde yaklaşık 24 saat yıkama yapıldıktan sonra, gelde 28S rRNA ve 18S rRNA'nın yerleri ultraviyole altında bir cetvel yardımıyla işaretlendi ve fotoğraf çekildi.

5.1.12 Northern Transfer İşlemi

Gel boyutunda bir tane pozitif yüklü naylon membran ve iki tane 3 MM filtre kağıdı kesildi, DEPC'li su ile muamele edildi ve 10XSSC içerisinde 15 dakika bekletildi. Gel tabağı ters çevrildi ve bunun üzerine, içinde 10XSSC bulunan pyrex tabağın degecek şekilde 3 MM filtre kağıdı yerleştirildi. Bunun üzerine sırasıyla; 3 MM Whatman filtre kağıdı, gel, naylon membran, 3 MM Whatman filtre kağıdı, havlu kağıt yığını, cam ve ağırlık yerleştirildi. Gelden membrana RNA örneklerinin aktarılması yaklaşık 24 saat süreyle gece boyu yapıldı. RNA'ların aktarılma işleminden sonra naylon membran UV altında 60 saniye tutuldu ve 28S rRNA ile 18S rRNA'nın

işaretlendi, 80°C'lik etüvde yaklaşık 24 saat bekletildi, streç filme sarıldı ve 4 °C'ta saklandı.

5.1.13 Oligonükleotit Problemlerin İşaretlenmesi

Oligonükleotit problemler T4-polinükleotit kinaz enzimi varlığında [γ -³²P]ATP kullanılarak işaretlendi. Aşağıdaki maddeler sırasıyla tüplere konuldu:

10Xkinaz tamponu	2.0 µl
100 mM spermidin	2.0 µl
Oligonükleotit prob	10 pmol
T4-polinükleotit kinaz	16 ünite
[γ - ³² P]ATP	50 µCi

Karışım, +4°C'ta 1.2 dakika santrifüjlendikten sonra sırasıyla 37°C'ta 1.5 saat, 60°C'ta 10 dakika inkübe edildi. İşaretlenen probdan örnek alınarak Whatman GF/C filtreler emdirildi. Bağlanmamış radyoaktivite, +4°C'ta sırasıyla %10'luk TCA ile 15 dakika ve %70'lik etanol ile 10'er dakika 2 kez muamele edilerek uzaklaştırıldı. TCA ile çöktürmesi uygulanan ve uygulanmayan filtreler sıvı sintilasyon sayacında sayıldı ve işaretlenme verimleri saptandı.

5.1.14 Hibritleme İşlemi

Toplam RNA örnekleri içeren naylon membran %50 formamid, 0.12 M Na-fosfat, pH:7.2, 0.5 M NaCl ve %7 (w/v) SDS varlığında önhibritleme tabii tutuldu (G_{sc} için 42°C'ta, 5 dakika, 28S rRNA için 42°C'ta 5 dakika). İşaretlenmiş prob eklenerek aynı sıcaklıkta gece boyu hibritleme işlemine devam edildi. Hibritleme çözeltisi döküldükten sonra, filtreler 15'er dakika sırasıyla oda sıcaklığında 0.5XSSC ve %0.1 SDS ile ve 0.1XSSC , %0.1 SDS ile G_{sc} için 40°C'ta ve 28S rRNA için 45°C'ta yıkandı ve streç film ile sarıldı. Filtreler yansıtıcı kaset içinde Kodak X-OMAT filmi üzerine yerleştirildi ve -70°C'ta 1-5 gün bekletildikten sonra, film banyo edildi . Belirlenen süre sonunda film karanlık odada sırasıyla, geliştirici (developer), su, sabitleyici (fixer) ve su ile muamele edilerek, oda ısısında kurumaya bırakıldı.

5.2 G_{α} - ve T- Proteinlerinin Saflaştırılması ve T-Proteininin X-ışınları İle Yapı Analizi

5.2.1 Kültür ve Ekspresyon:

G_{α} ekspresyonu NIH'den Dr.Joel Moss tarafından sağlanan ve pT7/Nde/ G_{α} plazmidi taşıyan *E.coli* BL21/DE3 hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi (25,30). Öncelikle küçük ölçekli kültürler büyütülerek hücrelerin büyüme eğrileri çıkarıldı ve IPTG ile indüklenebilir olup olmadıkları araştırıldı. Bu amaçla hücreler 50 μ g/ml ampicilin içeren **Luria-Bertani** ortamında gece boyu büyütülerek bir ön-kültür hazırlandı; ertesi gün yine aynı ortamla 1/100 seyreltilen kültür 37°C'ta büyümeye bırakıldı. Ekspresyon $A_{600}=0.6$ 'ya ulaştığında değişik konsantrasyonlarda (0.2,0.4, 0.5, 1 mM) IPTG ile indüklendi. Birer saat arayla toplanan hücrelerin çoğalması hücre sayımı ve absorbans ölçümleriyle, ekspresyon düzeyi ise Western blot analizi ile saptandı.

G_{α} ekspresyonunu arttırarak artalan ekspresyonu düşürmek amacıyla aynı işlemler gliserol (%0.4) içeren **Luria-Bertani** ortamı ve zenginleştirilmiş **LB ortamı** ile tekrarlandı.

Rekombinant protein ekspresyonunun BL21(DE3) hücrelerinde iyi kontrol edilememesi üzerine ekspresyon BL21(DE3)pLysS ve BL21(DE3)pLysE hücrelerinde de denendi. Bu amaçla pT7/Nde1/ G_{α} plazmidi BL21(DE3) hücrelerinden standart plazmid izolasyon protokolü ve Qiagen plazmid izolasyon kolonlarından yararlanılarak saflaştırıldı ve (a)BL21(DE3)pLysS ve (b)BL21(DE3)pLysE hücrelerini transforme etmek için kullanıldı.Transformasyon ısı şoku yöntemiyle (58) gerçekleştirildi. G_{α} 'nın ekspresyonu Western blot analiziyle belirlendi. BL21(DE3)pLysE hücrelerinde temel ekspresyon düzeyinde artış gözlenmekle birlikte her iki sistemde de ekspresyonun IPTG'ye bağımlı olmadığı saptandı.

5.2.2 Plazmid İzolasyonu ve Transformasyon

İzolasyon: Herbiri 35 ml'lik iki gece boyu kültür hazırlandı. Kültürler 50 ml'lik iki tüpe aktararak 4000 devir/dak., 30 dak. süreyle, 10°C'ta çevrildi (Hettich) . Üst sıvı atılarak tüpler buza yerleştirildi ve üzerlerine 4 ml **P1** tamponu eklendi. Çökelekler bu tamponla çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml **P2** tamponu eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi; ardından 4 ml **P3** tamponu eklendi. Örnekler genomik DNA'yı parçalamayacak şekilde hafifçe karıştırıldı ve 17500 devir/dak., 30 dak. süreyle, 4°C'ta çevrildi (Sorvall). Üst sıvı pamuklu bir enjektörden geçirilerek filtre edildi. 70 ml'lik kültür için bir Qiagen kolonu 3 ml **QBT** tamponu ile dengelendikten sonra örnek kolona uygulandı. Kolon 10 ml **QC** tamponu ile yıkandıktan sonra, plazmid DNA'sı 5 ml **QF** tamponu ile toplandı. Örnekler Eppendorf tüplerine bölünerek üzerlerine 2/3 hacim isopropanol eklendi ve 12000 devir/dak., 35 dak. süreyle, 4°C'ta (Hettich Eppendorf santrifüj) çevrildi. Çökelekler 200 µl soğuk %70 etanol'de çözülerek tekrar 12000 devir/dak., 20 dak. süreyle, 4°C'ta çevrildi (Hettich Eppendorf santrifüj) ve üst sıvı atıldıktan sonra vakumlu uçurucu kullanılarak kurutuldu.

260,280 and 310 nm'lerdeki absorbans değerleri ölçülerek derişim aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 50 / 1000 = \text{derişim (mg/ml)}$.

A_{260}/A_{280} oranının 2'den büyük olduğu gözlemlendi.

Alıcı Hücre Hazırlanması: Transformasyon iki aşamada gerçekleştirildi. Öncelikle plazmidin aktarılacağı alıcı hücreler hazırlandı. Bu amaçla hücreler 50 ml'lik kültürde gece boyu büyütüldü. Ertesi gün 40 ml taze besi ortamına 1 ml gece boyu kültürü eklendi ve büyümeye bırakıldı. $A_{600}=0.12-0.2$ 'ye ulaştığında kültür buza kondu. 4000 devir/dak., 15 dak. süreyle, 4°C'ta çevrildi (Hettich). Üst sıvı atılarak, çökelek 2.5 ml soğuk 50 mM CaCl_2 'de çözüldü. Buzda 1-1.5 saat kadar bekletildikten sonra 4000 rpm, 4°C, 10 dak. çevrildi (Hettich). Çökelek, üzerine tekrar 2.5 ml CaCl_2 eklenerek çözüldü ve kullanmadan önce en az 2, en çok 24 saat buzda bekletildi.

Transformasyon: Daha önce izole edilmiş plazmidin 25 µl'sine 150 µl alıcı hücre eklenerek 45 dak. buzda bekletildi. Karışım 42°C'ta, 2 dak. tutularak ısı şokuyla

membranın alıcı duruma gelmesi sağlandı. Buzda 5 dak. bekletme sonrası 1 ml, önceden 37°C'a getirilmiş, antibiyotiksiz besi ortamı eklenerek, hücrelerin 37°C'ta 1 saat çalkalanarak büyümesi ve antibiyotik direncini yeniden kazanmaları sağlandı. Kùltürler steril Eppendorf'a aktarılarak 3500 devir/dak.'da, 5 dak. çevrildi. Çökelekler 40 µl antibiyotiksiz ortam ile çözüldükten sonra antibiyotik içeren katı LB ortamına 10-30 µl halinde ekim yapıldı ve hücreler 37°C'ta gece boyu bırakıldı.

5.2.3 Protein Saflaştırma İşlemi

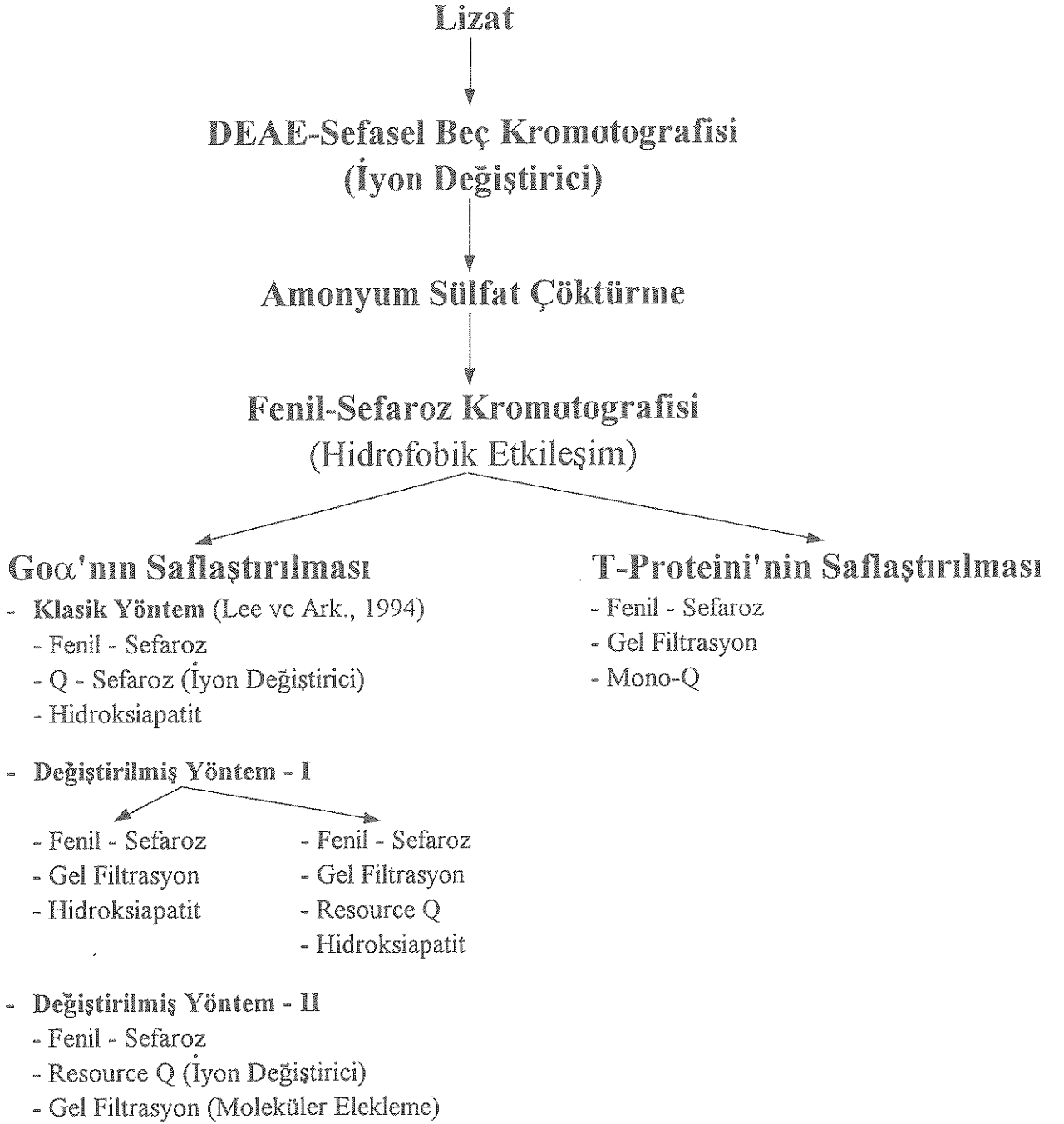
G₆₀₀ ve aminometiltransferaz'a ait başlıca saflaştırma basamakları Tablo 5.3'de gösterilmiştir. Her aşamadan elde edilen kesimler SDS-PAGE ve Western blot analizleriyle kontrol edilmiş, G₆₀₀'nın saflaştırılmasına yönelik deneylerin bir bölümünde ise bu analizlerin yanında GTPγS bağlama testleriyle aktivite ölçümü yapılmıştır.

Lizatin Hazırlanması: Kùltür ve ekspresyon bölümünde anlatılan yöntemle bu kez geniş ölçekli hazırlanan kùltür (12 litre) A₆₀₀=0.6'ya ulaştıktan iki saat sonra toplandı ve 5000 devir/dak., 10 dak. süreyle, 4°C'ta santrifüjlenerek (Sorvall, GSA rotoru) çöktürüldü. Çöktürülen bakteri peletleri önce lizozim içeren **parçalama tamponu** ile parçalandı. Daha sonra 18 G iğneden geçirilerek, 3 dak. buz üzerinde sonikasyona tabi tutuldu. Homojenat 19000 devir/dak., 1 saat süreyle, 4°C'ta çevrilerek (Sorvall, SS-34 rotoru) üst sıvı toplandı. Bundan sonra saflaştırma aşamalarına geçildi.

DEAE-Sefasel (İyon Değişim) beç kromatografisi: Üst sıvı önceden soğuk TEDP tamponu ile dengelenmiş 250 ml DEAE-Sefasel üzerine eklenerek soğuk odada, yavaş karıştırma ile 30 dak. bekletildi. Karışım Whatman #4 filtresinden süzöldü (DEAE1), TEDP ile bir kez yıkandı (DEAE2) ve proteinler 200 ml **DEAE-Sefasel toplama tamponu** ile indirildi (DEAE3).

Amonyum sülfat çöktürmesi: DEAE-Sefasel'den toplanan karışım, üzerine 5 dak. aralıklarla son derişim 1 M olacak şekilde 4 M doymuş amonyum sülfat ve 25 µM GDP eklenerek 30 dak., soğuk odada karıştırılarak bekletildi ve 10000 devir/dak., 30 dak. süreyle, 4°C'ta çevrilerek (Sorvall, SS-34 rotoru) proteinlerin bir kısmı çöktürüldü. Amonyum sülfat üst sıvısı Fenil-Sefaroz kolonuna yüklendi.

Tablo 5.3: G_{α} ve aminometiltransferaz'a ait başlıca saflaştırma basamakları



Fenil-Sefaroz(Hidroforobik Etkileşim) kromatografisi: Fenil-Sefaroz aşamasında düşük doyumlu (low subst.) Fenil-Sefaroz materyali kullanıldı.Kolonu kullanıma hazırlayabilmek için öncelikle ortamın içinde bulunduğu etanol dökölerek üzerine %25v/v Fenil-Sefaroz başlama tamponu (FS Tampon A) eklendi. Karışımın gazı alındı ve hem kolonun hem de materyalin teknik direktiflerine uygun olarak XK 26/20 (Pharmacia) kolonuna döküldü. Kolon FS Tampon A, Tampon B ve tekrar Tampon A ile dengelendi. Amonyum sülfat üst sıvısı 50 ml'lik bölümler halinde 0.22 ya da 0.45 µm filtreden geçirilerek kolona yüklendi. Proteinler azalan derişimlerde amonyum sülfat (1-0 M) ve artan derişimlerde gliserol (0-%35) gradyenti kullanılarak toplandı. Aktivite analiz sonuçlarına göre biraraya getirilen kesimler gece boyu, 4°C'de diyalize tabii tutuldu. Diyaliz tamponu olarak bir sonraki kolona ait başlama tamponu kullanıldı.Ayrıca 2 µM GDP eklendi.

Fenil-Sefaroz sonrası uygulanan basamak Şekil 5.3'te de görüldüğü gibi izlenen yöntemle göre değişmektedir. Klasik G₆₀ saflaştırma protokolünün izlendiğı yöntemde (37) doğrudan Q-Sefaroz kolonuna geçilirken, diğer yöntemde gel filtrasyonu ve Resource Q kullanılmış, bir başka yöntemde ise gel filtrasyon ile Resource Q yer değiştirmiştir.

Q-Sefaroz (İyon Değişim) kromatografisi: Diyaliz sonrası örnekler Amicon filtrasyon aleti kullanılarak hacim 10 ml olacak şekilde yoğunlaştırıldı, 0.22 ya da 0.45 µm filtreden geçirildi ve önceden başlama tamponu ile dengelenmiş Q-Sefaroz kolonuna yüklendi. Akış hızı 2 ml/dak., kesim toplayıcısı 10 ml'ye ayarlandı.Proteinler artan derişimde 300 mM NaCl gradyenti ile toplandı.

Gel filtrasyon (Moleküler Elekleme) kromatografisi: Proteinler Amicon filtrasyon aleti ile hacim 10 ml olacak şekilde yoğunlaştırılarak gel filtrasyon tamponu ile dengelenmiş Superdex 75 (26/60) kolonuna yüklendi. Akış hızı 2.5 ml/dak., kesim toplayıcısı 2 ml'ye ayarlandı. Örnekler 250 ml gel filtrasyon tamponu ile toplandı.

Mono Q ve Resource Q (İyon Değişim) kromatografileri: Her iki kolon için de örnek hacmi 10 ml olacak şekilde ayarlandı. Mono Q kolonu için örnek yükleme kapasitesi 20-50 mg civarındayken Resource Q için bu değerin 150 mg'a kadar yükselebilmesi ve iki kolonunda benzer çözünürlüğe sahip olmaları deneylerin bir kısmında Resource Q kolonunu tercih etmemize yol açtı.Kolonlar önce başlama, sonra

toplama ve tekrar başlama tamponları ile dengelendi. Mono Q için akış hızı 1 ml/dak., Resource Q için ise akış hızı 3 ml/dak. olarak ayarlandı. Proteinler artan derişimlerde NaCl gradyenti ile toplandı.

Hidroksiapatit kromatografisi: Bir önceki kolondan toplanan proteinler (Q-Sefaroz, gel filtrasyon, Mono Q ya da Resource Q) Centricon 10 yoğunlaştırma aleti kullanılarak yoğunlaştırıldı. Ayrıca ardışık seyreltme ve yoğunlaştırmayla ya da diyaliz edilerek materyalin hidroksiapatit başlama tamponu (H Tampon A) ile dengelenmesi sağlandı. Başlangıçta yapılan deneylerin bir kısmında Lee ve ark.(37)'nda açıklanan Bio-Gel HTP gel matriksi ile aynı özelliklere sahip, ancak daha dayanıklı olduğu belirtilen seramik hidroksiapatit kullanıldı. Proteinlerin kolona bağlanmaması nedeniyle aynı deneyler düşük pH:6.8 ile tekrarlandı. Bu kolondan istenilen sonuçların alınamaması nedeniyle daha sonra Bio-Gel HTP matriksi denendi. Deneylerin bir bölümünde 1 ya da 5 ml'lik hazır Econo-Pac (Bio-Rad) kolonları kullanılırken, bir bölümü de daha büyük hacimli Bio-Rad kolonları ile gerçekleştirildi (gel hacmi:23 ml) Hidroksiapatit materyali dökülmeden önce mekanik bir karıştırıcı kullanmadan, elle çalkalama yoluyla gazdan arındırıldı. Kolona dökme ve yerleştirme işlemleri yüksek derişimde fosfat ile gerçekleştirildi (0.5 M). Kolonlar H Tampon A, Tampon B ve tekrar Tampon A ile dengelendikten sonra örnek hacmi 5 ml'ye tamamlanarak kolona uygulandı. Econo-Pac CHT-II kolonunda akış hızı 0.6 ml/dak., diğer kolonlarda 2 ml/dak.'ya ayarlandı.

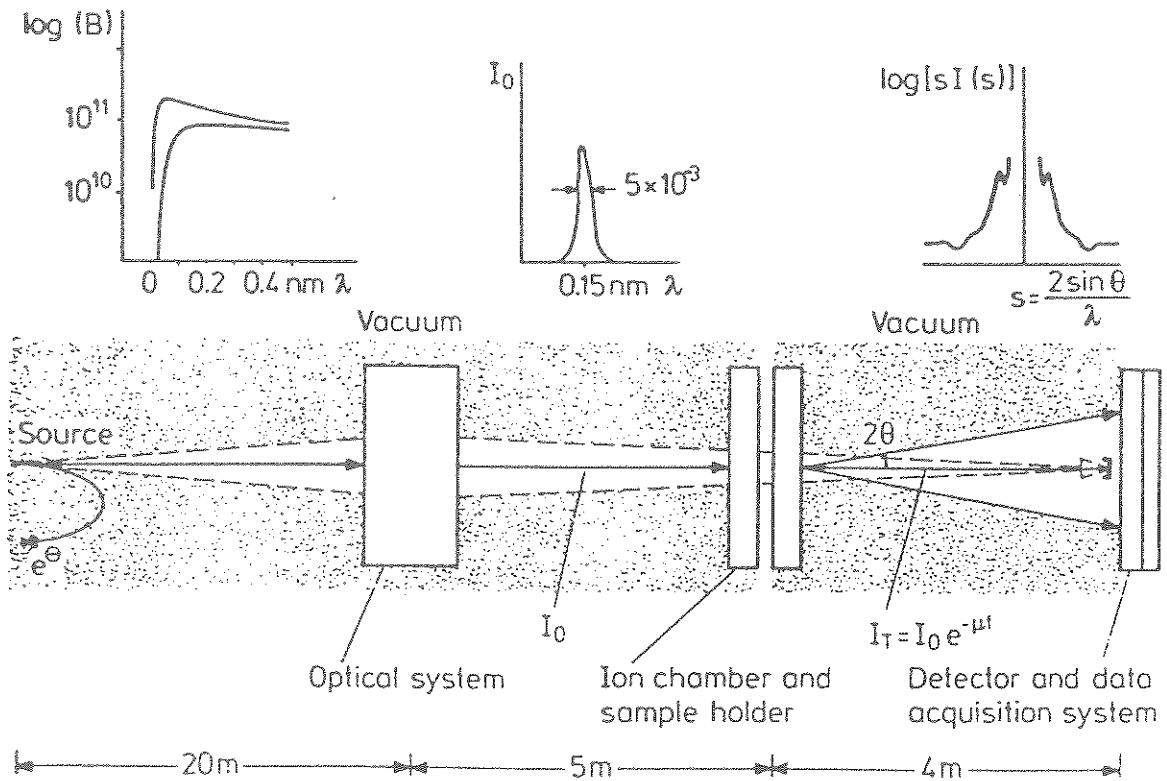
5.2.4 Küçük Açı Saçılması

Saflaştırılan örnek Centricon 10 ile yoğunlaştırıldıktan sonra Bisinkoninik Asit Yöntemi (BCA, Pierce) ile tam derişimi saptandı. Daha sonra 5 mg/ml, 7.5 mg/ml, 10 mg/ml olacak şekilde çeşitli derişimde örnekler hazırlandı. Ölçüm sırasında standart olarak yine aynı derişimlerde, 50 mM Hepes, pH:7.5 içerisinde BSA hazırlandı. Her iki örnekte de fazla derişimden kaynaklanan çökelmeleri uzaklaştırabilmek için örnekler soğuk odada, 15 dak., maksimum hızda çevrildi. Üst sıvı yeni bir tübe aktarıldı. Tüm örneklerden son derişimleri okumak ve diğer analizler için 200 µl örnek alındıktan

sonra, geri kalan her iki örneğe de 0.5 M DTT eklendi. Ayrıca saflaştırılan örneğe 50 μ M GDP kondu. Ölçüm için örnek hacmi en az 100 μ l olacak şekilde ayarlandı.

Küçük açı saçılma deneyleri HASYLAB, DESY’de yerleşik DORIS depolama halkası üzerinde gerçekleştirildi. Ölçümlerde 1 Å dalgaboyundaki sinkrotron X-ışınları kullanıldı. Saçılma deneyinde Şekil 5.1’de görülen düzeneğin yararlanıldı (60). Düzeneğin çalışma prensibi kısaca şöyledir: Optik sistem dar bir bant aralığındaki sinkrotron X-ışınlarını seçerek odaklar ve örnek üzerine gönderir. Gelen ışın şiddeti I_0 bir iyonizasyon odası yardımıyla saptanır. Örnek tarafından geçirilen ışığın şiddeti I_T ise $I_T = I_0 e^{-\mu t}$ formülüyle gösterilebilir. $e^{-\mu t}$ çözelti içinde t yolunu kateden ışının çözelti tarafından soğurulma miktarını temsil eder. Saçılan ışının şiddeti $I(s)$, $s = 2 \sin \theta / \lambda$ bağıntısı ile verilen saçılma vektörüne bağlıdır. 2θ saçılma açısına, λ ise ışının dalga boyuna karşılık gelmektedir. Geçirilen ve saçılan ışınların şiddeti konuma duyarlı bir algılayıcı tarafından kaydedilir.

Veriler standart veri toplama ve değerlendirme yöntemleri kullanılarak değerlendirildi (7). Deneysel verilerden hesaplanan saçılma eğrileri ile G-proteinleri için verilen atomik modellerin karşılaştırılması CRY SOL (66) programı kullanılarak yapıldı.



Şekil 5.1 : X-ışını küçük açı saçılması düzeneğinin şematik gösterimi

5.3 Her İki Çalışmada Kullanılan Yöntemler

5.3.1 GTP γ S Bağlama Testi

Saflaştırmanın çeşitli aşamalarındaki örnekler G-protein aktivitesini ölçmek amacıyla GTP γ S bağlama testi ile incelendi. Bunun için örnek hacmi seyreltme tamponu ile 30 μ l'ye tamamlandı. Üzerine 30 μ l GTP γ S bağlama karışımı eklendi. Karışım 30°C'ta 1 saat bekletildi. Daha sonra örnekler vakum ile nitroselüloz membrana emdirildi ve 4°C'de soğutulmuş filtre yıkama çözeltisi ile yıkanarak kurutuldu. Bağlanan GTP γ S miktarı sıvı sintilasyon sayacı ile saptandı. Özgün olmayan bağlanma miktarı 1 mM GTP γ S varlığında belirlendi (38).

5.3.2 Elektroforetik Analiz (SDS-PAGE)

10-50 μ l hacim içinde denatüre edilen örnekler, SDS-PAGE gel kuyularına uygulandı. Elektroforez işlemi 100 Volt' ta sürdürüldü. Yaklaşık 1 saat sonra akım kesilerek, iki cam arasındaki geller çıkartıldı. Geller sırasıyla boyama çözeltisi, boya çıkarma çözeltisi ve % 5 asetik asitte yıkandı. Gelde proteinlerin olduğu bölgeler koyu mavi bantlar olarak gözlemlendi (58).

5.3.3 Elektroforetik Transfer

Elektroforezden sonra, geller çıkartıldı ve gel transfer tamponu içerisine alınarak, 15 dakika bekletildi. 9.5 cm x 5.5cm boyutlarında iki tane nitroselüloz membran ve 11 cm x 8 cm boyutlarında dört tane filtre kağıdı kesildi. Membranlar ve filtre kağıtları 45° lik açı ile kaydırılarak transfer tamponu içerisinde 15-20 dakika bekletildi. Gel kasetindeki gri panelin üzerine sırasıyla sünger, filtre kağıdı, gel, nitroselüloz membran, filtre kağıdı ve sünger konduktan sonra kaset dikkatlice kapatıldı. İki kaset tanka yerleştirildi ve tank transfer tamponuyla dolduruldu. Transfer tankı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilip güç kaynağına bağlandıktan sonra transfer işlemi 100 Volt' ta 1 saat içerisinde gerçekleştirildi. Transferin gerçekleşip

gerçekleşmediğini gözlemek için membranlar Ponso-S boyama tamponuna alındı, 5-10 dakika bekletilerek protein bantları gözlemlendikten sonra, protein standartları işaretlendi. Membranlar distile su ile yıkandı ve filtre kağıdında emdirilerek kurutuldu. Bu aşamadan sonra membranlar +4° C' ta saklandı.

5.3.4 İmmünolojik Belirleme-Western Blot

(Alkalen fosfataz sistemi)

1. Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılmasından sonra membranlar, blok tamponunda 1 saat süreyle oda sıcaklığında çalkalandı.
2. TBS ile kısaca yıkandı.
3. Membranlar birincil antikor çözeltisi içerisinde 3.5 saat oda sıcaklığında çalkalandı.
4. TBS ile 5' er dakika, 3 kez yıkama yapıldı.
5. Membranlar alkalen fosfataz konjuge ikincil antikor çözeltisinde 1.5 saat oda sıcaklığında çalkalamalı olarak bekletildi.
6. TBS ile 5' er dakika, 3 kez yıkama yapıldı.
7. Membranlar filtre kağıdı ile kurutuldu.
8. 132 µl NBT, 66 µl BCIP içeren 20 ml geliştirici tampon içine alınan membranlar görüntü elde edilene dek (5-10 dk) çalkalandı .

5.3.5 Dansitometrik Analiz

Bio-Rad dansitometrisinde Bio-Rad moleküler analiz yazılımı kullanılarak yapıldı.

5.2.6 Protein Tayini

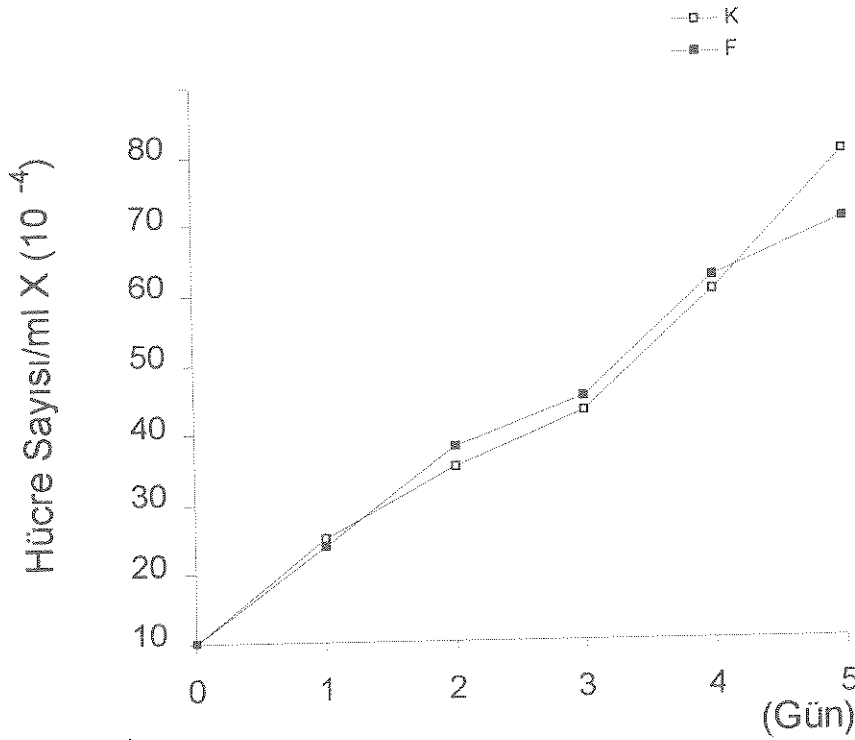
Protein tayini 1 numaralı çalışmada Lowry yöntemi (54), 2 numaralı çalışmada BCA protein tayin kiti kullanılarak kit ile birlikte verilen teknik talimata uygun olarak yapıldı (Pierce).

6. BULGULAR

6.1. Eritroid Hücre Farklılaşmasında G Protein Ekspresyonu Üzerine Çalışmalar

6.1.1. K562 Hücrelerinin Çoğalma Eğrileri

Uygun koşullarda çoğaltılan K562 hücrelerinde tripan boyama canlılık testi yapıldıktan sonra hücreler ml' de 1×10^5 hücre olacak şekilde iki gruba ayrıldı. 20 μ M hemin ile farklılaşmaya indüklenen (farklılaşmış: F) ve hemin ile indüklenmeyen (kontrol: K) hücrelerde beşinci günün sonunda, farklılaşma oranı sırasıyla yaklaşık % 65-70 ve % 1-2 olarak belirlendi. Kontrol ve farklılaşmış grupların çoğalma eğrileri Şekil 6.1' de gösterilmiştir.



Şekil 6.1. K562 hücrelerinin çoğalma eğrileri: Hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/ml olarak ekilen hücreler beş gün süreyle Gereç ve Yöntem' de belirtildiği şekilde çoğaltıldı. Hücre değişimini saptamak için her gün ikişer örnek alındı ve hemositometrede 0.1 μ l hacimde sayım yapıldı.

6.1.2. Hemoglobin Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği gibi, K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış örneklerinin 600' nm deki absorbans değerleri ölçüldü ve hemoglobin miktarı standart hemoglobin çözeltisi ile elde edilen eğriye göre hesaplandı. Hemoglobin miktarı F grubu için 13.34 pg/hüc, K grubu için 0.56 pg/hüc olarak hesaplandı.

6.1.3. K562 Hücrelerinin Zar Kesimlerinde Guanin Nükleotit Bağlanma Etkinlikleri

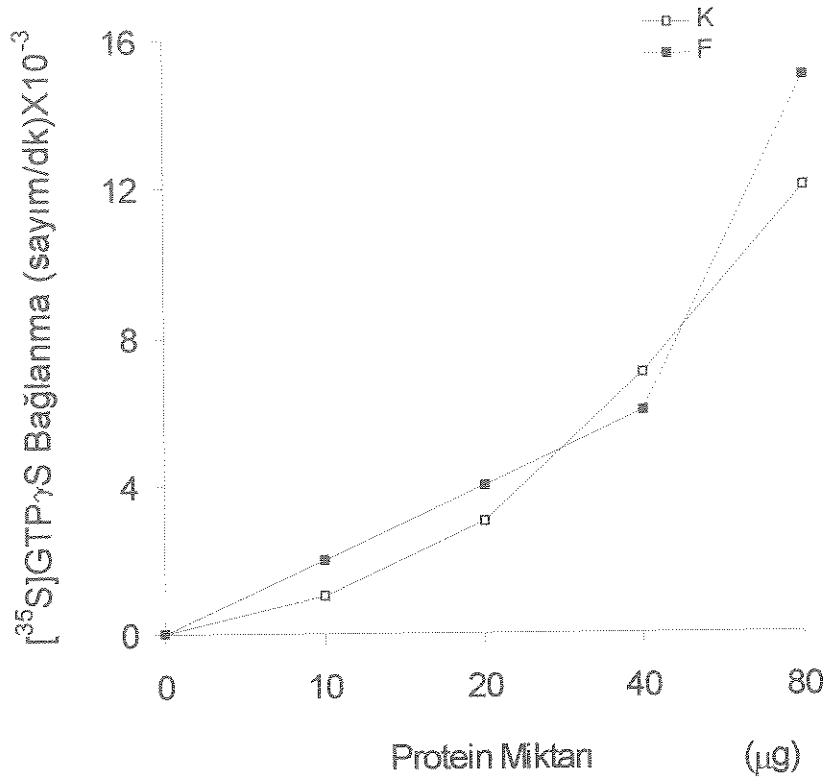
K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış örneklerinden elde edilen ham zar kesimi proteinlerinin guanin nükleotit bağlama etkinlikleri, GTP' nin hidrolizlenmeyen analogu olan [³⁵S] GTPγS varlığında saptandı.

6.1.3.1. Protein Derişim Eğrisi

K562 hücrelerinden hazırlanan ham zar kesimlerinde GTPγS bağlanma etkinliğinin protein derişimine bağımlılığı, tepkime karışımındaki zar kesimi protein miktarı 10 µg ile 80 µg arasında artırılarak incelendi (Tablo 6.1.) (Şekil 6.2.).

Tablo 6.1. K562 Hücrelerinin Ham Zar Kesimlerinde GTPγS Bağlanma pmol Değerleri.

Protein Miktarı (µg)	Kontrol Bağlanma (pmol)	Farklılaşmış Bağlanma (pmol)
10	0.16	0.40
20	0.53	0.64
40	1.20	1.25
80	2.20	2.69



Şekil 6.2. GTP γ S bağlanma etkinliğinin protein miktarına bağımlılığı: K562 hücrelerinden ham zar kesimleri Gereç ve Yöntem bölümünde açıklandığı şekilde hazırlandı ve protein miktarları belirlendi. 300. 000 cpm [35 S]GTP γ S içeren 60 μ l' lik tepkime karışımına artan miktarlarda (0-80 μ g) zar kesimi proteinleri eklendi. Şekildeki grafik değerleri iki deneyin ortalamasıdır. Bağlanan [35 S]GTP γ S sıvı sintilasyon sayacında cpm olarak gösterilmiştir.

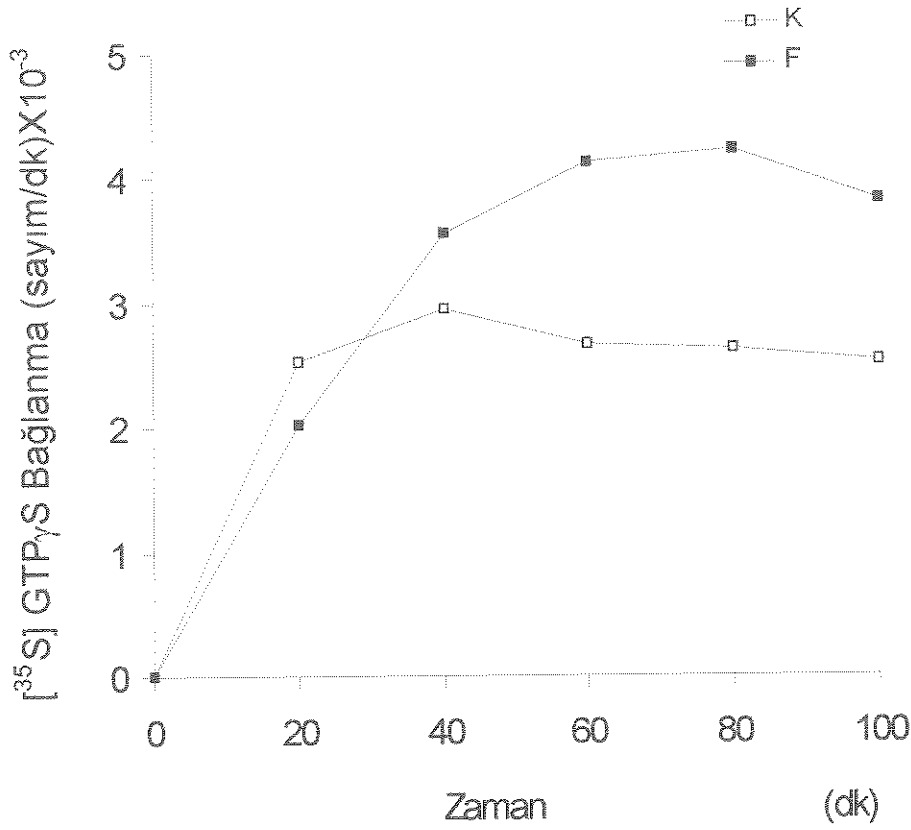
Guanin nükleotit bağlanma etkinliğinin toplam protein miktarına bağımlı olduğu gözlemlendi.

6.1.3.2. Zaman Kinetiği

K562 hücre zar kesimlerinde [35 S]GTP γ S bağlanma tepkimesi için uygun koşulların belirlenmesi amacı ile zaman kinetiği incelendi (Tablo 6.2.) (Şekil 6.3.).

Tablo 6.2. Zar Kesimlerinde Zaman Kinetiğinin pmol Değerleri.

Zaman (dk)	Kontrol Bağlanma (pmol)	Farklılaşmış Bağlanma (pmol)
20	0.46	0.37
40	0.54	0.65
60	0.48	0.75
80	0.48	0.77
100	0.46	0.70



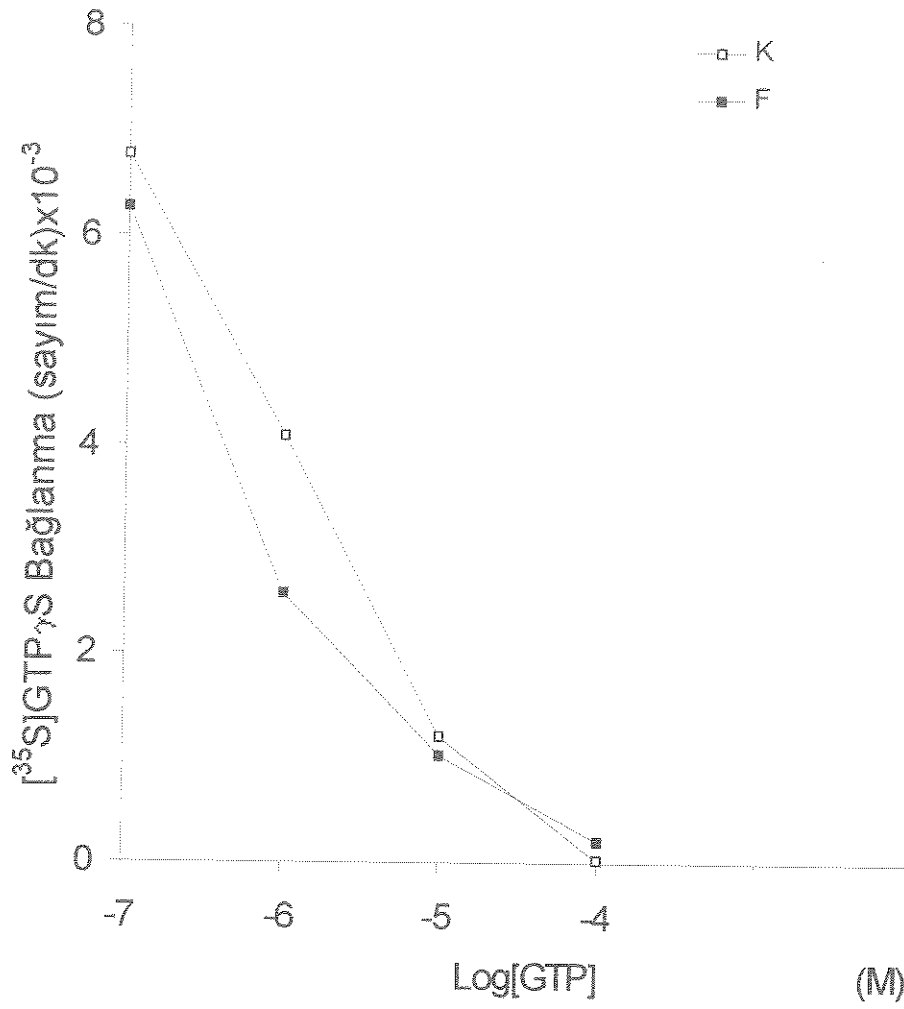
Şekil 6.3. GTP γ S bağlanma kinetiği: 15 μ g protein içeren K ve F zar kesimleri 60 μ l hacimde Gereç ve Yöntem' de açıklandığı şekilde 32° C' ta 20, 40, 80, 100 dk inkübe edildi. Örnekler nitroselüloz filtrelere emdirildi, filtreler yıkandı ve kurutuldu. Bağlanan [³⁵S]GTP γ S miktarı cpm olarak gösterilmiştir.

6.1.3.3. GTP' nin [³⁵S]GTP γ S Bağlanma Tepkimesine Etkisi

GTP' nin [³⁵S]GTP γ S bağlanma tepkimesine etkisi incelendi (Tablo 6.3.) (Şekil 6.3.).

Tablo 6.3. Zar Kesimlerinde GTP' nin Artan Derişimlerinde GTP γ S' in pmol Bağlanma Değerleri.

GTP Derişimi Log(M)	Kontrol Bağlanma (pmol)	Farklılaşmış Bağlanma (pmol)
-7	1.24	1.14
-6	0.75	0.47
-5	0.22	0.19
-4	5.5X10 ⁻³	0.035



Şekil 6.4. GTP' nin GTP γ S bağlanma tepkimesine etkisi. 15 μ g protein içeren K562 hücrelerinin zar kesimlerinde GTP γ S bağlanma tepkimesi Gereç ve Yöntem' de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Örneklere artan derişimlerde GTP eklendikten sonra inkübasyon 32° C' da 40 dk süreyle yürütüldü.

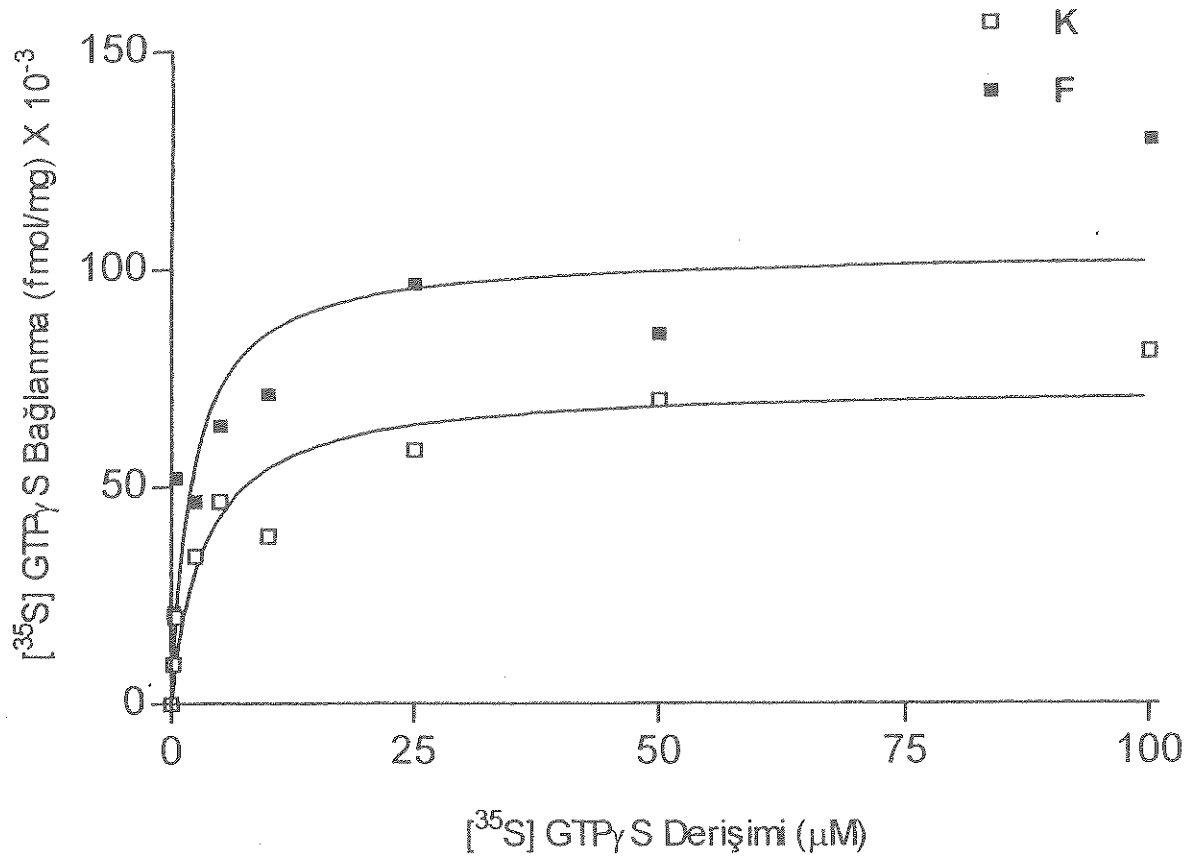
Kontrol ve farklılaşmış K562 hücrelerinin zar kesimlerinde GTP γ S bağlanma etkinliğinin GTP' in artan derişimlerinde özgün olarak inhibe olduğu belirlendi.

6.1.3.4. K_d ve B_{max} Değerlerinin Saptanması

GTP γ S bağlanma tepkimesi için K_d ve B_{max} değerleri hesaplandı (Tablo 6.4.) (Şekil 6.5.).

Tablo 6.4. K562 Zar Kesimlerine GTP γ S' in Derişime Bağımlı Bağlanması.

[³⁵ S]GTP γ S Derişimi (μ M)	Kontrol Bağlanma (pmol)	Farklılaşmış Bağlanma (pmol)
0.25	0.14	0.32
0.5	0.30	0.78
2.5	0.51	0.70
5.0	0.70	0.81
10.0	0.58	1.07
25	0.88	1.45
50	1.05	1.28
100	1.22	1.95



Şekil 6.5. K562 hücre zar kesimlerinde [³⁵S]GTP γ S bağlanması: 15 μ g protein içeren K ve F hücre zar kesimlerine 0-125 μ M [³⁵S]GTP γ S eklendi. K_D ve B_{max} değerleri Prizma yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

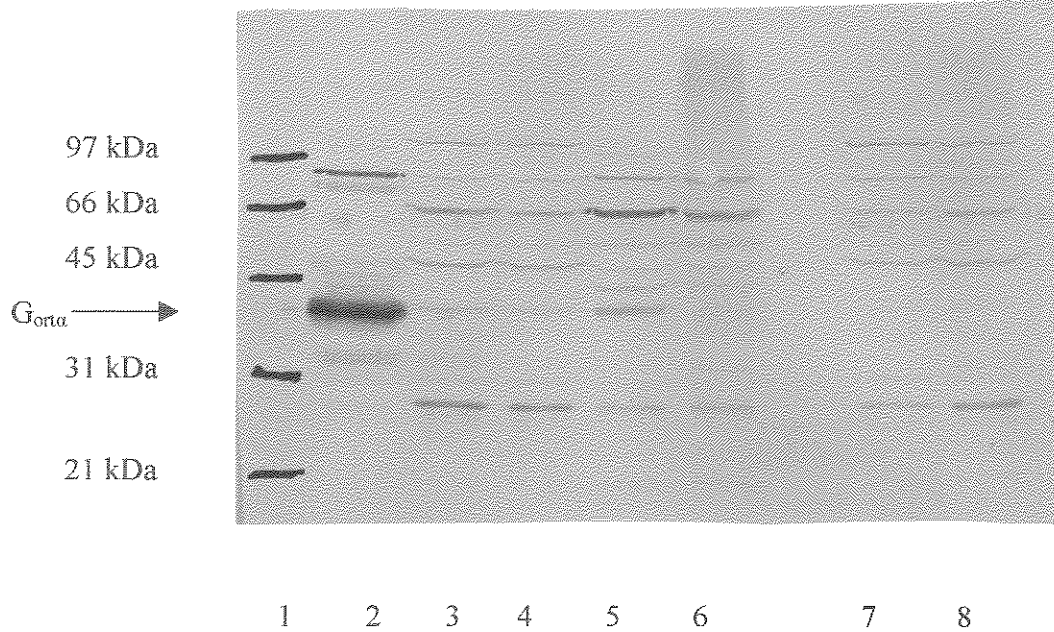
Kontrol hücre grubu için $GTP\gamma S$ bağlanma afinitesi (K_D) $3.5 \mu M$ ve B_{max} değeri 73.4×10^3 fmol/mg, farklılaşmış hücre grubu için K_D , $2.2 \mu M$ ve B_{max} değeri 104.1×10^3 fmol/mg cpm olarak belirlendi.

6.1.4. Kontrol ve Farklılaşmış Hücrelerde G Protein Düzeylerinin Karşılaştırılması

K562 hücrelerinden elde edilen zar kesimlerinde, G protein miktarları Western-blot yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Zar kesimleri SDS-poliakrilamit gel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra, nitroselüloz membranlara aktarıldı ve G proteinlerinin α alt birimlerine özgün antikorlarla Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde etkileştirildi.

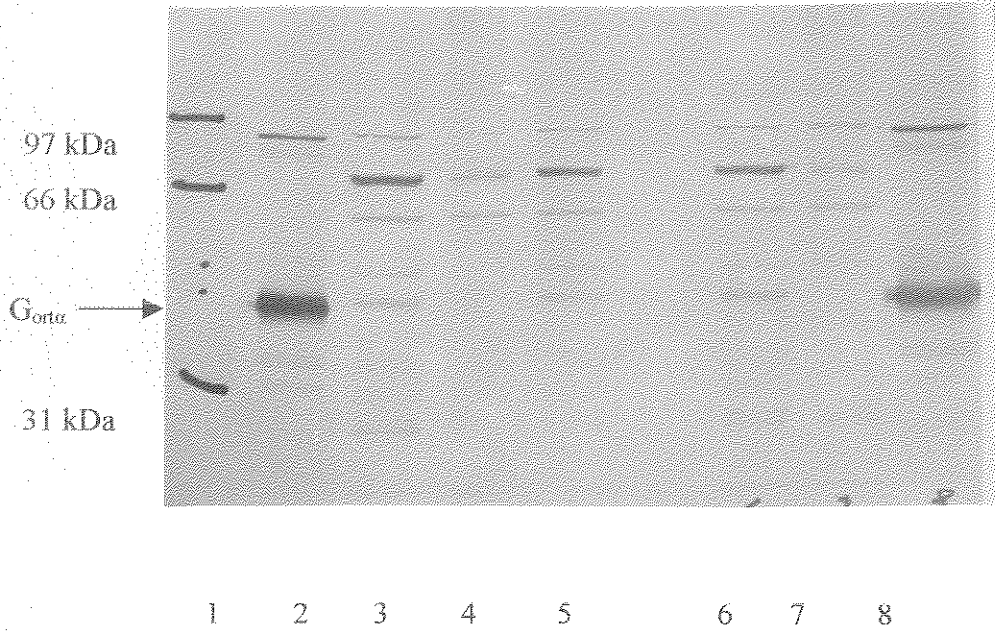
6.1.4.1. G protein α Alt Birimlerinin Ekspresyonu

K562 hücre alt kesimleri tüm G proteinlerini tanıyan antikorla (anti- $\alpha_{G_{\text{orta}}}$) etkileştirildi (Şekil 6.6.). Farklılaşmış hücrelerden elde edilen ham zar kesiminde, kontrol gruba kıyasla toplam G proteinleri açısından belirgin bir azalma gözlemlendi.



Şekil 6.6. K562 hücre alt-kesimlerinde G_{orta} alt birimlerinin Western-blot analizi: Kontrol (K), farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden hazırlanan, $50 \mu g$ protein içeren hücre özütü, sitoplazma, zar ve beyin zar kesimleri % 10' luk SDS-poliakrilamit gel elektroforezine uygulandı. Proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra anti- G_{orta} ile etkileştirildi. 1. Molekül ağırlığı standartları, 2. Beyin zarı S142, 3. Sitoplazmik kesim (K), 4. Sitoplazmik kesim (F), 5. Zar kesimi (K), 6. Zar kesimi (F), 7. Hücre özütü (K) 8. Hücre özütü (F). Tüm örneklerde protein miktarı: $50 \mu g$.

Deney, farklı bir hücre preparasyonunda (prep 2) tekrarlandığında (Şekil 6.7.) benzer sonuç elde edildi ve sonuçlar dansitometrik analiz ile değerlendirildi (Tablo 6.5.). Kontrol grupta G_{orta} ya özgün sinyalin farklılaşmış gruba göre yaklaşık altı kat fazla olduğu belirlendi.



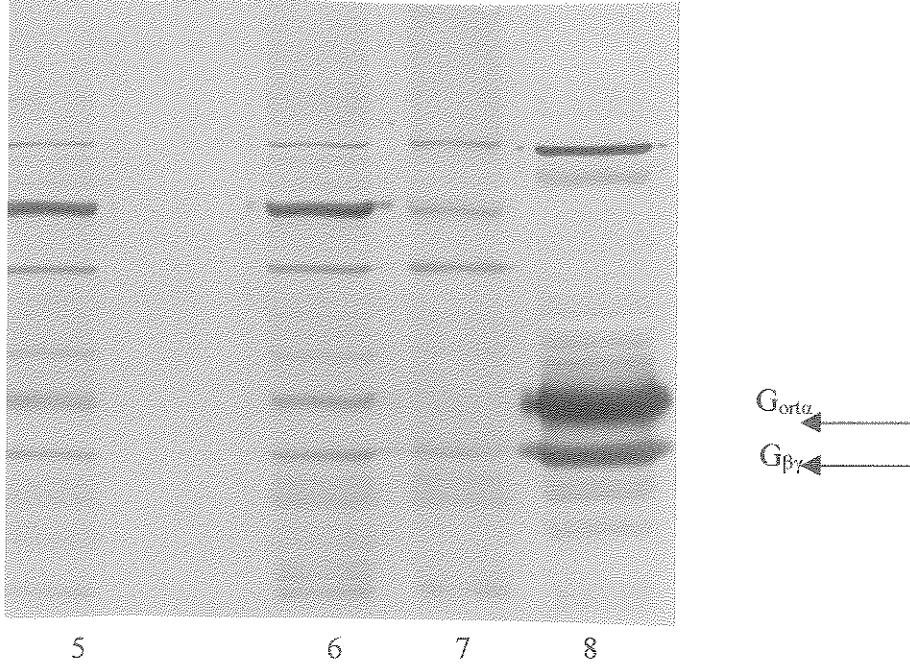
Şekil 6.7. Ham zar kesimlerinin anti- $G_{ortakα}$ ile etkileşimi: Molekül ağırlığı standartları, 2. Beyin zarı S142 (50 µg) 3. Zar K (50 µg), 4. Zar F (50 µg) 5. Zar K (50 µg), 6. Zar K (50 µg), 7. Zar F (50 µg), 8. Beyin Zarı S142 (50 µg). (3-5) Preparasyon 2, (6-7) Preparasyon 1.

Tablo 6.5. K ve F K562 hücre zarlarında G_{orta} alt birim düzeyleri. Bio-Rad "Molecular Analyst" yazılım programı kullanılarak yapılmıştır.

Protein						Uygun		
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
1	V1	0.538	20.58	0.000	0.952	1.1074e+1	1.1068+1	91.52
2	V2	0.043	20.58	0.000	0.302	8.7846e-1	8.7166-1	7.21
3	V3	0.008	20.58	0.000	0.220	1.6089e-1	1.5428-1	1.28
Zemin	V4	0.000	20.58	0.000	0.049	6.6044e-3		

6.1.4.2. G Protein $\beta\gamma$ Alt Birimlerinin Ekspresyon Düzeyleri

Ham zar kesimlerinde $G_{\beta\gamma}$ düzeyleri özgün antikor kullanılarak incelendi. $\beta\gamma$ alt birim düzeylerinin kontrol ve farklılaşmış gruplarda yaklaşık olarak aynı olduğu saptandı (Şekil 6.8.).



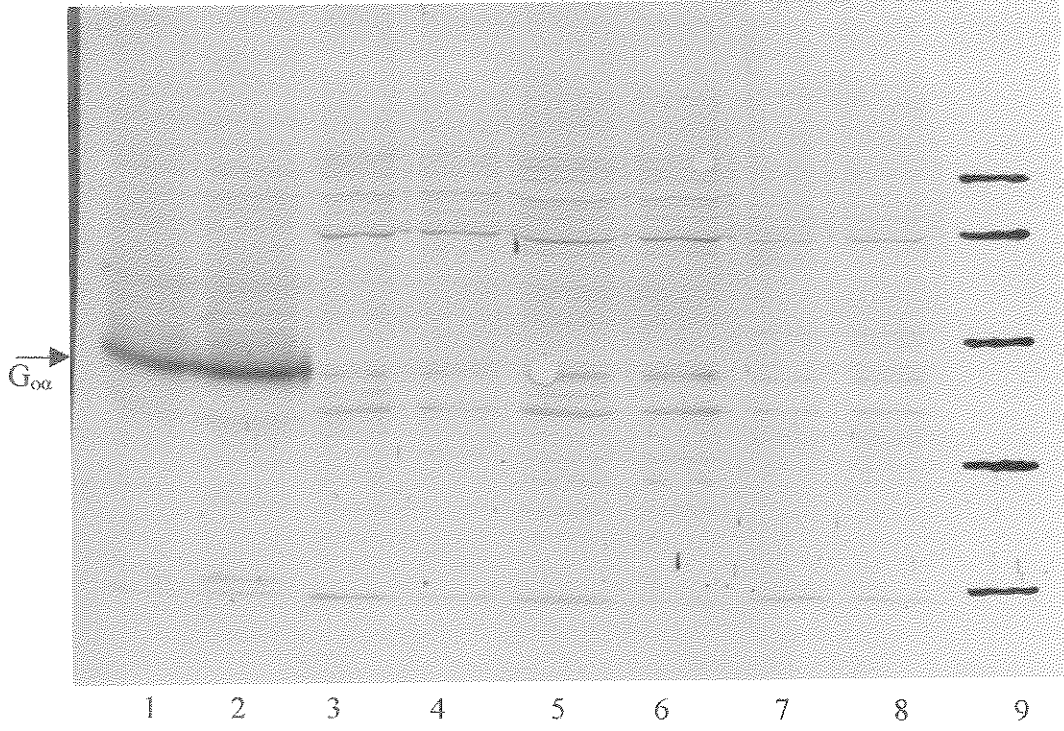
Şekil 6.8. Ham zar kesimlerinin anti- $G_{\beta\gamma}$ ile etkileşimi: Şekil 6.6.' da gösterilen filtrenin yarısı kesilerek (5-8) numaralı örnekler anti- $G_{\beta\gamma}$ ile etkileştirildi. 5. Zar kesimi K (50 μ g), 6. Zar kesimi K (50 μ g), 7. Zar kesimi F (50 μ g), 8. Beyin zar kesimi S142 (50 μ g). (5.) Preparasyon 2, (6-7) Preparasyon 1.

Anti- $G_{\beta\gamma}$ ' ya ait dansitometrik analiz sonuçları, Tablo 6.6.' da gösterilmiştir.

Tablo 6.6. K ve F K562 Hücre Zarlarında $G_{\beta\gamma}$ Alt Birim Düzeyleri. Şekil 6.8' deki 6, 7 ve 8 no' lu protein bantlarının dansitometrik analizi Bio-Rad "Molecular Analyst" yazılım programı kullanılarak yapılmıştır.

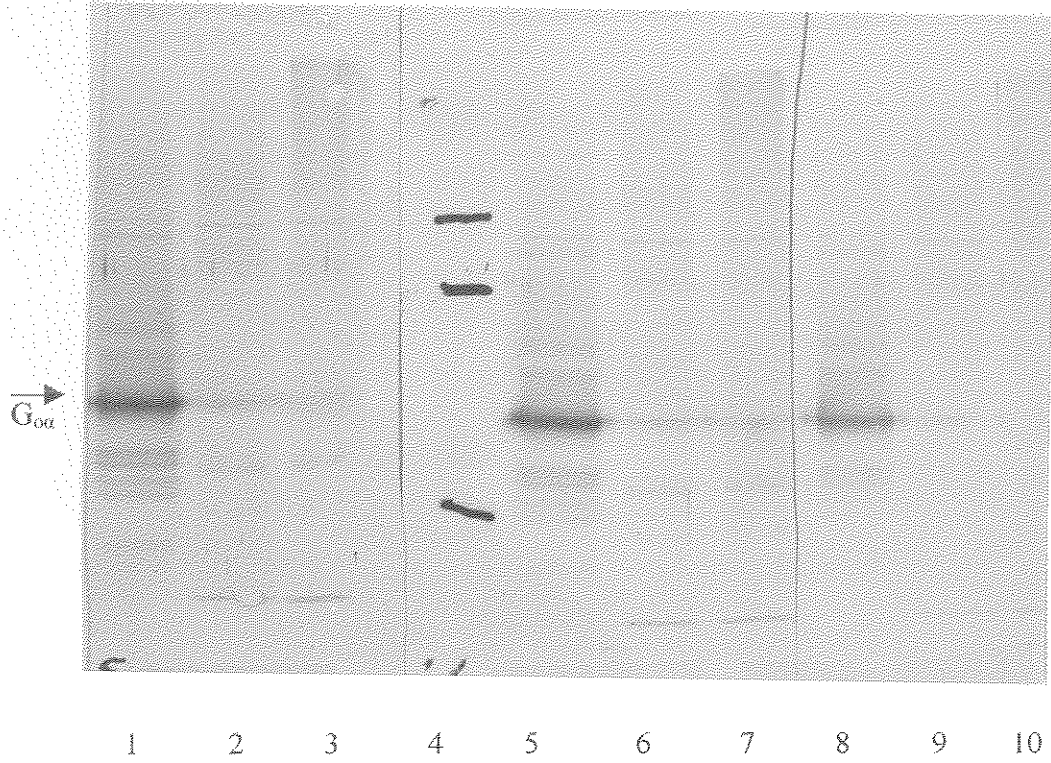
Protein						Uygun		
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
6	V1	0.264	15.52	0.157	0.558	4.0958e+0	1.5969e+0	15.52
7	V2	0.246	15.52	0.167	0.416	3.8223e+0	1.3234e+0	12.86
8	V3	0.587	15.52	0.170	0.857	9.1158e+0	6.6169e+0	64.30
Zemin	V4	0.161	15.52	0.127	0.237	2.4989e+0		

6.1.4.3. G_{α} Proteininin Ekspresyonu

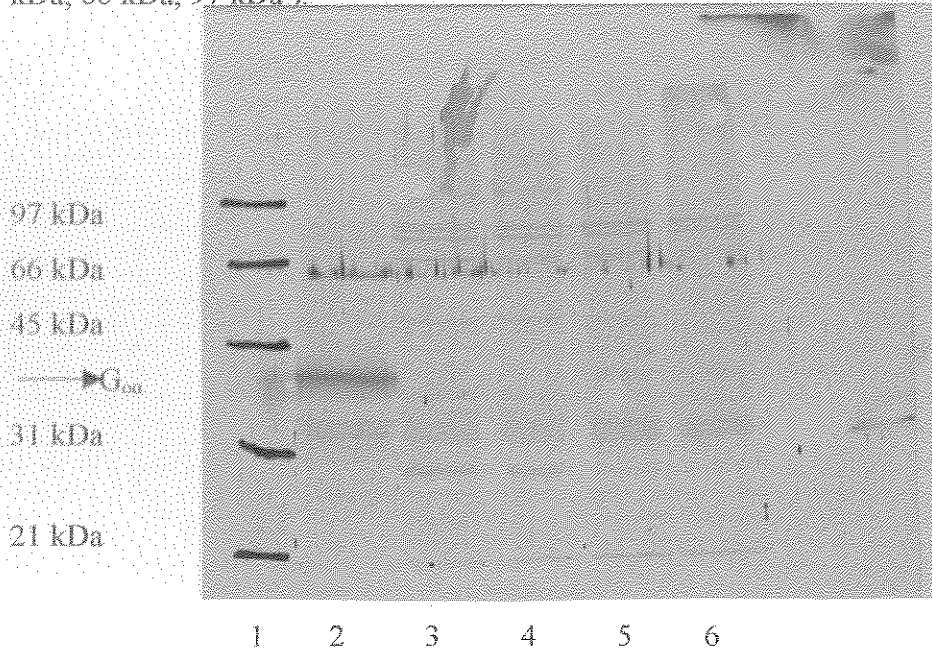


Şekil 6.9. K562 hücrelerinde G_{α} proteininin Western-blot analizi: Kontrol (K), farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden hazırlanan, 50 μ g protein içeren ham hücre özütü, sitoplazma, zar (3-8 numaralı kuyular) ve beyin zar kesimleri % 10' luk SDS-poliakrilamit gel elektroforezine uygulandı. Proteinler nitrocelüloz membrana aktarıldıktan sonra anti- G_{α} antikorı ile etkileştirildi. 1. Beyin zar proteinleri S142 (25 μ g), 2. Beyin zar proteinleri S142 (50 μ g), 3. Hücre özütü (F), 4. Hücre özütü (K), 5. Sitoplazmik kesim (F), 6. Sitoplazmik kesim (K), 7. Zar proteinleri (F), 8. Zar proteinleri (K), 9. Molekül ağırlığı standartları (21 kDa, 31 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa).

Şekil 6.9.' da görüldüğü gibi beyin zar kesimlerinde G_{α} ' ya özgün sinyallerin elde edilmesine karşın, K562 hücre özütü, sitoplazmik ve zar kesimlerinde anti- G_{α} antikoruyla tepkime gözlenmedi. Bu nedenle antikor 1:500, 1:1000 ve 1:2000 oranında seyreltilerek immün-tepkime Şekil 6.10. ve 6.11. tekrarlandı. Beyin zar protein kesiminde antikor ile etkileşim, antikor derişimine bağımlı bir şekilde artarken K562 hücre zar kesimlerinde sinyalin zemin düzeyde olduğu saptandı.

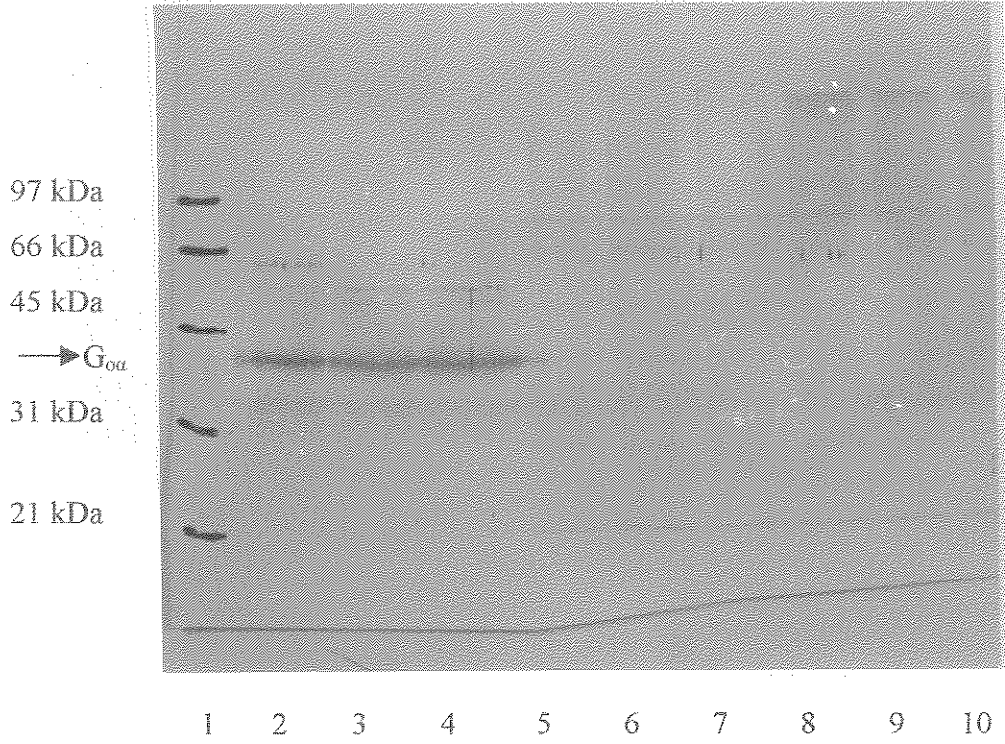


Şekil 6.10. K562 hücre zar kesimlerinin anti-G α ile etkileşimi: (1,5,8), Beyin S142; (2,6,9), Kontrol K562 zar proteinleri; (3,7,10), Farklılaşmış K562 zar proteinleri; (1-3), anti-G α - 1:500; (5-7), anti-G α - 1:1000; (8-10), anti-G α - 1:2000. 4. Molekül ağırlığı standartları (31 kDa, 66 kDa, 97 kDa).



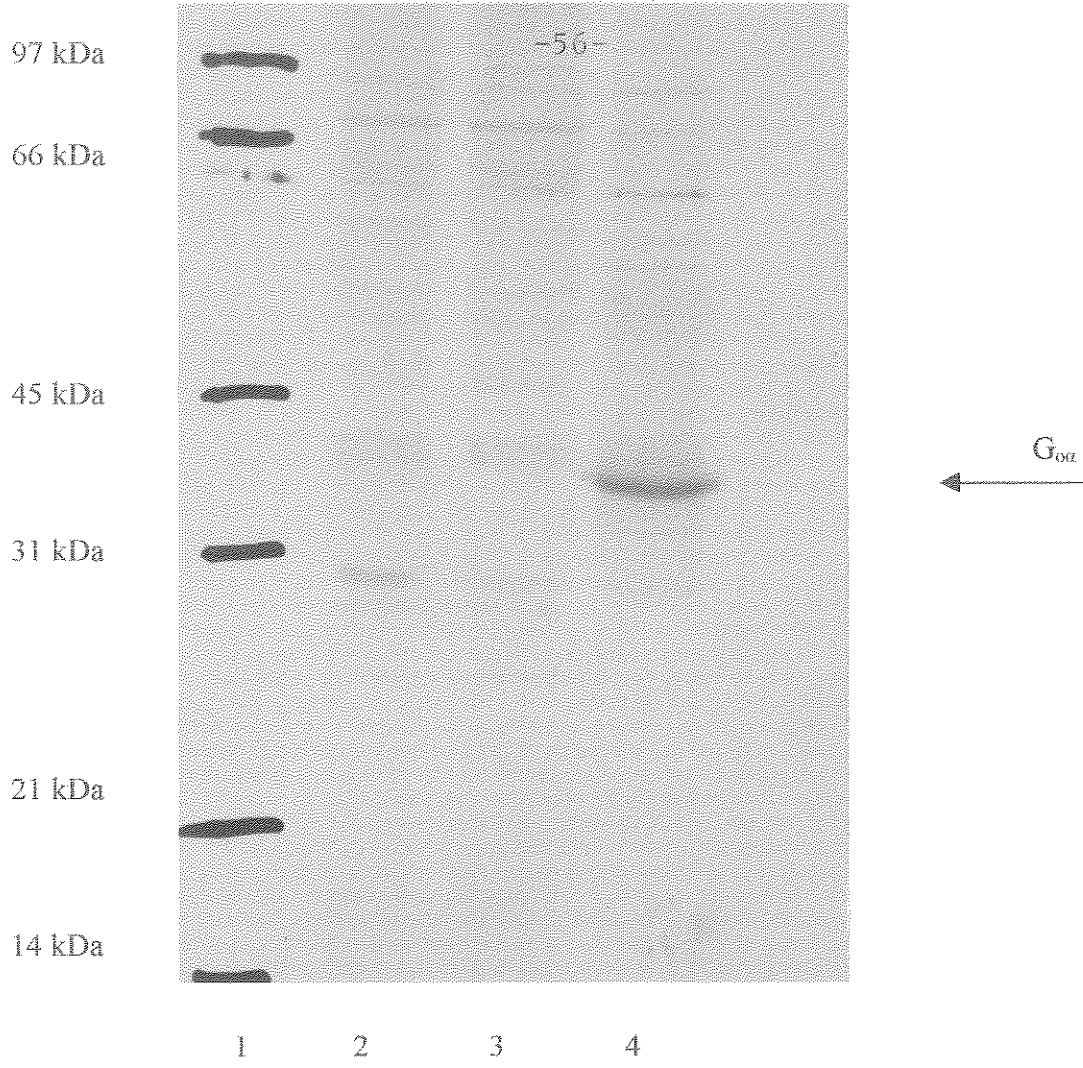
Şekil 6.11. K562 hücre kesimlerinde G α proteininin Western-blot analizi: 1. Molekül ağırlığı standartları, 2. Beyin zarı S142, 3. Sitoplazmik kesim (K), 4. Sitoplazmik kesim (F), 5. Zar (K), 6. Zar (F). Tüm örneklerde protein miktarı 50 μ g.

Tepkime bu kez protein miktarı arttırılarak ^{55}S tekrarlandı (Şekil 6.12.) ve beyin zar kesimlerinde G_{α} 'nın göç ettiği yerde, derişime bağı olarak artan bir sinyal saptanmadı.



Şekil 6.12. Artan zar protein miktarlarıyla G_{α} proteininin Western-blot analizi: 1. Molekül ağırlığı standartları, 2. Beyin zarı S142 (17.5 µg), 3. Beyin zarı S142 (35 µg), 4. Beyin zarı S142 (50 µg), 5. Zar K (32 µg), 6. Zar K (48 µg), 7. Zar K (64 µg) 8. Zar F (38 µg), 9. Zar F (57 µg), 10. Zar F (76 µg).

G_{α} protein ekspresyonu daha fazla miktardaki toplam zar proteininde incelendi (Şekil 6.13.).

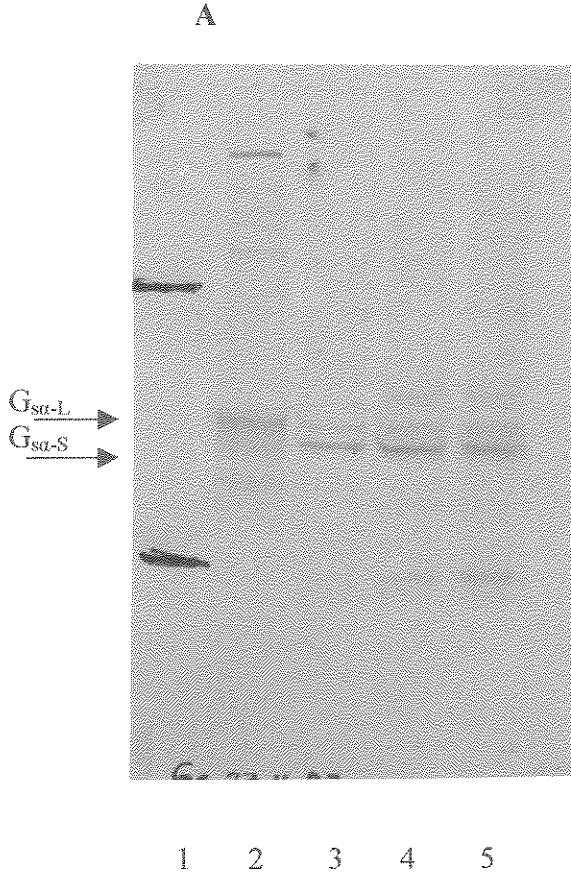


Şekil 6.13. K562 hücrelerinde G_{α} proteinin Western-blot analizi: K562 hücre zar proteinleri % 10' luk SDS-poliakrilamit gel elektroforezine uygulandı. Proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra anti- G_{α} ile etkileştirildi. 1. Molekül ağırlığı standartları, 2. Kontrol zar proteinleri (227 μ g), 3. Farklılaşmış zar proteinleri (342 μ g), 4. Beyin zar proteinleri (50 μ g).

Sonuç olarak beyin zar proteinlerinin % 1-2' ini oluşturan G_{α} proteinin, K562 hücrelerinde bulunmadığı ya da ekspresyonunun Western-blot analiziyle saptanamayacak kadar düşük düzeyde gerçekleştiği sonucuna varıldı.

6.1.4.4. G_{sa} Düzeylerinin Saptanması⁻⁵⁷⁻

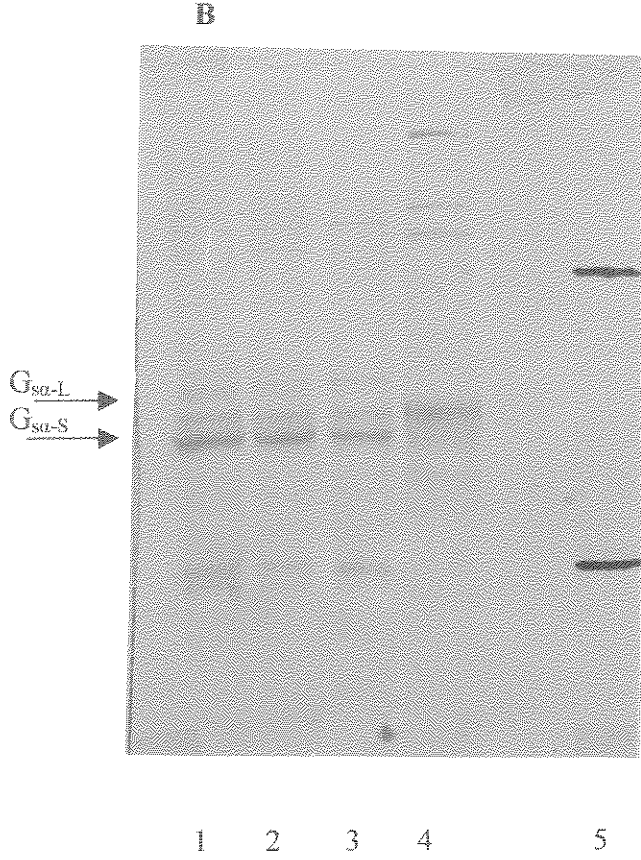
G_{sa} ekspresyonunu farklılaşma sürecinde incelemek amacıyla, hücrelerden farklılaşmaya indüklendikten sonra ikinci günden başlayarak altıncı güne kadar örnekler alındı, zar kesimleri hazırlandı ve G_{sa} antikoruyla immün tepkimeleri incelendi.



Şekil 6.14. (A). G_{sa} proteininin Western-blot analizi: Farklılaşmış hücrelerden 2.-4. günlerden örnekler alındı ve zar kesimleri hazırlandı. 1. Molekül ağırlığı standartları; karbonik anhidraz 29 kDa ve fosforilaz b, 97 kDa 2. Beyin zarı S142 3. İkinci gün, 4. Üçüncü gün, 5. Dördüncü gün. Hücre zar örnekleri 5×10^6 hüç/kuyu olarak yüklendi.

Tablo 6.7. K ve F K562 Hücre Zarlarında G_{sa} Alt Birim Düzeyleri: Şekil 6.14. A' daki protein bantlarının dansitometrik analiz değerleri.

Protein		Uygun						
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
G_{sa-L}								
1	V1	0.071	27.94	0.000	0.193	1.9874e+0	1.9858e+0	50.68
2	V2	0.016	27.94	0.000	0.148	4.5046e-1	4.4892e-1	11.46
3	V3	0.031	27.94	0.000	0.115	8.6335e-1	8.6181e-1	21.99
4	V4	0.022	27.94	0.000	0.141	6.2362e-1	6.2208e-1	15.87
Zemin	V5	0.000	27.94	0.000	0.201	1.5453e-3		
G_{sa-S}								
1	V1	0.043	27.43	0.000	0.145	1.1707e+0	1.1699e+0	17.74
2	V2	0.043	27.43	0.000	0.273	1.1913e+0	1.1905e+0	18.06
3	V3	0.086	27.43	0.000	0.322	2.3523e+0	2.3515e+0	35.67
4	V4	0.069	27.43	0.000	0.267	1.8818e+0	1.8810e+0	28.53
Zemin	V5	0.000	27.43	0.000	0.030	7.9027e+0		



Şekil 6.14. (B) G_{sa} proteininin Western-blot analizi: 1. Beşinci gün 2. Altıncı gün 3. Hemin ile indüklenmeyen örnek. 4. Beyin zarı (S142) 5. Molekül ağırlığı standartları; karbonik anhidraz 29 kDa ve fosforilaz b, 97 kDa. Hücre zar örnekleri 5×10^6 hüc/kuyu olarak yüklendi.

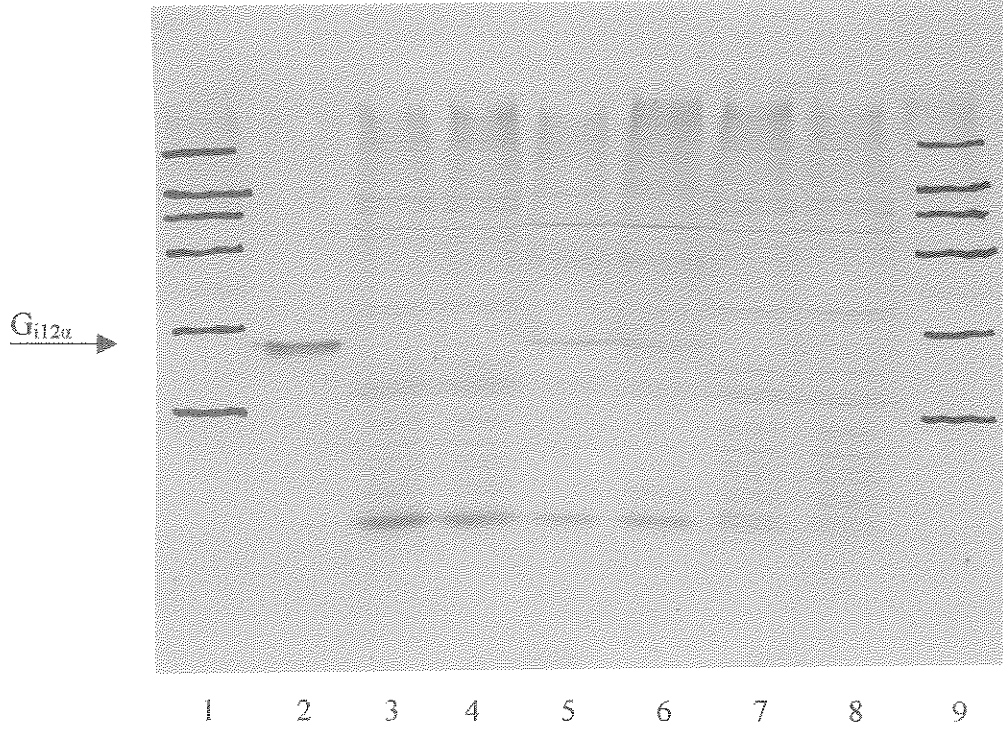
Tablo 6.8. K ve F K562 Hücre Zarflarında G_{sa} Alt Birim Düzeyleri: Şekil 6.14. B' deki protein bantlarının dansitometrik analiz değerleri.

Protein		Uygun						
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
G_{sa-L}								
1	V1	0.146	27.94	0.000	0.491	2.5428e+0	2.5413e+0	23.01
2	V2	0.107	27.94	0.000	0.302	1.8577e+0	1.8562e+0	16.81
3	V3	0.076	27.94	0.000	0.255	1.3178e+0	1.3163e+0	11.92
4	V4	0.060	27.94	0.000	0.185	1.0532e+0	1.0517e+0	9.52
G_{sa-S}								
1	V1	0.050	27.43	0.000	0.223	8.6504e-1	8.6354e-1	7.82
2	V2	0.039	27.43	0.000	0.127	6.8554e-1	6.8404e-1	6.19
3	V3	0.033	27.43	0.000	0.109	5.7607e-1	5.7457e-1	5.2
4	V4	0.124	27.43	0.000	0.229	2.1572e+0	2.1557e+0	19.52
5	V5	0.000	27.43	0.000	0.071	1.5029e-3		

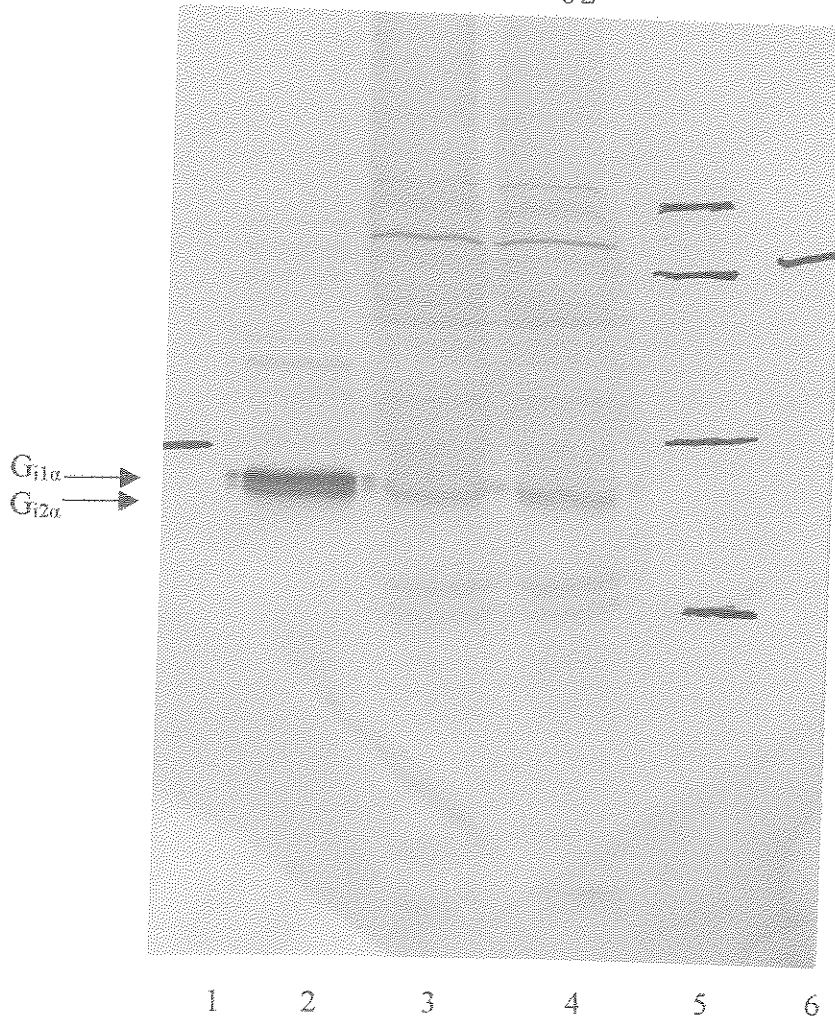
Şekil 6.14. A ve 6.14. B' deki Western-blot' ların dansitometrik değerlendirilmesinde, hemin ile indüklenmeyen kontrol grubuna göre hemin ile farklılaşmaya indüklenen grupta G_{sa-S} ' da beşinci günde % 50, altıncı günde % 20 artış olduğu belirlendi. Kontrol grubuna göre G_{sa-L} ' de beşinci günde % 40, altıncı günde ise % 93 artış olduğu saptanmıştır Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan beyin zarında G_{sa} ' nın uzun (L) formu, kısa (S) formuna göre daha fazla miktarda iken K562 hücrelerinde kısa formun daha fazla miktarda bulunduğu belirlendi.

6.1.4.5. Eritroid Hücre Farklılaşmasında G_{i12a} Düzeylerinin Saptanması

K562 hücre alt kesimlerinde G_{i12a} düzeyleri mini gel elektroforeziyle saptanamadı (Şekil 6.15.) bu nedenle Western-blot analizi protein miktarı artırılarak, büyük gellerde tekrarlandı (Şekil 6. 16.)



Şekil 6.15. $G_{112\alpha}$ proteininin Western-blot analizi: Hücre özütü, Zar kesimi ve sitoplazmik kesim proteinleri % 7.5 SDS-poliakrilamit gel elektroforezinde ayrıldıktan sonra nitroselüloz membrana aktarıldı. 1.Molekül ağırlığı standartları (29 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa 116 kDa, 205 kDa). 2. Beyin zar kesimi, 3.Hücre özütü K, 4.Hücre özütü F, 5.Zar kesimi K, 6.Zar kesimi F, 7.Sitoplazmik kesim K, 8.Sitoplazmik kesim F, 9.Molekül ağırlığı standartları. Tüm örnekler 50 µg.



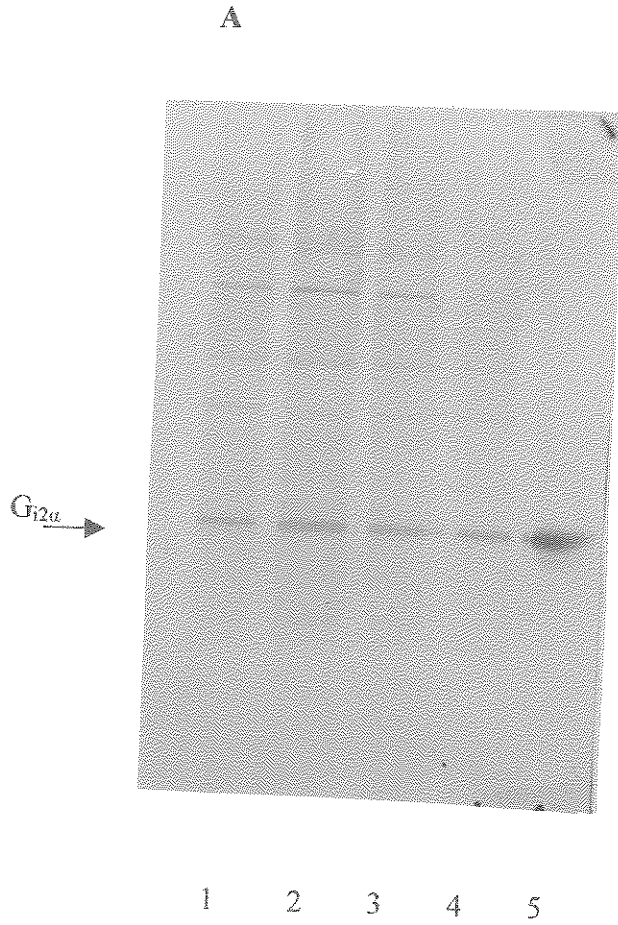
Şekil 6.16. Zar kesimlerinin anti- $G_{i12\alpha}$ ile etkileşimi: 1. Yumurta albumini 45 kDa, 2. Beyin zarı S142, 3. Zar kesimi K(140 μ g), 4. Zar kesimi F (140 μ g), 5. Molekül ağırlığı standartları; 29 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa, Sığır serum albumini 66 kDa.

Tablo 6.9. K ve F K562 Ham Zar Kesimlerinde $G_{i2\alpha}$ Düzeyleri:Şekil 6.16.'daki protein bantlarının dansitometrik analiz sonuçları.

Protein						Uygun		
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
2	V1	0.494	11.97	0.104	0.812	5.9141e+0	4.4761e+0	51.23
3	V2	0.250	11.97	0.115	0.343	2.9898e+0	1.5518e+0	17.76
4	V3	0.233	11.97	0.089	0.361	2.7930e+0	1.3550e+0	15.51
Zemin	V4	0.120	11.97	0.085	0.204	1.4381e+0		

-63-

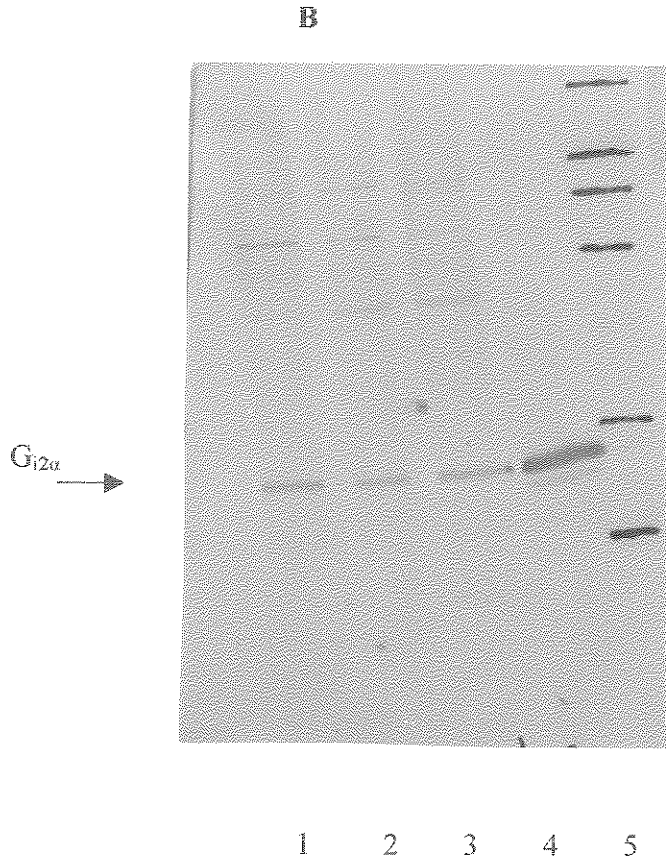
K562 hücrelerinde $G_{i1\alpha}$ protein ekspresyonunun bulunmadığı ancak $G_{i2\alpha}$ düzeyinde F grubunda K grubuna göre % 22 oranında azalma olduğu belirlendi (Şekil 6.16.). $G_{i2\alpha}$ düzeyinin farklılaşma sürecinde değişip değişmediğini saptamak üzere, hemin indüksiyonundan sonra 1.-6. günlerde örnekler alınarak Western-blot analizi tekrarlandı (Şekil 6.17. A, 6.17.B.).



Şekil 6.17.(A). Farklılaşma sürecinde $G_{i2\alpha}$ ekspresyonu Western-blot analizi: 1. Dördüncü gün 2. Üçüncü gün 3. İkinci gün, 4. Birinci gün, 5. Beyin zarı S142 kesimi. Hücre zar kesimi örnekleri 5×10^6 hüç/kuyu olarak yüklendi.

Tablo 6.10. K ve F K562 Hücre Zarlarında $G_{12\alpha}$ Düzeyleri: Şekil 6.18' deki protein bantlarının dansitometrik analiz sonuçları.

Protein		Uygun						
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
1	V1	0.055	12.98	0.000	0.172	7.1597e-1	7.0187e-1	8.39
2	V2	0.126	12.98	0.000	0.217	1.6376e+0	1.6235e+0	19.42
3	V3	0.089	12.98	0.000	0.196	1.1570e+0	1.1429e+0	13.67
4	V4	0.080	12.98	0.000	0.201	1.0333e+0	1.0192e+0	12.19
5	V5	0.299	12.98	0.000	0.584	3.8879e+0	3.8738e+0	46.33
Zemin	V6	0.001	12.98	0.000	0.028	1.4098e-2		



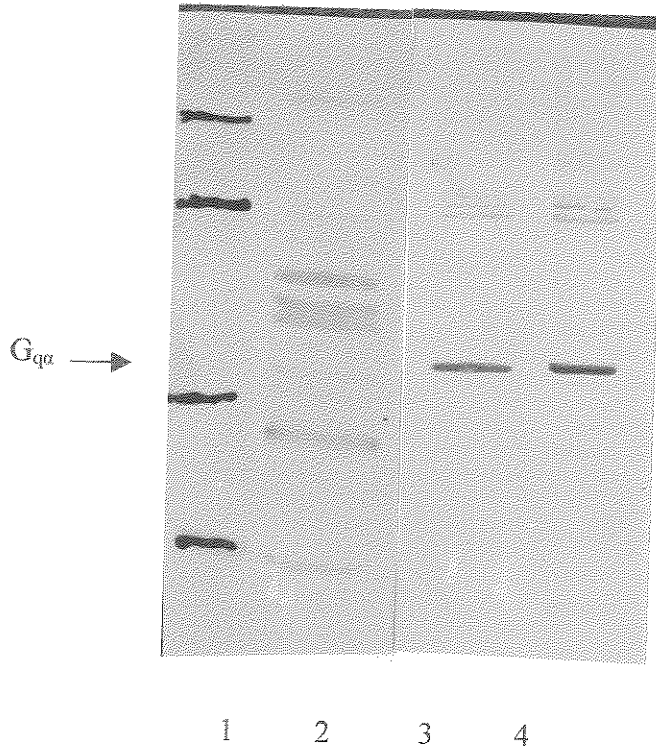
Şekil 6.17. (B) Farklılaşma sürecinde $G_{12\alpha}$ ekspresyonu Western-blot analizi: 1. Beşinci gün 2. Altıncı gün 3. Hemin ile indüklenmeyen zar kesimi. 4. Beyin zarı S142 kesimi. 5. Molekül ağırlığı standartları (31 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa, 116 kDa.). Hücre zar kesimi örnekleri 5×10^6 hüç/kuyu olarak yüklendi.

Tablo 6.11. K ve F K562 Hücre Zarlarında $G_{i2\alpha}$ Düzeyleri: Şekil 6.18.' deki protein bantlarının dansitometrik analiz sonuçları.

Protein		Uygun						
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
1	V1	0.063	32.74	0.000	0.255	2.0748e+0	1.3369e+0	11.83
2	V2	0.047	32.74	0.000	0.198	1.5541e+0	8.1622e-1	7.22
3	V3	0.071	32.74	0.001	0.461	2.3252e+0	1.5873e+0	14.04
4	V4	0.254	32.74	0.017	0.565	8.3021e+0	7.5642e+0	66.91
Zemin	V5	0.023	32.74	0.003	0.170	7.3790e-1		

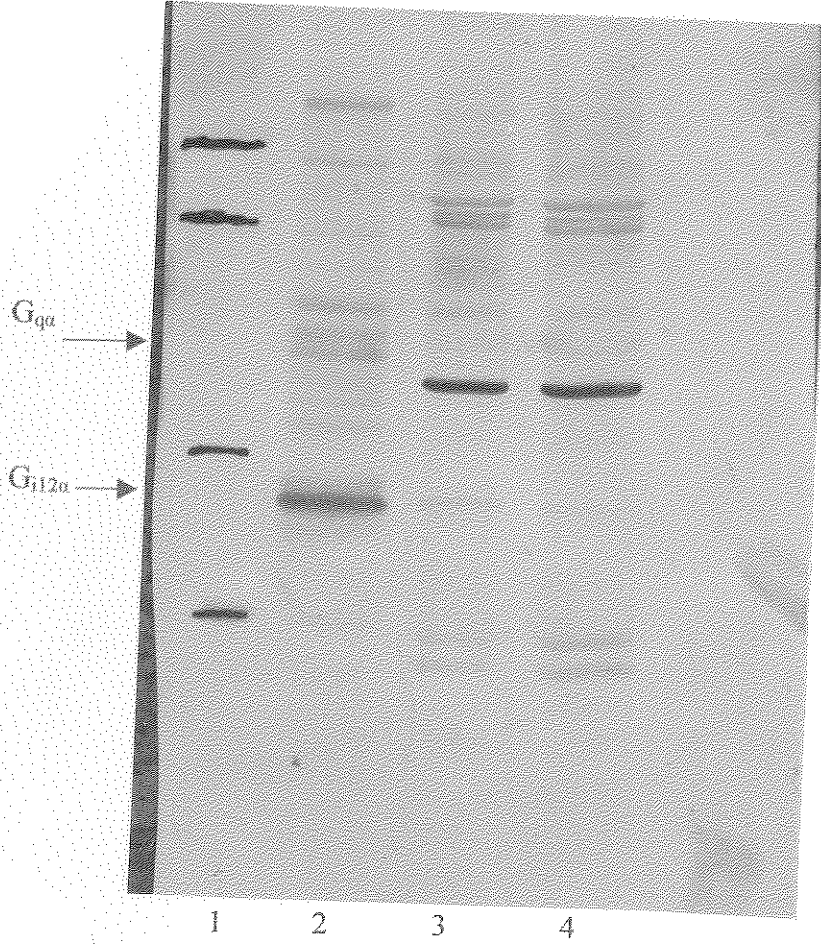
Dansitometrik değerlendirmede farklılaşmış gruptaki $G_{i2\alpha}$ düzeyi kontrol grubuna göre; altıncı günde % 50, beşinci günde % 15 azaldığı belirlendi.

6.1.4.6. $G_{q\alpha}$ Düzeylerinin Saptanması



Şekil 6.18. Anti- $G_{q\alpha}$ ile Western-blot analizi: 1.Molekül ağırlığı standartları(31 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa). 2.Beyin zar kesimi (50 µg), 3.K562 zar kesimi 75 µg (K), 4.K562 zar kesimi 100 µg (F)

G_{qa} antikoruna ile etkileşen proteinin literatürde verilen 42-43 kDa yerine 45 kDa üzerinde göç ettiği gözlemlendi. Bu K562 hücrelerinde G_{qa} 'nın translasyon sonrası değişime uğramış olduğunu düşündürdü (Şekil 6.18. ve 6.19.).

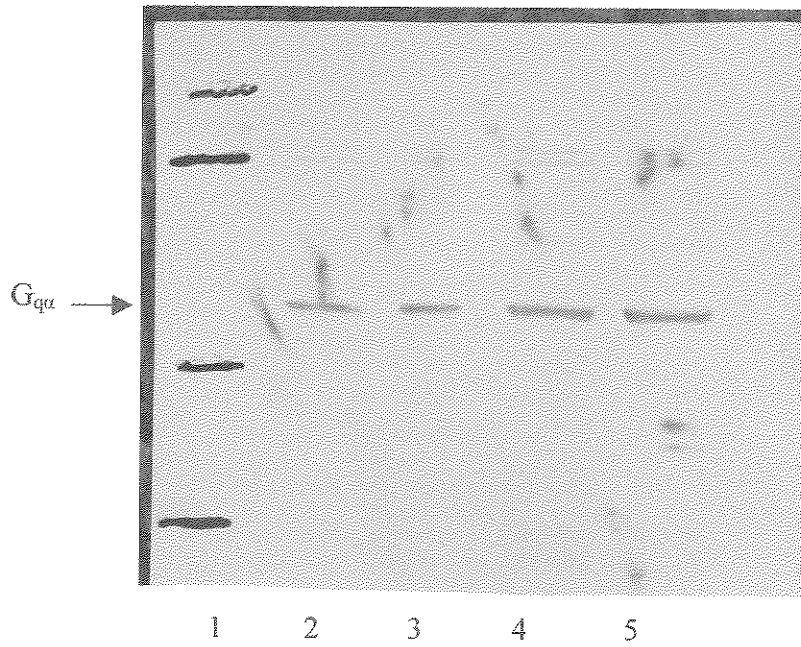


Şekil 6.19. Anti- G_{qa} ve anti- G_{112a} ile Western-blot analizi: 1. Molekül ağırlığı standartları (21 kDa, 31 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa) 2. Beyin zar proteinleri 70 µg, 3. K562 zar proteinleri 100 µg (K), 4. K562 zar proteinleri 100 µg (F).

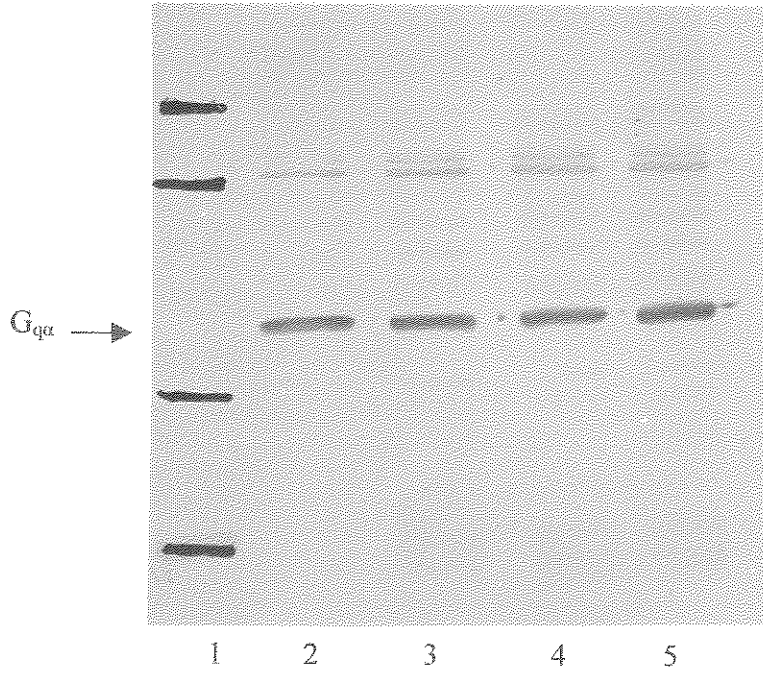
Tablo 6.12. K ve F Beşinci Gün Ham Zar Kesimlerinde G_{qa} Düzeyleri.

Protein		Uygun						
Bant	Hacim	Ortalama	Alan	Min	Max	Hacim	Hacim	%
No' ları	No' ları	(OD)	(mm*mm)	(OD)	(OD)	(OD* mm*mm)	(OD* mm*mm)	Hacim
2	V1	0.465	16.74	0.127	0.718	7.7894e+0	5.6240e+0	36.65
3	V2	0.390	16.74	0.109	0.968	6.5322e+0	4.3668e+0	28.46
4	V3	0.449	16.74	0.091	0.984	7.5180e+0	5.3526e+0	34.89
Zemin	V4	0.129	16.74	0.104	0.261	2.1654e+0		

Dansitometrik analiz sonucunda, K grubuna göre F grubundaki G_{qa} düzeyinin %12 oranında arttığı saptandı. Alınan sinyalin özgülüğünün belirlenmesi amacıyla artan miktarda K ve F örnekleri antikorla etkileştirildi ve sinyalin oranlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 6.20, 6.21.).



Şekil 6.20. (K) K562 hücrelerinde anti- G_{qa} etkileşiminin protein miktarına bağımlılığı: 1. Molekül ağırlığı standartları (31 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa) 2. 20 µg, 3. 40 µg, 4. 80 µg, 5. 100 µg zar kesimi.



Şekil 6.21. (F) K562 hücrelerinde anti- $G_{q\alpha}$ etkileşiminin protein miktarına bağımlılığı: 1. Molekül ağırlığı standartları (31 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97 kDa), 2. 20 µg, 3. 40 µg, 4. 80 µg, 5. 100 µg zar kesimi.

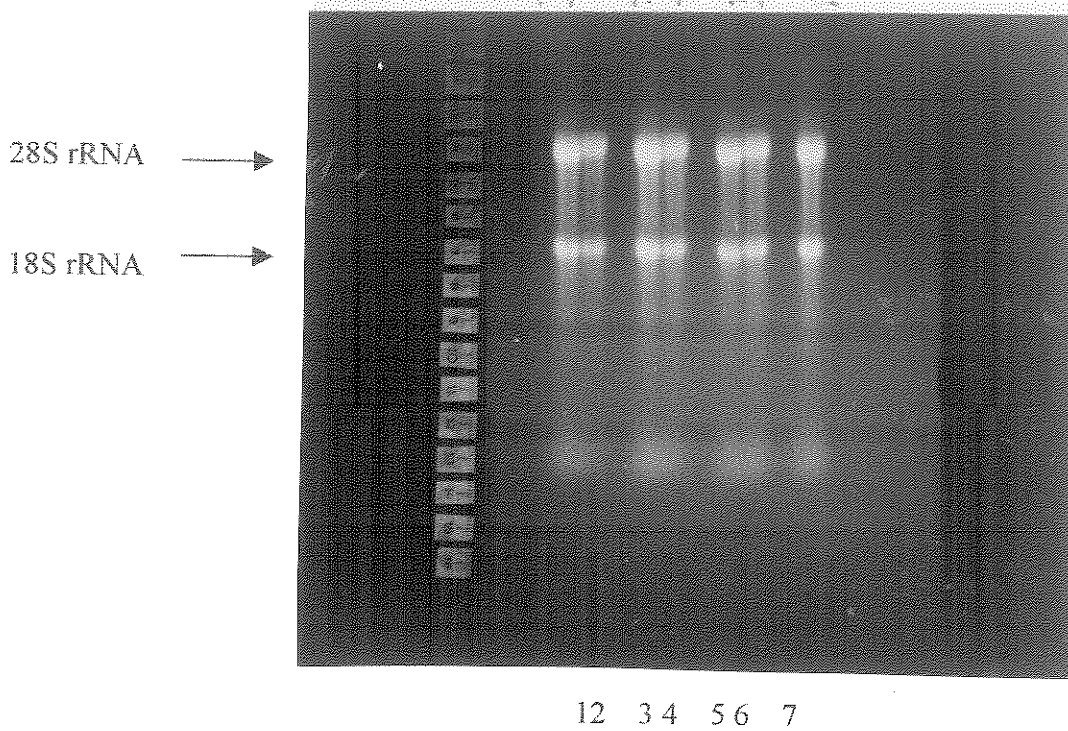
6.1.4.7. $G_{16\alpha}$ Protein Ekspresyonu

Kontrol ve farklılaşmış K562 hücrelerinden hazırlanan, 50 µg protein içeren ham hücre özütü, sitoplazma ve ham zar kesimleri % 10' luk SDS-poliakrilamit gel elektroforezine uygulandı. Proteinler nitrocelüloz membrana aktarıldıktan sonra $G_{16\alpha}$ antikoru ile etkileştirildi ancak özgün bir sinyal elde edilemedi.

6.5. K562 Hücrelerinde G_{sa}^{-69-} Ekspresyonunun Northern-Blot Analizi ile İncelenmesi

6.5.1. Toplam RNA Örneklerinin % 1 Formaldehit Agaroz Gel Elektroforezi ile İncelenmesi

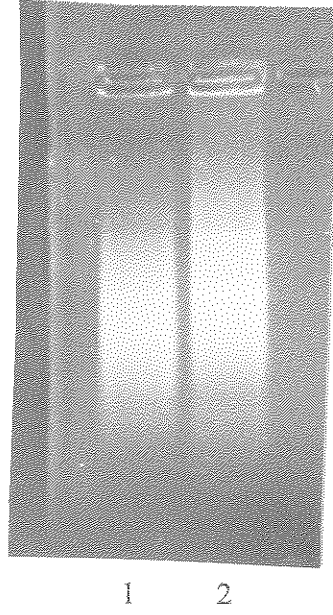
K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşma gruplarından toplam RNA örnekleri guanidyum tiyosiyanat yöntemine göre elde edildi. 15-20 µg toplam RNA içeren örnekler % 1 formaldehit agaroz gel elektroforezinde boylarına göre ayrıldı.



Şekil 6. 22. Toplam RNA örneklerinin % 1 formaldehit agaroz gel elektroforezi: Gereç ve Yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde elde edilen toplam RNA örnekleri, % 1 formaldehit agaroz gel kuyularına 20 µg olacak şekilde yüklendi. gelin fotoğrafı UV altında çekildi. 1,3,5,7; Toplam RNA (K), 2,4,6; Toplam RNA (F).

6.5.2. mRNA Örneklerinin Agaroz Gel Elektroforezi ile İncelenmesi

K562 hücrelerinde mRNA eldesi Gereç ve Yöntem bölümünde anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Ede edilen mRNA örnekleri TBE içinde çözünmüş % 1' lik agaroz gelinde incelendi.



Şekil 6.23. mRNA örneklerinin % 1' lik agaroz gel elektroforezi: 4 µg mRNA örnekleri % 1' lik agaroz gel kuyularına yüklendi ve mRNA örnekleri boylarına göre ayrıldı. 1. mRNA (K), 2. mRNA (F).

6.1.5.3. Oligonükleotit Probların İşaretlenmesi

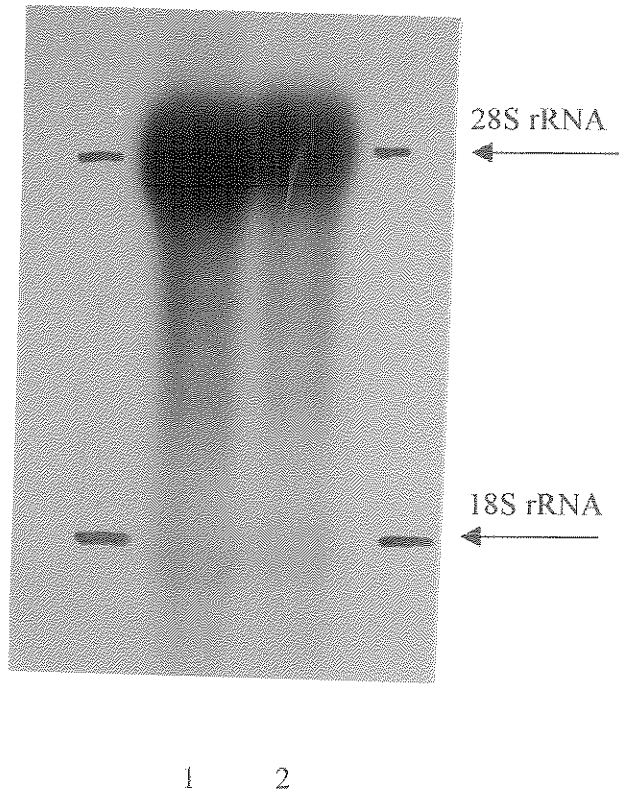
Oligonükleotit problar Gereç ve Yöntem' de belirtildiği gibi T4-polinükleotit enzimi ve 50 µCi [γ - 32 P]ATP varlığında işaretlendi. İşaretleme verimini saptamak için karışımdan alınan 0.05 µl örnek % 10 TCA ile çöktürülmeden önce ve sonra GF/C filtrele emdirildi ve sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. Elde edilen işaretleme verimleri Tablo 6.13.' de gösterilmiştir.

Tablo 6.13. 28S rRNA ve G_{sa} Oligonükleotit Problarının [γ - 32 P]ATP Varlığında İşaretlenme Verimleri.

Prob	Deney	TCA öncesi cpm	TCA sonrası cpm	% Verim
G _{sa}	1	12.152.400	7.983.200	66
"	2	5.906.400	3.876.000	67
"	3	12.235.200	7.948.800	65
28S rRNA	1	30.677.200	10.678.000	35

6.1.5.4. RNA Miktar ve Kalitesinin 28S rRNA Oligonükleotit Probu ile İncelenmesi

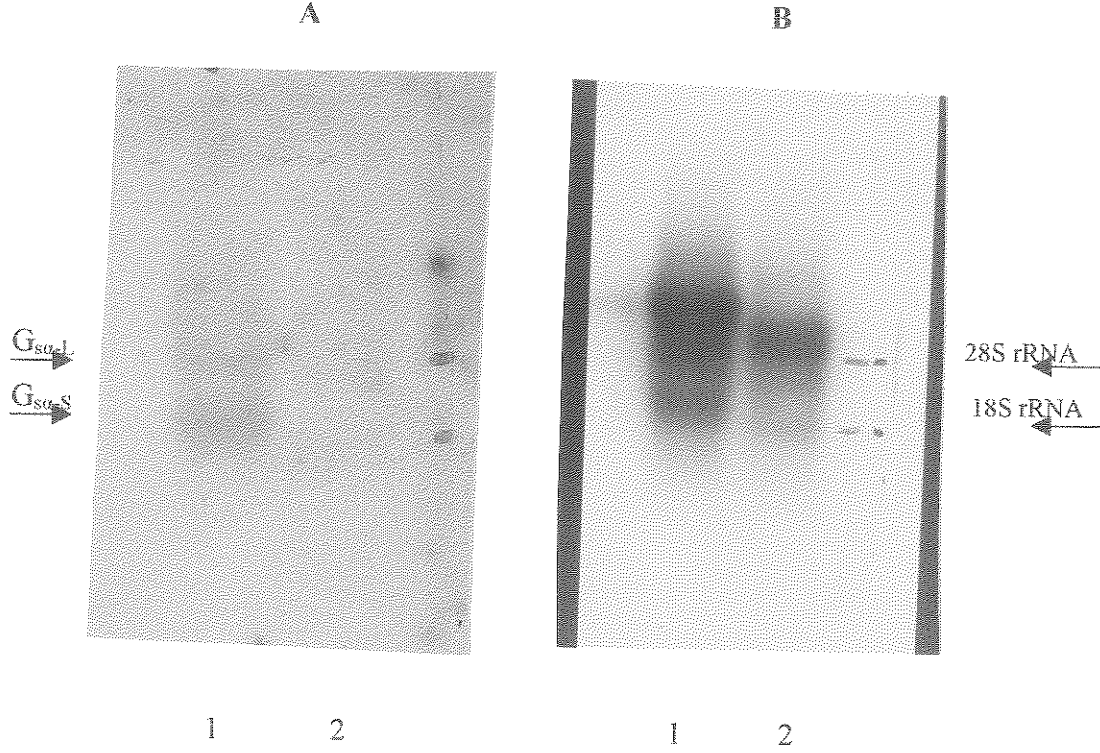
K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış örneklerinden elde edilen RNA örnekleri Northern aktarma işlemi ile % 1 formaldehit agaroz geline aktarıldı. RNA örneklerinin özgün prob ile hibritlemenin uygun olup olmadığının araştırılması için, nitroselüloz membrandaki RNA örnekleri Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği gibi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ile işaretli 28S rRNA probu ile hibridize edildi.



Şekil 6.24. RNA örneklerinin 28S rRNA Probu ile Hibritleme İşlemi: Hibritleme işlemi % 50 formamit varlığında 42° C' da yapıldı. Yıkamalar Gereç ve Yöntem' de belirtildiği gibi yapıldı ve son yıkama 45° C' da gerçekleştirildi.

6.1.5.5. Eritroid Hücre Farklılaşmasında G_{sa} mRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Toplam RNA örnekleri nitroselüloz membrana emdirildi ve G_{sa} proteinine özgün işaretli oligonükleotit prob ile etkileştirildi. Özgün oligonükleotit prob ile hibritleme işleminden sonra, aynı membran 28S rRNA probu ile etkileştirildi.



Şekil 6.25. K562 hücrelerinde G_{sa} ekspresyonu: K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşma örneklerinden elde edilen yaklaşık 20 μ g toplam RNA örnekleri, G_{sa} genine özgün oligonükleotit prob (A) ve 28S rRNA probu (B) ile etkileştirildi. Hibritleme işlemi 42° C' da ve % 50 formamid varlığında gerçekleştirildi. Yıkamalar gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği şekilde yapıldı ve son yıkama sıcaklığı 40° C (A) ve 45° C (B) olarak belirlendi. 1. Kontrol, 2. Farklılaşmış.

Şekil 6.25.' de görüldüğü gibi kontrol grubunda sinyal elde edilmesine karşın F grubunda sinyal gözlenemedi. Daha sonra aynı membranın 28S rRNA probu ile hibritlenmesinde, kontrol grubunda F grubuna göre daha fazla miktarda toplam RNA olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, K ve F örnekleri arasında varmış gibi gözlenen farkın gele yüklenen toplam RNA miktarlarındaki farktan kaynaklandığı düşünüldü. Ayrıca G_{sa-L} ' e ait sinyalin G_{sa-S} ' a göre Western-blot analizinde olduğu gibi daha zayıf olduğu gözlemlendi.

6.2 G_{oa} ve T-Proteinlerinin Saflaştırılması, T Proteininin Çözeltideki Yapısının İncelenmesi

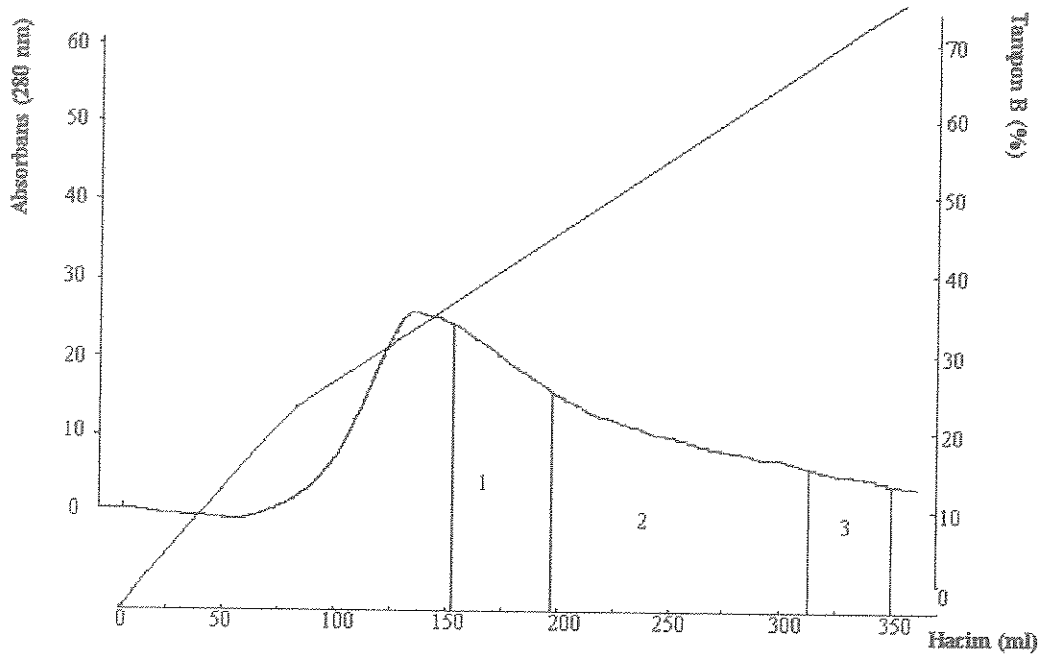
6.2.1 G_{oa} 'nın Saflaştırılması

G_{oa} 'nın saflaştırılmasında gerek Rapor 1 ve Rapor 2'de izlenen Lee ve ark.(37)'na ait sonuçlarda Q-Sefaroz aşamasında G_{oa} için elde edilen saflaşmanın görülmemesi, gerekse hidroksiapatit kolonunda olumsuz sonuçların alınması izlenilen yöntemde bazı düzeltmeler yapılmasını gerektirdi. Özellikle yüksek moleküler ağırlıktaki protein safsızlıklarından kurtulabilmek amacıyla Fenil-Sefaroz ile Q-Sefaroz kolonları arasına Gel Filtrasyon basamağı eklendi. Q-Sefaroz kolonu ise Resource Q kolonu değiştirildi.

Aşağıda, sözü edilen değişiklikler uygulanarak gerçekleştirilen çeşitli deneylerden iki tanesine ait sonuçlar verilmektedir. Deneylerden birincisinde sırasıyla Fenil-Sefaroz, Gel Filtrasyon, Resource Q ve hidroksiapatit basamakları kullanılmış, ikinci deneyde ise protein kaybını daha aza indirebilmek amacıyla Fenil Sefaroz sonrası doğrudan Resource Q aşamasına geçilmiş ve daha sonra Gel Filtrasyon kromatografisi uygulanmıştır.

Deney 1

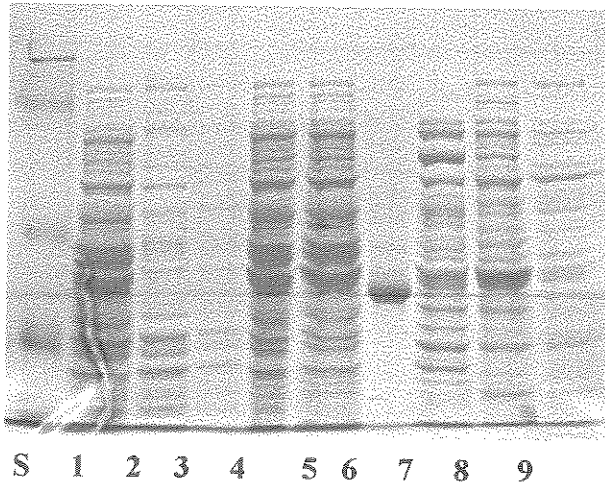
Deneyde 12 litre kültüre karşılık gelen bakteri çökelekleri kullanıldı (~63 g). Fenil-Sefaroz kolonu için akış hızı 5 ml/dak., kesimler 4 ml olarak ayarlandı. Bu aşamadan elde edilen toplama grafiği Şekil 6.26'da ; Fenil-Sefaroz kolonundan ve daha önceki aşamalardan toplanan havuzların elektroforetik analizi ise Şekil 6.27'de görülmektedir.



0.00	CONC	%B	0.0
0.00	RL/MIN		5.00
0.00	VALUE.POS		1.2
0.00	PORT.SET		6.0
200.00	CONC	%B	40.0
200.00	PORT.SET		6.1
300.00	CONC	%B	60.0
300.00	CONC	%B	100
500.00	PORT.SET		6.0

Şekil 6.26: Fenil-Sefaroz
Toplama Grafiği

Havuzlar grafikte gösterildiği şekilde oluşturuldu.



Şekil 6.27: Fenil-Sefaroz,
SDS-PAGE

S.protein standartları

(yukarıdan aşağıya):

250 kDa, 148 kDa, 60 kDa,

36 kDa, 1.Lizat, 2.DEAE-1,

3.DEAE-2,4.DEAE-3,

→G₀₀

5.Amonyum sülfat üst sıvı,

6.G₀₀(Calbiochem),7.FSH1,

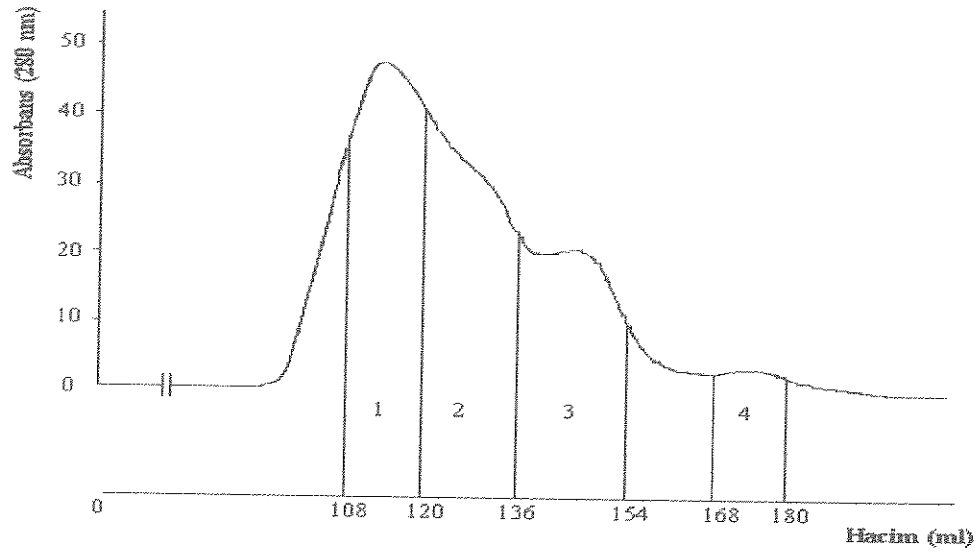
8.FSH2, 9.FSH3

Fenil-Sefaroz'da [35 S]GTPyS bağlama testi sonuçları dikkate alınarak (Tablo 6.14) gradyentin %38 ile %60 arasına karşılık gelen 2 ve 3.Havuzlar diyaliz edilip 10 ml'ye yoğunlaştırıldı ve gel filtrasyon kolonuna yüklendi.

Tablo 6.14: Saflaştırma aşamalarına ait çeşitli kesimlerin (DEAE: DEAE-Sefasel, AS: Amonyum Sülfat üst sıvı, FSH: Fenil-Sefaroz Havuz, RQH: Resource Q Havuz) toplam hacimleri ,230,260,280 ve 310 nm'deki absorbens değerleri ve GTPyS bağlama testi sonuçları.

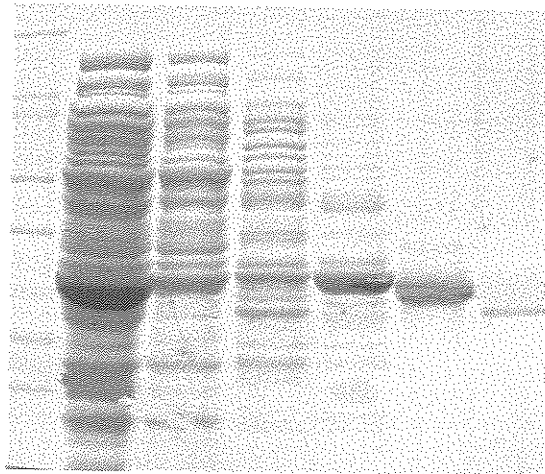
	Hacim (ml)	230	260	280	310	Toplam OD	Toplam cpm	Cpm/mg
Lizat	290	34	35.7	23.5	1.2	6815	296670	43.5
DEAE-1	340	10.5	13.5	7	0.3	2380	69020	29
DEAE-2	200	3	3.7	2	0.1	400	38000	95
DEAE-3	190	27	11.3	8	0.4	1520	879510	578
AS	210		9	6.4	0.4	1344	56180	42
FSH1	50	10	3.3	2.6	0.02	130	40100	308
FSH2	115	8.3	1.4	1.6	0.09	184	138483	758
FSH3	25	5.2	0.8	1	0.01	25	51700	2068
GF-yük	20	38	7	9.4	0.3	94	232579	6730
GFH1	32	10.6	1.6	2	0.06	31	136460	8770
GFH2	14	5.6	0.5	0.9	0.01	12.6	20216	1604
GFH3	18	3.8	0.3	0.5	0.01	9	16920	1880
GFH4	12	0.3	0.05	0.06	0.01	0.7	1452	2074
RQ-yük	10	15.5	2	2.6	0.07	26	87332	3360
RQH1	6	1.1	1.1	1	0.11	6	1602	267
RQH2	12	2.5	3.5	2.8	0.2	42	49260	1172
RQP3	12	3	1.4	1.6	0.3	19	1872	98.5

Gel filtrasyon kolonu için akış hızı 2.5 ml/dak., kesim toplayıcısı 2 ml/dak.'ya ayarlandı. Kolona ait toplama grafiği ve havuzların elektroforetik analizi (GFH1, GFH2, GFH3: 2,3,4 no'lu havuzlar) Şekil 6.28 ve 6.29'da görülmektedir.



**Şekil 6.28: Gel Filtrasyon
Toplama Grafiği**
Havuzlar grafikte gösterilen
şekilde oluşturulmuştur.

```
0.00 CONC 28 0.0
0.00 ML/MIN 2.50
0.00 VALUE.POS 1.2
0.00 VALUE.POS 1.2
100.00 PORT.SET 6.1
250.00 PORT.SET 6.0
```



**Şekil 6.29: Gel Filtrasyon
SDS-PAGE**

S.protein standartları

(yukarıdan aşağıya):

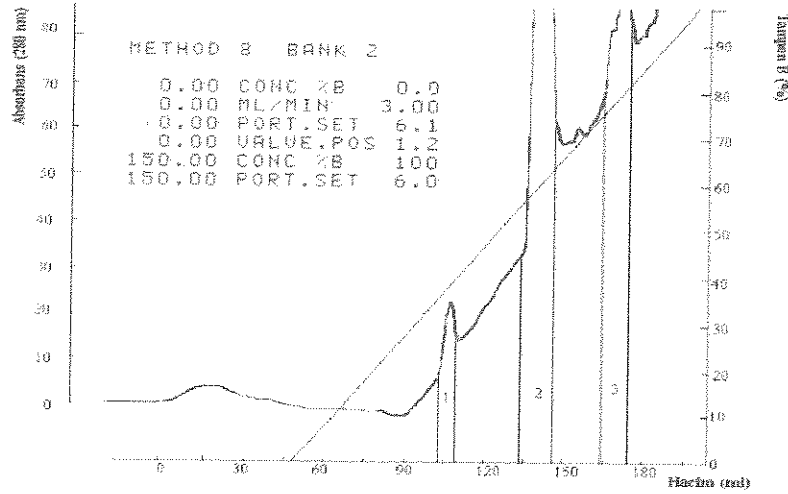
200 kDa, 116.3 kDa, 97.4
kDa, 66.3 kDa, 55.4 kDa,
36.5 kDa, 31 kDa

1.Gel filtrasyona yüklenen
örnek, 2.GFH1, 3.GFH2,
4.GFH3, 5.ovalbümin,
6.G_{0α} (Calbiochem)

S 1 2 3 4 5 6

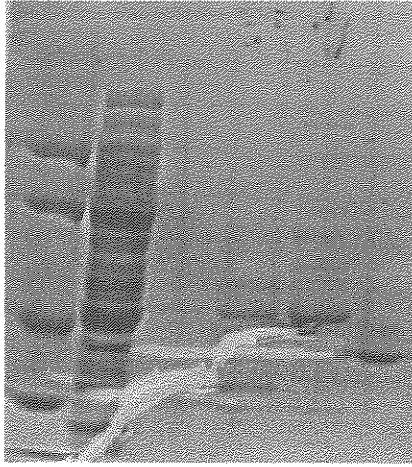
[³⁵S]GTPγS bağlama testinde en yüksek sayım Havuz 1'den alındı. Kolonun 108-120 ml'eri arasında toplanan Havuz 1 iki kez Resource Q başlama tamponu ile seyreltildikten sonra toplam hacim 10 ml olacak şekilde yoğunlaştırılarak Resource Q kolonuna yüklendi. Deney sonuçlarından görüldüğü gibi G_{oa} toplanan hacmin 100-140 ml'si arasında kolondan çıkmıştır. Gel filtrasyon kolonunun kalibrasyon eğrisiyle yapılan karşılaştırma bu bölgenin 115 kDa molekül ağırlığındaki proteinlerin çıktığı bölge olduğunu göstermektedir. Bu sonuç proteinin kümelenme oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Örnek uygulanmadan önce Resource Q kolonu önce başlama, sonra toplama ve yeniden başlama tamponu ile dengelendi. Akış hızı 3 ml/dak., kesim toplayıcısı 3 ml'ye ayarlandı. Proteinler 0-300 mM NaCl gradyenti ile toplandı. Şekil 6.30'da görüldüğü gibi bu aşamada yaklaşık 150-160 mM NaCl derişimleri arasında (%50-%68 Tampon B) [³⁵S]GTPγS bağlama testinde yüksek sayım veren bir pik elde edilmiştir. Ancak SDS-PAGE ve Western blot analizlerinde bu havuzda G_{oa} (Calbiochem) ile aynı çizgide bulunan yerde hiçbir bant gözlenmemiştir (Şekil 6.31 ve 6.32).



Şekil 6.30: Resource Q Toplama Grafiği

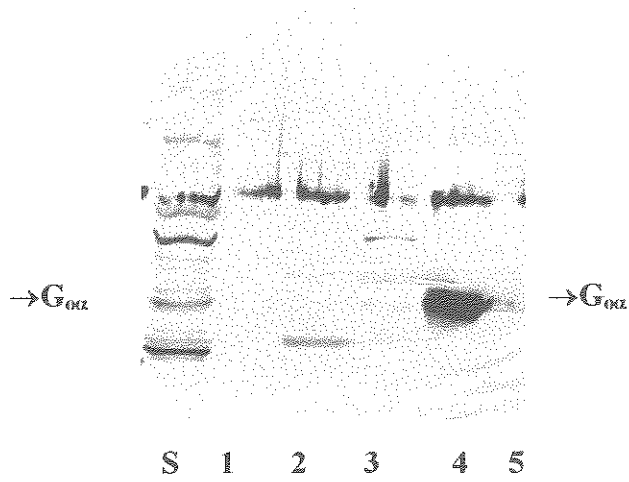
Havuzlar grafikte gösterilen şekilde oluşturulmuştur.



S 1 2 3 4 5

Şekil 6.31: Resource Q SDS-PAGE

S.protein standartları (yukarıdan aşağıya):
97 kDa, 64 kDa, 43 kDa, 30 kDa
1.yüklenen örnek, 2.RQH1, 3.RQH2
4.RQH3, 5.G_α (Calbiochem)

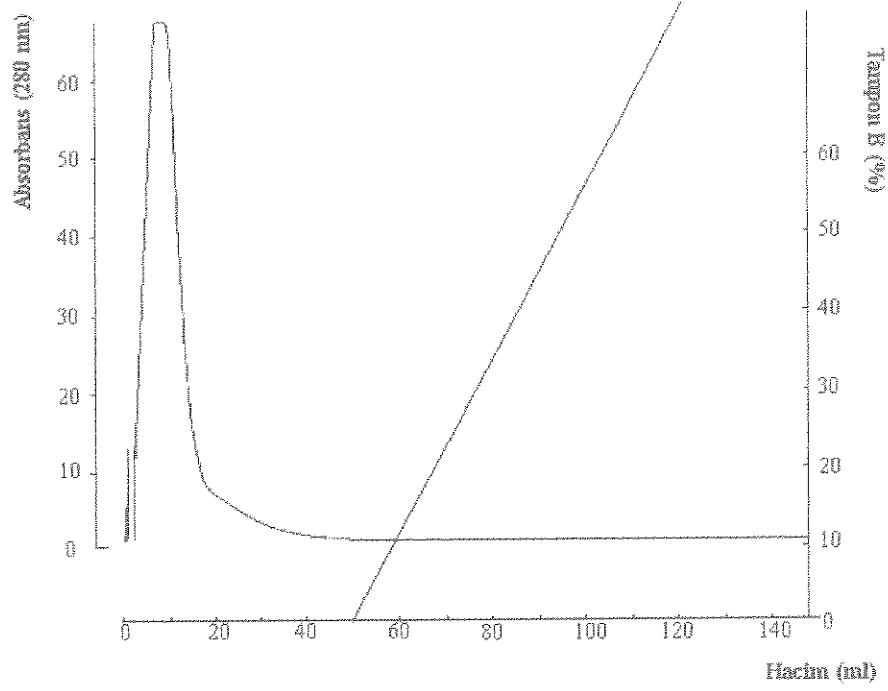


S 1 2 3 4 5

Şekil 6.32:Resource Q Western blot

S.protein standartları (yukarıdan aşağıya):
97 kDa, 64 kDa, 43 kDa, 30 kDa
1.yüklenen örnek, 2.RQH1, 3.RQH2
4.RQH3, 5.G_α (Calbiochem)

Hidroksiapatit kolonuyla yapılan daha önceki deneylerde G_α proteininin ve diğer proteinlerin kolona hiç bağlanmaksızın kolondan çıkması nedeniyle , kolonla beraber verilen teknik direktifleri gözönünde bulundurarak başlama ve toplama tamponlarının pH değerleri 8.0'den 6.8'e indirildi ve potasyum fosfat sodyum fosfat ile değiştirildi. Resource Q'dan toplanan Havuz 2 (RQH2: 3 no'lu kuyu) seyreltme-yoğunlaştırma işlemiyle hidroksiapatit başlama tamponu ile dengelendikten sonra, toplam 5 ml hacime yoğunlaştırılan örnek kolona uygulandı.Akış hızı 2 ml/dak., kesim toplayıcısı 2 ml'ye ayarlandı.Yine tüm örnek yıkama aşamasında kolondan çıktı (Şekil 6.33). Kolondan toplanan tüm kesimler birleştirilerek bu kez Bio-Gel HTP kolonundan geçirildi. Proteinler bu kolona bağlandıysa da gel ve Western blot analizinde hiçbir bant gözlenmedi.



0.00 CONC %B 0.0
0.00 ML/MIN 2.00
0.00 VALVE.POS 1.2
0.00 PORT.SET 6.1
100.00 CONC %B 100
100.00 PORT.SET 6.0

Şekil 6.33: Hidroksiapatit Kromatografisi Toplama Grafiği

Şekilde görüldüğü gibi tüm örnek gradyentin başlatılmasından önce, yıkama aşamasında kolona bağlanmadan çıkmıştır.

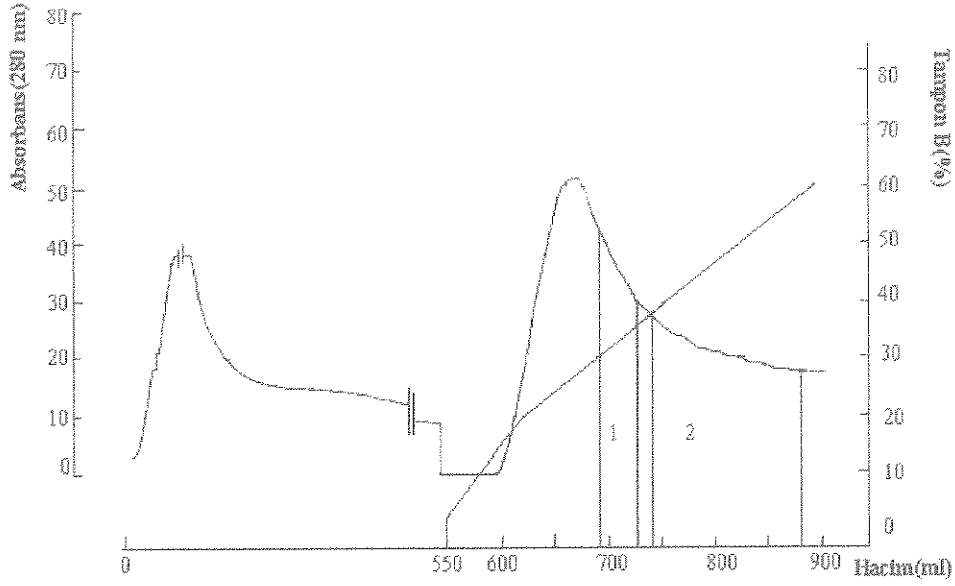
Deney 2

Elde edilen G_{ox} miktarının çok düşük olduğunun saptanması üzerine basamak sayısının neden olduğu protein kaybını daha az indirgeyebilmek için Fenil-Sefaroz kolonundan geçirilen örnekler doğrudan yüksek çözünürlüklü Resource Q kolonuna yüklendi.

Deneyde yine 12 litre kültüre karşılık gelen bakteri çökelekleri kullanıldı (~63 g).Saflaştırma aşamalarına ait absorbans ve $[^{35}S]GTP\gamma S$ bağlama değerleri Tablo 6.15’de görülmektedir.

Tablo 6.15: Deneyde gerçekleştirilen saflaştırma aşamalarına ait kesimlerin (DEAE: DEAE-Sefasel, AS: Amonyum Sülfat üst sıvı, FSH: Fenil-Sefaroz Havuz, RQH: Resource Q Havuz) toplam hacimleri, 230,260,280 ve 310 nm’deki absorbans değerleri ve $GTP\gamma S$ bağlama testi sonuçları.

	Hacim (ml)	230	260	280	310	Toplam OD	Toplam cpm	Cpm/mg
Lizat	300	34.3	36.6	34.2	1.7	10260	588600	57.3
DEAE 1	330	21.3	30	15.4	0.5	5082	28050	5.5
DEAE 2	200	3.8	5.4	3	0.27	600	16200	27
DEAE 3	200	32.8	18.7	13	0.9	2600	1057600	406
AS	266	30	14.4	10	0.7	2660	780976	293
FSH 1	25	13.2	3	3	0.1	75	34350	458
FSH 2	140	10.2	1.8	2.3	0.15	322	299600	930
RQ yük	10	32	8.7	12.7	0.4	127	182694	1438.5
RQH1	10	4.9	3.6	3	0.2	30	141865	4728
RQH2	12	4.4	1	1.4	0.16	17	3792	223
GF yük	10	11	3.9	4	0.36	40	196735	4918
GFH	14	1.5	0.8	1.2	0.27	17	9324	550

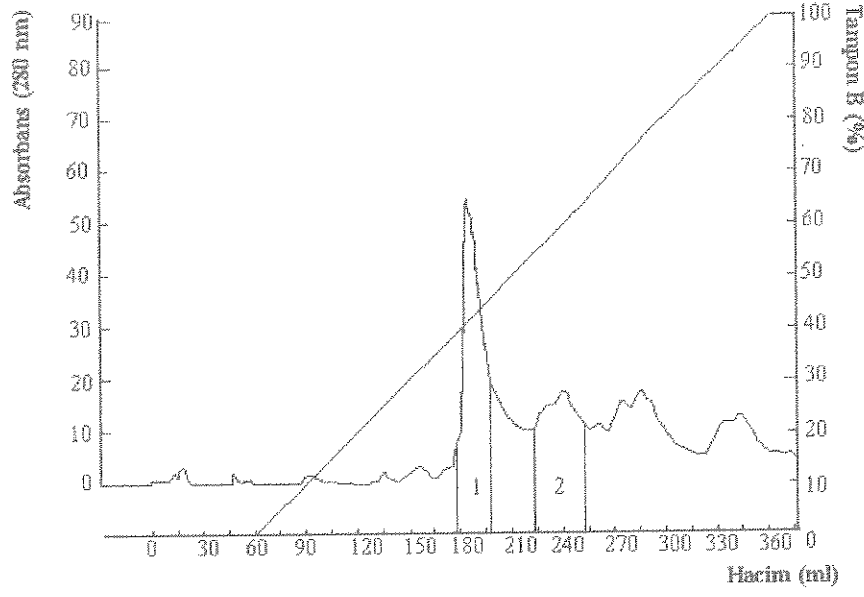


0.00	CONC	KB	0.0
0.00	ML/MIN		5.00
0.00	VALUE.POS		1.2
0.00	PORT.SET		6.1
30.00	CONC	KB	20.0
150.00	CONC	KB	60.0
150.00	PORT.SET		6.0
100.00	CONC	KB	100

**Şekil 6.34: Fenil-Sefaroz
Toplama Grafiği**

Havuzlar grafikte gösterilen şekilde oluşturulmuştur.

Fenil-Sefaroz bir önceki deneyde anlatıldığı şekilde yürütüldü (Şekil 6.34). Havuz 2 Resource Q kolonuna yüklendi. Resource Q kolonuna ait toplama grafiği Şekil 6.35'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 120-150 mM NaCl derişiminde (%40-50 Tampon B) düzgün bir pik elde edildi ve yine bu pikte bağlama testinde en yüksek sayım alındı.

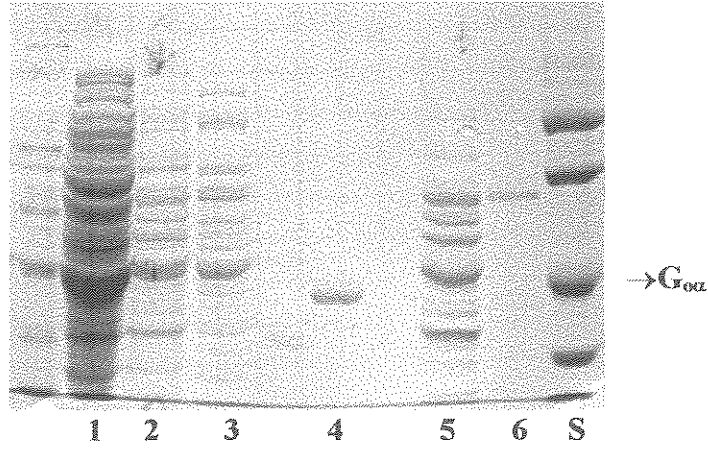


METHOD 8 BANK 2
0.00 CONC /B 0.0
0.00 ML /MIN 5.00
0.00 PORT. SET 6.1
0.00 VALVE POS 1.2
300.00 CONC /B 100
300.00 PORT. SET 6.0

**Şekil 6.35: Resource Q
Toplama Grafiği**

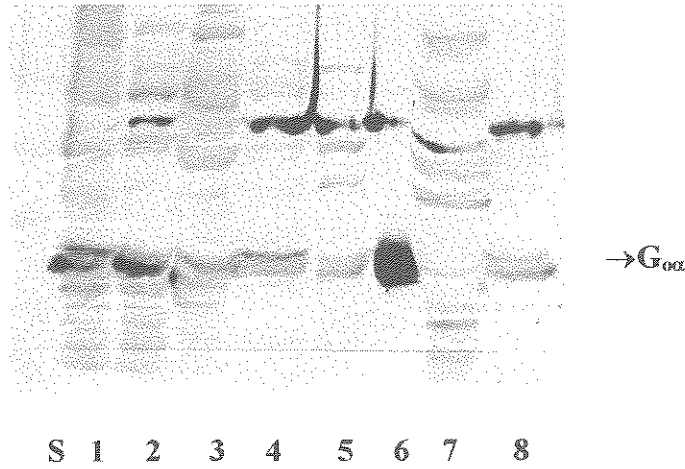
Havuzlar grafikte gösterilen
şekilde oluşturuldu.

Resource Q kolonundan toplanan Havuz 1 gel filtrasyon kolonuna yüklendi. Ancak gel filtrasyonda düzgün bir ayrılma olmadı. Bağlama testi sonuçları (Tablo 6.15) ve Şekil 6.36 ve 6.37, G_{6a} 'nın kolona yüklendiğini ortaya koyduysa da toplama grafiğinde net bir pik saptanmadı (grafik gösterilmemiştir).



Şekil 6.36: Resource Q ve Gel Filtrasyon SDS-PAGE

S. protein standartları (yukarıdan aşağıya): 97 kDa, 64 kDa, 43 kDa, 30 kDa,
1.Resource Q'ya yüklenen, 2.RQH1, 3.RQH2, 4. G_{α} (Calbiochem)
5. Gel filtrasyona yüklenen, 6.GFH



Şekil 6.37: Resource Q ve Gel Filtrasyon Western blot

S. protein standartları (yukarıdan aşağıya): 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa,
1.Lizat, 2.DEAE-1, 3.DEAE-3, 4.Amonyum sülfat üst sıvı, 5.FSH1, 6.FSH2, 7. G_{α}
(Calbiochem), 8.Resource Q'ya yüklenen, 9.RQH1

Havuz 1'deki yüksek bağlama testi sonuçlarının G_{α} 'dan gelip gelmediğini kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE analizinde gözlenen iki güçlü bant (Şekil 6.36, RQH1) ve G_{α} (Calbiochem) ile aynı çizgide bulunan bölge dizi analizine gönderildi. Gözlenen iki güçlü bantın *E.coli* (Succinyl-CoA Sentetaz α ve β zincirleri) proteinleri olduğu anlaşıldı. G_{α} ile aynı bölgede elde edilen sinyalin ise daha önceki amino asit analizinde lizat kesiminde elde edilen sinyal ile, G_{α} 'nın verdiği sinyallerin karışımı olduğu saptandı.

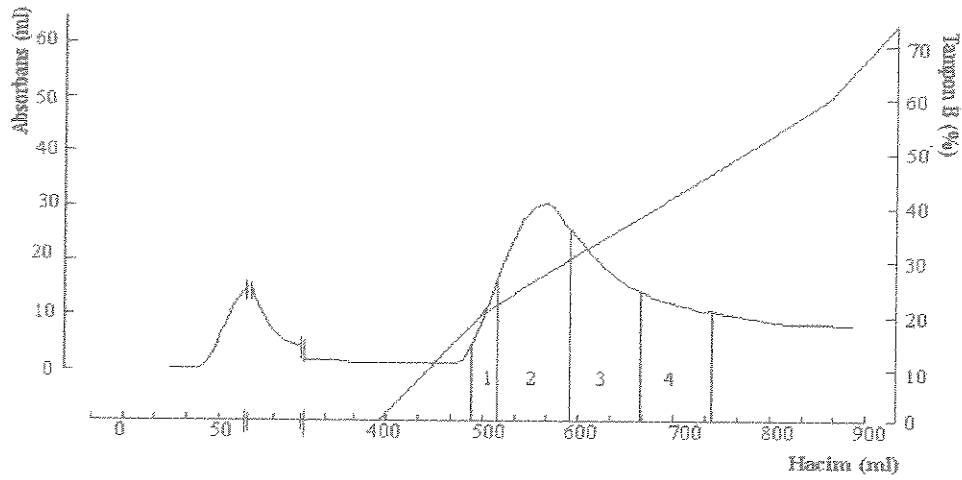
Tablo 6.16 : Çeşitli G_{oa} saflaştırma deneylerinde elde edilen $[^{35}S]GTP\gamma S$ bağlama testi sonuçları

	cpm/ml (x1000)	Hacim (ml)	Toplam cpm (x1000)	OD	Toplam OD	pmol	mg	cpm/mg
DENEY 1								
Lizat	1.040	280	291.312	27,5	7.700	46.461	5,5	37.832
DEAE 3	4.434	200	886.840	14,6	2.920	141.441	16,8	303.712
Havuz	11.746	95	246.994	10,9	191	39.393	4,6	8.079.602
GF Yük	11.444	10	11.444	14,5	145	18.252	2,1	789.275
GF Havuz	7.846	34	89.654	10,8	122	14.299	1,7	2.059.584
RQ Yük	11.595	10	115.950	8,2	82	18.492	2,2	1.414.024
RQ P1	9.210	9	82.890	0,9	8	13.220	1,5	10.233.333
DENEY 2								
Lizat	897	330	296.241	33,6	11.088	47.247	5,6	26.717
D3	5.346	190	1.015.892	10,4	1.976	162.024	19,3	514.115
AS	2.243	250	560.875	9	2.250	89.453	10,6	249.277
Havuz	26.728	121	918.555	2,9	86	146.500	17,4	41.831.282
GF Yük	24.633	10	246.335	9,4	94	39.287	4,6	2.620.585
GF Havuz	18.000	24	232.726	2,6	32	37.117	4,4	13.057.462
RQ Yük	8.093	10	80.932	2	19	12.907	1,5	4.259.578
RQ P1	4.432	6	26.595	1	6	4.241	0,5	4.432.600
DENEY 3								
Lizat	960	290	278.516	23,5	6.815	44.420	5,2	40.868
D3	4.566	190	867.711	8	1.501	138.390	16,4	578.088
AS	2.395	210	503.013	6,4	1.344	80.225	9,5	374.265
Havuz	2.811	140	173.793	2,6	217	27.718	3,3	2.349.542
GF Yük	22.032	20	220.324	9	93	35.139	4,1	6.368.770
Havuz	11.883	46	177.831	3	43	28.362	3,3	11.884.415
RQ Yük	8.669	10	86.697	2,6	26	13.827	1,6	3.259.285
RQ P2	4.042	12	48.504	3	33	7.735	0,9	1.443.571
DENEY 4								
Lizat	1.930	300	579.030	34	10.260	92.349	11,0	56.435
D3	5.255	200	1.051.160	13	2.600	167.649	19,9	404.292
AS	2.900	270	783.000	10	2.700	124.880	14,8	290.000
Havuz	3.450	160	321.972	5	382	51.351	6,1	1.363.865
RQ Yük	18.237	10	182.373	12	127	29.086	3,4	1.436.007
RQ P1	14.154	5	70.772	3	15	11.287	1,3	4.718.133
G_{oa}	83.350	1	83.350			15,3	1,6	52.093.750

6.2.2 T-Proteini'nin (Aminometiltransferaz) Saflaştırılması:

T-proteini'nin saflaştırılmasına yönelik sonuçlar aşağıda verilmiştir. Deneyde 12 litre kültüre karşılık gelen bakteri çökelekleri (66.5 g) kullanılmıştır. Görüleceği gibi $G_{0\alpha}$ için izlenilen yöntemle temel farklılık gel filtrasyon aşamasında seçilen kesimden kaynaklanmaktadır.

Aminometiltransferaz'ın saflaştırılmasında $G_{0\alpha}$ 'nın saflaştırılması sürecinde başlangıç aşamaları olan DEAE-Sefasel ve amonyum sülfat çöktürme basamakları aynı koşullar altında uygulandı. Fenil-Sefaroz kromatografisi de $G_{0\alpha}$ saflaştırılmasında uygulandığı gibi azalan derişimlerde amonyum sülfat (1-0 M), artan derişimlerde gliserol (%0-35) gradyenti kullanılarak gerçekleştirildi. Akış hızı 5 ml/dak., kesim toplayıcısı 4 ml'ye ayarlandı (Şekil 6.38).



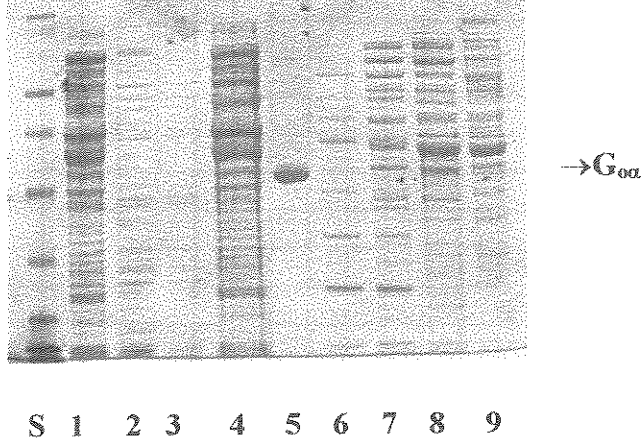
Şekil 6.38: Fenil-Sefaroz

Elüsyon Grafiği

Havuzlar grafikte gösterilen şekilde oluşturuldu.

0.00	CONC	XB	0.0
0.00	ML/MIN	5.00	
0.00	VALUE	POS	1.2
0.00	PORT	SET	6.1
80.00	CONC	XB	20.0
320.00	PORT	SET	20.0
350.00	CONC	XB	80.0
500.00	CONC	XB	100

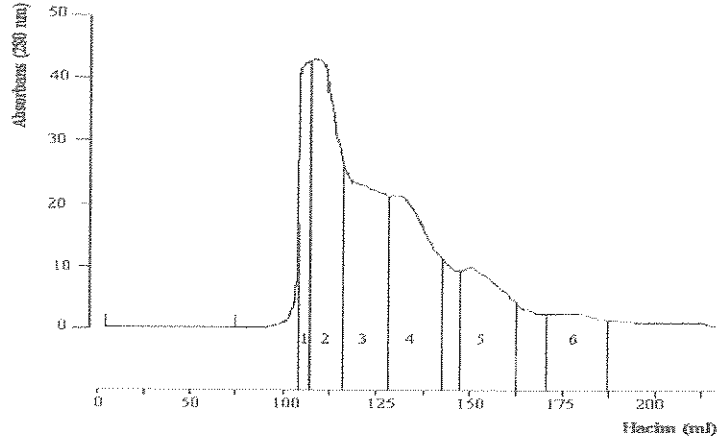
Elektroforetik analiz sonuçlarına göre havuzlar biraraya toplandı (Şekil 6.39). Aminometiltransferazın da 40 kDa molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle standart olarak yine G_{oa} proteini (Calbiochem) kullanıldı.



Şekil 6.39: Fenil-Sefaroz, SDS-PAGE

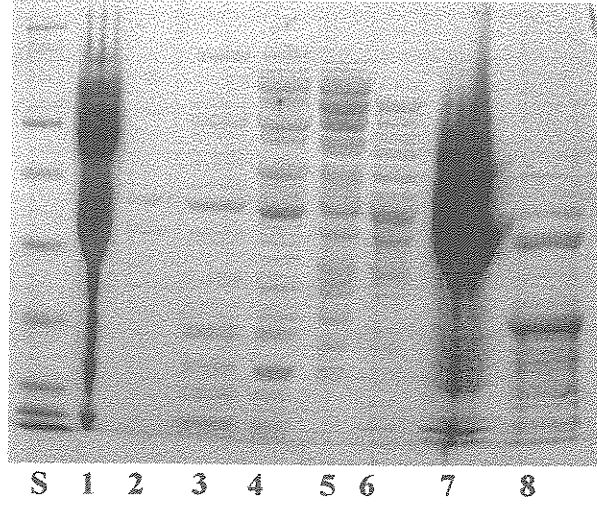
S. protein standartları (yukarıdan aşağıya): 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 16 kDa, 1. Lizat, 2. DEAE-1, 3. DEAE-2, 4. Amonyum sülfat üst sıvı, 5. G_{oa} (Calbiochem), 6. FSH1, 7. FSH2, 8. FSH3, 9. FSH4

Bu kez gradyentin %23 ile %46 arasındaki daha geniş bir bölümü toplanarak gel filtrasyon başlama tamponuna karşı gece boyu diyaliz edildi. Daha sonra toplam hacim 10 ml olacak şekil de yoğunlaştırılarak gel filtrasyon kolonuna yüklendi (Şekil 6.40).



**Şekil 6.40 : Gel Filtrasyon
Toplama Grafiği**
Havuzlar grafikte gösterilen şekilde
oluşturulmuştur.

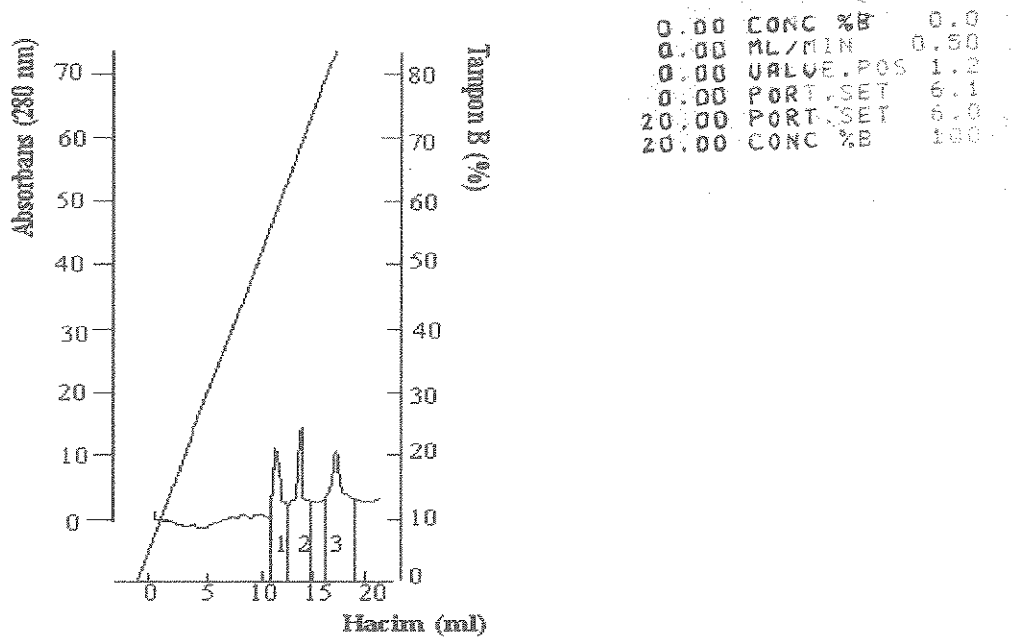
0.00	CONC	2B	0.0
0.00	ML/MIN	2.50	
0.00	VALUE.POS	1.2	
0.00	VALUE.POS	1.2	
100.00	PORT.SET	6.1	
250.00	PORT.SET	6.0	



Şekil 6.41: Gel Filtrasyon, SDS-PAGE

S.protein standartları (yukarıdan aşağıya): 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 1.Gel filtrasyona yüklenen örnek, 2.G_{αα} (Calbiochem), 3.GFH1, 4.GFH2, 5.GFH3, 6.GFH4, 7.GFH5, 8.GFH6

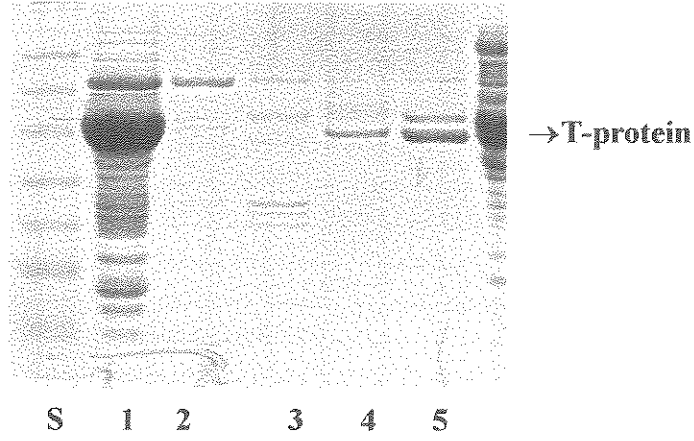
Gel filtrasyon kolonunda akış hızı 2.5 ml/dak.'ya, kesim hacmi 2 ml'ye ayarlandı. 144-164 ml arasındaki kesimler (Şekil 6.40, Havuz 5) biraraya toplanarak 1 ml'ye yoğunlaştırıldı. Absorbans değerinin toplam 4 OD olduğu saptandıktan sonra örnek her seferinde 2 OD gelecek şekilde Mono Q kolonuna yüklendi (Şekil 6.42, 6.43).



Şekil 6.42 : Mono Q Toplama Grafiği.

Havuzlar grafikte gösterilen şekilde oluşturulmuştur.

İki kez yüklenen örneğin her ikisinde de gradyentin %95'ine denk gelen Havuz 3'ün SDS-PAGE analizinde 40 kDa civarında saf ve güçlü bir bant verdiği görüldü .



Şekil 6.43: Mono Q SDS-PAGE

S.protein standartları (yukarıdan aşağıya): 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa, 1.yüklenen örnek, 2.MQH1, 3.MQH2, 4.MQH3, 5.G_{ox} (Calbiochem)

Tablo 6.17 : Deneyde gerçekleştirilen saflaştırma aşamalarına ait kesimlerin toplam hacimleri ve 230,260,280 ve 310 nm'deki absorbands değerleri.

	Hacim (ml)	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₁₀	Toplam OD
Lizat	250	8	35	29	2	7250
DEAE 1	440	8.6	19.5	11.7	3.2	5148
DEAE 2	300	1.1	4.3	3	1.2	900
DEAE 3	190	26.6	19	12.3	1.6	2337
A.S.	240	25.8	14.3	9.7	1.4	2328
FSH 1	24	2	2.3	1.7	1	40.8
FSH 2	52	7.4	6	3.9	1	203
FSH 3	48	7.4	2.45	2.3	1	110
FSH 4	56	7	1.1	1.6	1	90
GF yük	10	26.2	32.8	23.4	0.8	234
GFH1	8	14.6	20.3	9.8	0.04	78
GFH2	8	18	10	5.7	0	45.6
GFH3	12	17	2	2.3	0.05	27.6
GFH4	14	12	1	1.2	0	17
GFH5	20	4.7	0.7	0.2	0	4
GFH6	18	1	0.04	0.0	0	0

6.2.3 T-proteini'nin çözeltideki yapısal parametrelerinin X-ışın küçük açı saçılma yöntemiyle analizi

Saflaştırılan T-proteini'nin yapısal parametrelerinin X-ışın küçük açı saçılma yöntemiyle analizi EMBL'in (Hamburg) DESY'de yerleşik DORIS depolama halkasında bulunan X33 kamerası kullanılarak gerçekleştirildi.

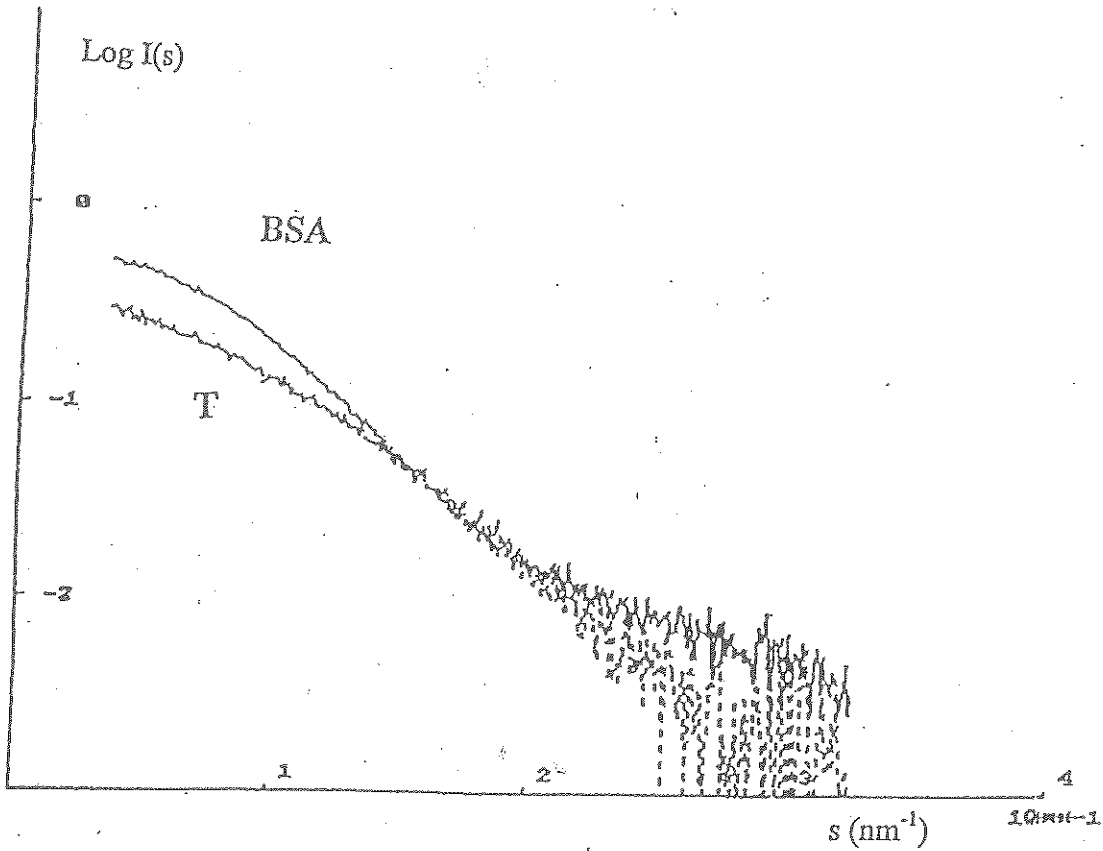
T-proteini ölçümleri 50 mM Tris.HCl, pH:8.0 ve 285 mM NaCl içeren tampon içinde, 5.3 mg/ml derişimde, kontrol olarak kullanılan sığır serum albümin'e (BSA) ait ölçümler ise 50 mM Hepes, pH:7.5 tamponunda ve 10 mg/ml derişimde yapılmıştır. T-protein ve BSA küçük açı saçılma eğrileri Şekil 6.44'te verilmiştir. T-protein eğrisinde büyük s değerlerinde görülen düşük sinyal/gürültü oranı proteinin düşük derişimde olmasından kaynaklanmaktadır.

T-protein ve BSA için saçılma eğrileri (1) ve dağılım fonksiyonu (2) Şekil 6.45 (A) ve (B)'de görülmektedir. Tablo 6.18'de ise girasyon yarıçapları ve sıfır açığa ekstrapole edilmiş saçılma eğrisinden elde edilen ışın şiddeti değerleri $I(0)$ verilmiştir. $I(0)$ değerlerini proteinlerin moleküler ağırlıkları kapsamında değerlendirmek mümkündür. $MW(T\text{-protein}) / MW(BSA) = 0.6$ değerinin $I(0)$ (T-protein) / $I(0)$ (BSA) = 0.5 değeri ile uyumu ölçümlerin uygun koşullar altında gerçekleştiğinin ve T-protein çözeltisinde kümeleşme olmadığının işaretidir. $0.05 < s < 0.4 \text{ nm}^{-1}$ aralığında ölçülen saçılma eğrilerinden hesaplanan girasyon yarıçapları T-protein için 2.58 nm ve BSA için 2.98 nm olup küresel yapılarda sırasıyla 3.32 ve 3.84 nm yarıçap değerlerine karşılık gelmektedir.

Şekil 6.44'te gösterilen T-protein ve BSA dağılım fonksiyonlarını karşılaştırdığımızda T-protein eğrisinin BSA'ya oranla daha asimetric olduğu görülmektedir. Ayrıca T-protein girasyon yarıçapının da BSA'ninkinden çok farklı olmaması bu proteinin çözeltide asimetric bir yapıya sahip bulunduğunu göstermektedir.

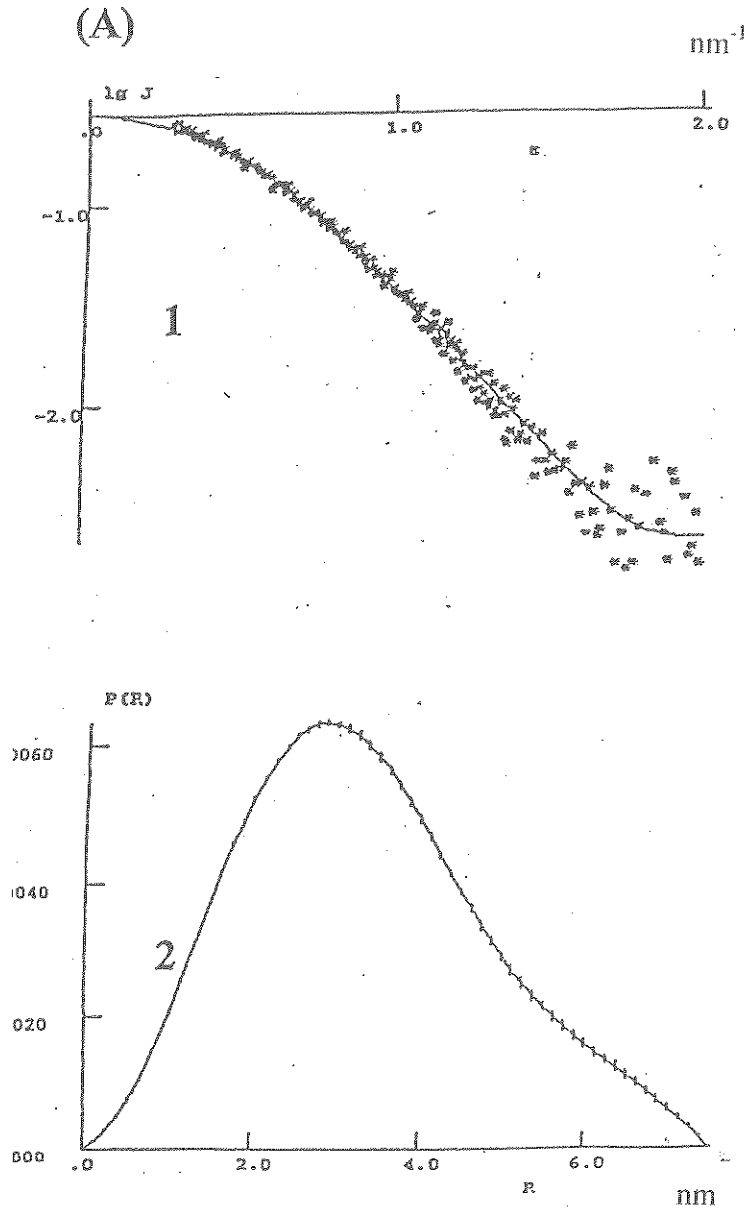
T-proteini'nin şekli hakkında daha ayrıntılı bilgi edinebilmek için deneysel saçılma eğrisi protein veri bankasındaki (PDB) yapısı bilinen ve aynı molekül ağırlığında olan G_{α} (GDP, GTP γ S ve AlF_4 bağlı yapılar), $G_{i\alpha}$ (GDP, GTP γ S ve AlF_4 bağlı yapılar) ve $G_{i\alpha\beta\gamma\delta}$ (50, 35, 62, 11, 45, 70) proteinleri için hesaplanan saçılma eğrileriyle karşılaştırıldı

Deneysel eğri ile $G_{i\alpha}$.GDP. AlF_4 (62) arasında yapılan karşılaştırma iki yapı arasında hiçbir benzerlik göstermedi. Ancak, Şekil 6.46'da görülebileceği gibi $G_{i\alpha\beta\gamma\delta}$ heterotrimerindeki (70) α -altbiriminin yapısı ile deneysel eğri arasında belirgin bir benzerlik saptandı.

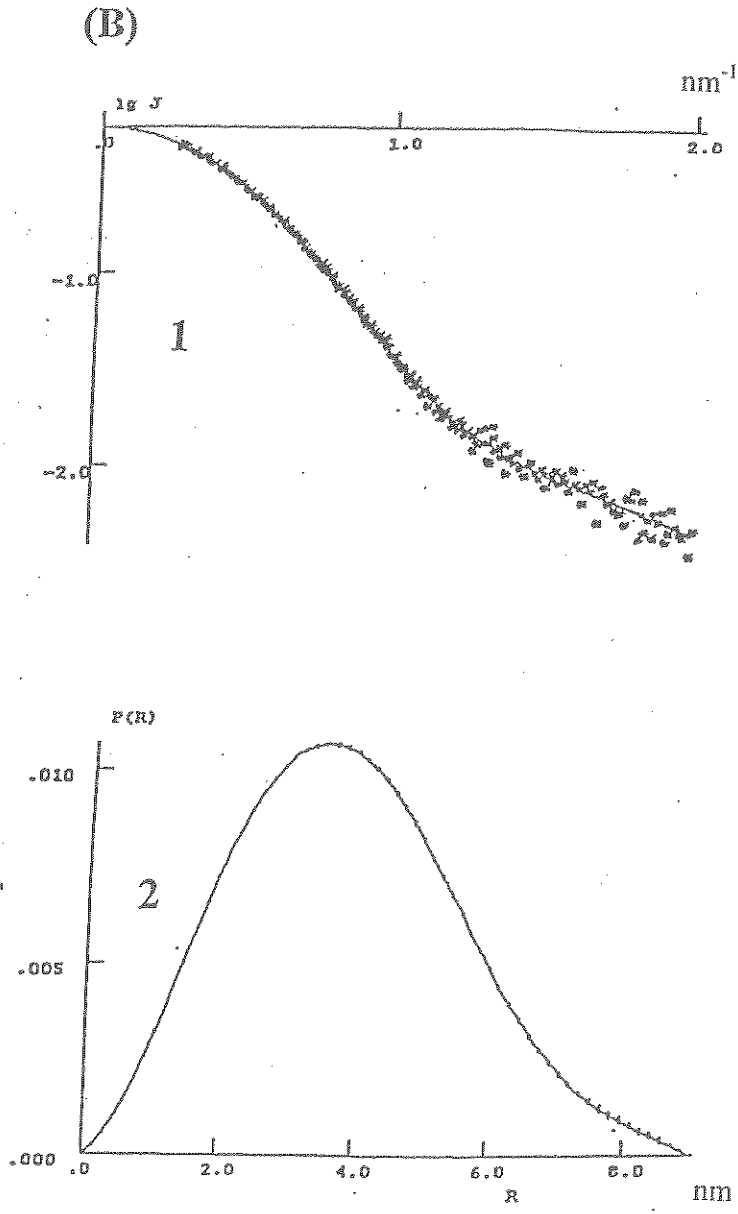


Şekil 6.44: T-proteini (T) ve sığır serum albümin (BSA) için küçük açı saçılma desenleri

Geniş açılarda T-proteininde gözlenen düşük sinyal/gürültü oranı, protein derişiminin düşük olmasından kaynaklanmaktadır.



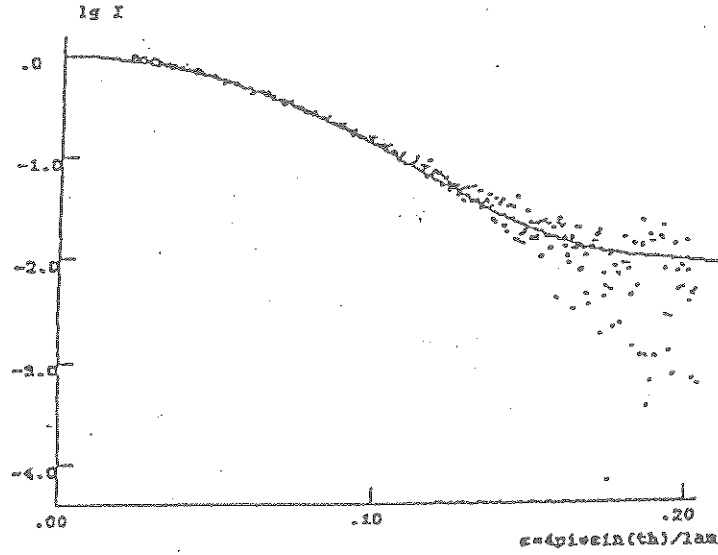
Şekil 6.45 A : T-proteini için saçılma eğrisi (1) ve dağılım fonksiyonu (2)



Şekil 6.45 B : BSA için saçılma eğrisi (1) ve dağılım fonksiyonu (2)

Tablo 6.18: T-protein ve BSA'ya ait girasyon yarıçapları ve saçılma şiddet değerlerinin karşılaştırılması

	Rg (nm)	I (0)
T-Protein (MW: 40 kDa)	2.58	0.297
BSA (MW: 66.2 kDa)	2.98	0.596



Şekil 6.46: T-proteini (kesik çizgi) ve G_{α} (düz çizgi) için ölçülen X-ışın saçılma desenlerinin karşılaştırılması.

7.TARTIŞMA

7.1 Eritroid Hücre Farklılaşmasında G Proteinlerinin Rolü

G-proteinleri GTP bağlayan küçük ras ve rho proteinlerine ek olarak protein sentezindeki bazı faktörleri de içeren GTPaz'lar ailesinin üyelerindendir. Salgı hızının kontrolü, kas kasılması ve metabolik işlemler gibi kısa dönemli etkiler ve büyüme ile farklılaşma gibi uzun dönemli etkilerin G proteinleri ile kenetlenen reseptörler tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Son zamanlarda yürütülen bazı çalışmalar G proteinlerinin hücre farklılaşmasında da rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Mullaney ve Milligan nöroblastoma X glioma hibrit hücrelerinde yürüttükleri bir çalışmada hücre içi cAMP derişimini artırarak farklılaşmaya yol açan koşullar altında G_o' in α alt biriminde artış gözlemişlerdir (31). Bir başka çalışmada boğmaca toksininin BC3H1 kas hücrelerinde büyümeyi durdurarak farklılaşmayı uyardığı gösterilmiştir. Bu araştırmacılara göre, boğmaca toksini bu hücrelerin zarında bulunan ve büyüme faktörlerine özgün reseptörlerden gelen sinyalleri hücre içine aktaran G proteinini ADP ribozillemektedir. HL-60 ve U392 monositlerinde farklılaşmaya koşut olarak arttığı gözlemlenmiştir (48,51). 3T3-L1 fibroblast hücrelerinin lipolitik maddelerle (DEX-IBMX) yağ hücrelerine farklılaşması esnasında G_{sa} , G_{ia} ve G_{oa} miktarlarının değiştiği saptanmıştır (19).

K562 hücreleri Lozzio ve Lozzio tarafından bir kronik miyeloid lösemik hastanın terminal blastik kriz döneminde elde edilen hücrelerden geliştirilmiştir (4). K562 hücreleri pregranülositik fazda bulunan insan eritroid hücre soyudur. Normal eritroid öncü hücrelerin uzun süre kültürde tutulması ve farklılaşmanın kritik aşamalarında senkronize olmuş hücre topluluğunun elde edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle eritroid hücre farklılaşması için uygun bir model olan K562 hücreleri seçilmiştir. K562 hücreleri hemin ile farklılaşmaya yönlendirilerek hemoglobin sentezi yaptıkları bilinmekte ve bu hücrelerin hemoglobin sentez miktarı, benzidin ile boyanma kapasiteleri olan benzidin pozitif oranı ile tanımlanmaktadır. K562 hücrelerinin hemin ile beş günlük indüksiyonundan sonra benzidin pozitif oranı % 65-70 arasındabulundu.

Kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden çeşitli hücre alt kesimleri elde edildi ve bu kesimler G proteinlerinin α ve $\beta\gamma$ alt birimlerine özgün antikorlarla etkileştirildi. Ham zar kesimlerinde G proteinlerinin zenginleştiği belirlendi.

G proteinlerinin GTP' in hidrolizlenmeyen analogu olan [35 S]GTP γ S 'i yüksek afinite ile bilinmektedir. Bu nedenle K ve F K562 hücrelerinin ham zar kesimlerinde GTP γ S bağlanma etkinlikleri incelendi. K562 hücrelerinden hazırlanan zar kesimlerinde GTP bağlanma tepkimesinin zamana bağımlılığı incelendi ve GTP bağlanma etkinliğinin her iki grup için yaklaşık 40 dakikada doyuma ulaştığı belirlendi (Şekil 6.3). Guanin nükleotit bağlanma etkinliğinin protein miktarına bağımlı olduğu saptandı. Tepkimenin ligand konsantrasyonuna (GTP γ S) bağımlılığı incelendiğinde kontrol grubu için bağlanma afinitesi (K_d) 3.5 μ M, B_{max} değeri 73.4×10^3 fmol/mg protein, farklılaşmış grup için ise K_d 2.2, μ M, B_{max} değeri 104.1×10^3 fmol/mg protein olarak belirlendi (Şekil 6.5). GTP' nin GTP γ S bağlanma tepkimesini özgün olarak baskıladığı, 10^{-7} M GTP ile elde edilen bağlanma miktarının 10^{-3} M GTP ile tamamen engellendiği gözlemlendi (Şekil 6.4).

K562 hücre farklılaşması sürecinde G protein ekspresyonunda olası bir değişikliği saptamak üzere, hücre zar kesimlerinin G_{ortaka} , $G_{\beta\gamma}$, $G_{\alpha a}$, G_{i12a} , G_{sa} , G_{qa} , ve G_{16a} , 'ya özgün antikorlarla immün-tepkimesi incelendi.

G protein α alt birimlerinin tümünü tanıyan antikor ile pozitif kontrol olarak kullanılan beyin zar kesiminde elde edilen kuvvetli etkileşim bölgesine K562 hücrelerinde karşılık gelen sinyalin K grubunda, F grubuna göre çok daha kuvvetli olduğu gözlemlendi (Şekil 6.6., 6.7.). Filtrenin dansitometrik değerlendirilmesi ile K grubundaki sinyalin F grubuna göre yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu saptandı, ancak bu antikorla 67 kDa civarında bağışık tepkime gösteren bir başka proteinde de benzer bir fark olduğu göze çarptı. K ve F grubu ham kesimlerinde $G_{\beta\gamma}$ alt birim miktarları açısından önemli bir fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 6.8.).

Beyin zar proteinlerinin % 1-2' ini oluşturan $G_{\alpha a}$ proteinine özgün antikor ile sıçan beyin zar kesimi ile immün-etkileşim saptanmasına karşın, K562 hücrelerinde bir etkileşim gerçekleşmedi (Şekil 6.9, 6.10, 6.11, 6.12, 6.13.). $G_{\alpha a}$ proteininin, K562 hücrelerinde bulunmadığı ya da ekspresyonunun Western-blot analiziyle saptanamayacak kadar düşük düzeyde gerçekleştiği sonucuna varıldı. Bu bulgu

eritroid öncül hücrelerinde G_{α} 'nın bulunmadığını ileri süren çalışmalarla aynı doğrultudadır (71,24).

G_{sa} ekspresyonunu farklılaşma sürecinde incelemek amacıyla, hücrelerden farklılaşmaya indüklendikten sonra ikinci günden başlayarak altıncı güne kadar elde edilen ham zar kesimleri G_{sa} 'ya özgün antikörle etkileştirildi ve farklılaşmış hücrelerdeki G_{sa} miktarının kontrollere kıyasla beşinci günde % 50, altıncı günde % 20 oranında arttığı belirlendi ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan sıçan beyin zarında G_{sa} 'nın uzun (L) formu kısa (S) formuna göre daha fazla miktarda iken K562 hücrelerinde kısa formun daha fazla miktarda olduğu gözlemlendi (Şekil 6.14). G_{sa} ekspresyonu RNA düzeyinde de incelendi. Kontrol grupta G_{sa} mRNA' sına özgün etkileşime rağmen, F grubunda bu etkileşim gözlenmedi. Ancak, Northern-blot analizinde membranlara yüklenen örneklerdeki RNA miktarlarının saptanması amacıyla yapılan 28S rRNA probu ile hibritleme işlemi sonucu, 28S rRNA'ya özgün sinyalde de aynı doğrultuda bir fark saptandı. Bu nedenle K ve F örneklerinde G_{sa} mRNA' sı düzeylerindeki farkın gele yüklenen toplan RNA miktarlarındaki farktan kaynaklandığı sonucuna varıldı. G_{sa-L} 'e ait sinyalin, Western-blot analizinde olduğu gibi G_{sa-S} 'e göre daha zayıf olması, K562 hücrelerinde G_{sa} 'nın kısa formunun daha yüksek düzeyde ekspres edildiğini doğruladı (Şekil 6.14). Bu sonuçlar Tenailleau ve arkadaşlarının G_{i2a} gibi G_{sa} 'nın tüm eritroid hücrelerde ekspres edildiğini ancak α_s 'in uzun formunun ekspresyonunun eritrositlerde daha zayıf olduğunu gösteren çalışma (67) ile uyum içindedir.

G_{sa} adenilat siklazı uyarıcı rolü ile tanımlanan G proteinidir. G_{sa} 'nın farklılaşmayı 3T3-1 fibroblast hücrelerinde baskıladığı (20), F9 teratokarsinoma hücrelerinde ise uyardığı (17) gösterilmiştir. Meißner ve arkadaşları her ne kadar retinoik asit ile indüklenmiş insan miyeloblastik lösemi (HL-60) hücrelerinde G_{sa} düzeylerinde bir azalma saptamışlarsa da, Tenailleau ve arkadaşları $CD34^+$ hücrelerinin granülomonositik ve eritroid farklılaşması sürecinde hem G_{sa} hem de G_{i2a} düzeylerinin arttığını göstermişlerdir.

3T3 fibroblast hücrelerinde farklılaşmayı uyarıcı, F9 teratokarsinoma hücrelerinde ise baskılayıcı rol oynayan $G_{i\alpha}$ protein ailesinin üyeleri PTX ile ADP-ribozillenir ve $G_{i\alpha}$ proteini reseptörü ile kenetlenemez. İnsan ve fare fetal karaciğer eritroid öncül hücrelerinde PTX' in $G_{i\alpha}$ alt birimini ADP ribozillemesi ile

eritropoietin' e bağımlı koloni oluşumunun engellenmesi (13), G proteinlerinin eritropoiez ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bir başka çalışmada insan eritroid öncül hücrelerinde kalsiyum kanallarının eritropoietine bağımlı olarak düzenlenmesinde $G_{i2\alpha}$ 'nın gerekli olduğu gösterilmiştir (44). Eritropoietine duyarlı fare eritrolösemi (RED-1) hücrelerinde, terminal farklılaşmanın $G_{i3\alpha}$ 'nın kaybı ve $G_{i2\alpha}$ 'nın sitozolik formunda artış ile ilişkili olduğu (32), premyelotik bir hücre soyu olan HL-60 hücrelerinin nötrofillere farklılaşması esnasında $G_{i2\alpha}$ 'da insan megakaryoblastik lösemi hücresi MEG-01' in farklılaşmasında ise $G_{i2\alpha}$ ve $G_{i3\alpha}$ miktarlarında artış olduğu gözlenmiştir (32). Bu çalışmada K562 hücrelerinde $G_{i1\alpha}$ ekspresyonu belirlenmemiş $G_{i2\alpha}$ düzeylerinin farklılaşma ile % 12 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Adipogenezin düzenlenmesinde rolü gösterilen ve fosfolipaz C efektörüne kenetlenen $G_{q/11\alpha}$ proteini düzeylerinin eritroid farklılaşmasında değişmediği düşünülmektedir (67). Bu çalışmada K562 hücrelerinde farklılaşmaya koşut olarak $G_{q/11\alpha}$ düzeylerinin % 22 oranında arttığı belirlendi.

Sinyal iletim yollarına aracılık eden, G proteinleri hematopoietik hücrelerin bir çok uyarana yanıtını belirlemektedir. Hematopoietik hücrelerde G_{sa} , $G_{i2\alpha}$, $G_{q/11\alpha}$ gibi bir çok farklı G proteininin bulunduğu bilinmektedir; ancak, yalnızca hematopoietik hücrelerde bulunduğu gösterilen $G_{16\alpha}$ proteininin, hematopoietik hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli bir rol oynama olasılığı vardır. HL-60 hücrelerinde dimetilsülfoksit ile indüklenen terminal farklılaşmanın $G_{i2\alpha}$ alt biriminin ekspresyonunda artış ve $G_{16\alpha}$ ekspresyonunda azalma ile paralel seyrettiği gösterilmiştir (2). Tenailleau ve arkadaşlarının araştırmalarında da $G_{16\alpha}$ 'nın 46 kDa'lık formunun eritroid öncül hücrelerinde ve trombositlerde yüksek miktarda bulunduğu, ancak eritroid olgunlaşma sürecinde azaldığı gösterilmiştir (67). Aynı şekilde $G_{i2\alpha}$ proteini de eritropoiezde geçici olarak ekspres edilmektedir: $CD34^+$ hücrelerinde ekspresyonu gözlenmezken, eritroblastlarda ortaya çıkmakta ancak eritrositlerde bulunmamaktadır.

Amatruda ve arkadaşları K562 hücrelerinde $G_{16\alpha}$ mRNA' sının ekspres edilmediğini göstermişlerdir (2). Bu çalışmada K562 hücre zar kesimlerinde $G_{16\alpha}$ proteinine karşı geliştirilen AS 339 antikoru ile etkileşim saptanamamıştır. Ancak bu

deney için uygun pozitif kontrolün bulunmaması K562 hücrelerinde G_{16a} proteininin yokluğuna dair kesin bir sonuca varılmasını olası kılmamıştır.

Büyüme, farklılaşma ve gelişme süreçlerinde kritik rollerine karşın, G proteinlerinin bu olaylarda hangi mekanizmalarla etkin oldukları, ekspresyonlarının ne şekilde düzenlendiği, hangi efektörleri kullandıkları tamamen anlaşılamamıştır. G proteinlerinin gelişme üzerindeki bazı etkilerinin bilinen efektörler aracılığıyla gerçekleştirdiği açıktır: örneğin, cAMP' nin morfojen olarak etki ettiği hücrelerde G_{12a} ve G_{sa} ' nin proto-onkogen oldukları bilinmektedir (69). F9 teratokarsinoma hücrelerinde G_{12a} , fosfolipaz C' yi baskılamakta, G_{12a} düzeyinin morfojene yanıt olarak azalması sonucu ise fosfolipaz C' nin üzerindeki inhibisyon ortadan kalkmakta, sonuç olarak kalsiyum mobilizasyonundan sorumlu inositol fosfatlar ve protein kinaz C ve MAP kinazları uyaran diasilgliserol sentezlenmektedir. G proteinleri için diğer efektörler hakkında bilgi daha azdır. G_{sa} tarafından düzenlendiği gösterilen adipogenez örneğinde adenilat siklazdan başka efektör ya da efektörlerin G_{12a}/G_{sa} proteinleriyle düzenlenme olasılığı vardır. Şu anda spekülatif olmakla birlikte G proteinlerine duyarlı ve G proteinlerini mitogenez, farklılaşma belki de apoptosis ile ilgili efektörlere kenetleyen tirozin kinazların bulunma olasılığı tartışılmaktadır. 3T3-L1 hücrelerinin adipositlere farklılaşmaları sürecinde G_{12a}/G_{sa} düzeylerindeki değişimlerle birlikte, fosfotirozin miktarlarında farklar gözlenmiş, ancak cAMP düzeylerinde herhangi bir artış ya da azalma saptanmamıştır (40). MAP kinazların G proteinleriyle uyarılmasında birçok non-reseptör tirozin kinazın şart olduğunu gösteren çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir (40). Bu çalışmalar yalnızca bazı hücre soylarında yapıldığı için bütün hücreleri örneklemese de eğer bu hipotez doğrulanırsa, hücre iletim sistemlerinde G proteinleriyle tirozin kinazlar arasındaki etkileşimin yer aldığı yeni bir mekanizmaya ışık tutulacaktır.

Hem eritroid hem de megakaryositik soya özgün farklılaşma markerlerini içeren HEL hücrelerinde özgün PKC inhibitörü GF109203X' in megakaryositik farklılaşmayı baskılayarak eritroid farklılaşmayı indüklemesi (26) bu hücrelerde eritroid farklılaşmayı baskılayan bazal PKC etkinliğinin varlığı ile açıklanabilir. K562 hücrelerinde tirozin kinaz inhibitörlerinin eritroid farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir (27,3). PKC uyarısının büyüme ve gelişmeye ilişkin genlerin ekspresyonunda değişimlere yol açan fosforillenme şelalesinin tetiklediği

bilinmektedir. Bu açıdan PKC' nin hematopoietik farklılaşmanın düzenlenmesinde anahtar rolü oynaması olasıdır.

Birçok hücrede olduğu gibi eritroid hücre farklılaşmasında G proteinlerinin rolleri olduğu açıktır. Bu çalışmada da farklılaşmış ve farklılaşmamış K562 hücrelerinde G_{sa} , G_{i2a} ve G_{qa} düzeylerinde farklar saptanmıştır. Bu proteinlerdeki değişimlerin hangi efektörler ve reseptörler aracılığıyla farklılaşma sürecini etkilediklerinin belirlenmesiyle, eritroid hücre farklılaşmasını düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

Eritroid farklılaşmanın düzenlenme mekanizmalarının anlaşılmasının kanser problemi ile de yakından ilişkisi vardır. Bir görüşe göre hücre çoğalmasıyla sonuçlanan onkojenik transformasyon, hücrenin farklılaşmamasından kaynaklanmaktadır. Bu açıdan, farklılaşmadan sorumlu G proteinlerinin kanserli hücrelere transformasyonu ile hücreleri farklılaşmaya yönlendirecek çalışmalar kanser tedavisinde yeni bir seçenek olabilir.

7.2 G_{oa} ve T-Proteinlerinin Saflaştırılması ve T-Proteininin Çözültideki Yapısının İncelenmesi

Hücre sinyal iletiminde aracı rolü olan G-proteinlerinin işleyişleri ilk olarak, hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli işleve sahip GTP-bağlayıcı proteinler olan *Ras* proteinlerinin üç boyutlu yapılarının çözümlenmesi ile aydınlanmaya başlamıştır (55). Enzimlerin katalitik bölgeleri işlevlerini en çok etkileyen bölge olduğundan, heterotrimerik G-proteinlerinin incelenmesinde hem katalitik GTPaz etkinliğine sahip, hem de proteinin işlevsel özgünlüğünü belirleyen α -altbirimi yapı çalışmaları temel oluşturmuşlardır. Bugüne dek çeşitli α -altbirimlerinin aktif olan ve olmayan formları ve G_i proteininin heterotrimerik yapısı çözümlenmiştir (50,35,62,11,45,70). Merkezi sinir sisteminde en yaygın bulunan G-protein tipi olan G_o üzerine ise henüz yapısal bir çalışma yayınlanmamıştır.

Çalışmanın bu bölümünde G_o 'ın sinir sistemindeki öncelikli rolünün dayandığı yapısal farklılıkların araştırılması hedeflenerek G_{oa} proteininin ekspresyon ve saflaştırma çalışmaları yapıldığı gibi, G_{oa} ile birlikte saflaşan ve *E.coli* glisin-parçalama sistemi enzimlerinden biri olan T-proteininin de küçük açılış yöntemiyle yapı analizi gerçekleştirildi.

Klonlanmış ökaryotik genlerin *E.coli*'de ekspresyonu birbirine benzer diziye sahip proteinlerin kolaylıkla birbirinden ayrılabilmesi ve yüksek miktarda protein eldesini olanaklı kılması nedeniyle son yıllarda tercih edilen bir yöntem olmuştur. *E.coli*'de ekspres edilen rekombinant G-proteinlerinin memeli kaynaklarından elde edilen proteinlere eş olmamakla birlikte benzer oldukları saptanmıştır. Saptanan farklılıkların ise normalde *E.coli* tarafından gerçekleştirilmeyen miristoillenme, palmitoillenme gibi translasyon sonrası kovalent değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (37).

Rekombinant G-protein ekspresyonunda kullanılan ilk sistemlerden biri *E.coli* K38 soyuna aktarılmış NpT7-5 plazmidine G_{sa} geni takılarak oluşturulmuştur. Bu sistemde ekspres edilen G_{sa} 'nın 45 ve 52 kDa'luk her iki formunun da ADP-ribozillenme ve adenilat siklaz aktivasyonlarının aynı derecede olduğu saptanmış, ancak saflaştırılmış tavşan karaciğer G_s 'i ile karşılaştırıldığında, ekspres edilen proteinin yalnızca %1-2'sinin aktif olduğu görülmüştür. Isı artışıyla indüklenen bu sistemde ekspresyon seviyesi oldukça düşük olduğundan, yapı çalışmaları gibi çok miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim gösteren alanların ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla farklı ekspresyon sistemleri araştırılmıştır (38). 1994 yılında Lee ve ark. BL21(DE3) hücrelerine aktarılmış pQE-6 ekspresyon vektörünü kullanarak G_{ia} , G_{oa} ve G_{sa} ekspresyonunu biraz daha arttırmayı başarmışlardır. Ancak ekspresyon düzeyi hala büyük ölçekli kültürleri gerektirdiğinden son yıllarda Baculovirus ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Konakçı olarak Sf9 böcek yumurtalık hücrelerinden yararlanılan bu sistem yüksek ekspresyon düzeyi ve translasyon sonrası değişimlerin gerçekleştirilebilmesi açısından avantajlıdır. Burada kullanılıp sentezlenecek proteine ait cDNA, virüs promotorunun ardına yerleştirilir. Baculovirus sisteminde sentezlenen rekombinant proteinlerin işlevsel aktivitelerinin dokudan saflaştırılmış proteinlere çok yakın olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada ekspresyon sistemi olarak pET-3a vektörünün T7 promotoru ve gen 10 bağlama bölgesinin eklendiği pGEM-3 (Promega) türevi pT7/Nde1/ G_{oa} plazmidini ile BL21(DE3) hücreleri kullanıldı. Ekspresyon deneyleri, sistemi sağlayan

Dr.Joel Moss'un önerdiği kaynağa (25) dayanarak, 0.4 mM IPTG ile başlatılıp, daha sonra 0.2, 0.5 ve 1 mM gibi farklı IPTG derişimleri ile tekrarlandı. Yukarıda sözü edilen kaynaklara benzer olarak aktif G_{α} protein ekspresyonu gerçekleştirildiyse de, ekspresyonu IPTG ile kontrol ederek bu proteinin *E.coli* proteinlerine görece oranını arttırmak mümkün olmadı. Lee ve ark. rekombinant G_{α} proteinlerindeki düşük verimi ekspresyon düzeyinden çok, protein çözünürlüğünün azlığına ve yanlış katlanmaya bağlamaktadırlar. Bu sorunun uzun süreli, ancak düşük derişimli IPTG ile indüklenme yoluyla giderilebileceğini önermişler ve zenginleştirilmiş besi ortamında büyütülen kültürleri 30 μ M IPTG ile 12 saat süreyle indüklemişlerdir. Buna dayanarak 50 ve 100 μ M gibi daha düşük IPTG derişimlerinde uzun süreli indüklemenin etkileri araştırıldı. Ancak bu yöntemi uygulayarak gerçekleştirilen deneylerden de olumlu sonuç alınmadı .

Artalan ekspresyonunu düşürmek ve ekspresyonu arttırabilmek amacıyla deneyler %0.4 mM glükoz ve zenginleştirilmiş LB besi ortamlarıyla tekrarlandı. Bu deneylere ait SDS-PAGE ve Western blot analizinde genel protein ekspresyonu düzeyinde artış saptandıysa da IPTG'ye bağımlı bir değışim gözlenmedi .Artalan ekspresyonunu kontrol edebilmek amacıyla pT7/Nde1/ G_{α} plazmidini BL21(DE3)pLysS ve BL21(DE3)pLysE hücrelerine aktarıldı. Bu hücrelerle yapılan deneylerde de BL21(DE3)pLysS hücrelerinde hiçbir değışim gözlenmezken, BL21(DE3)pLysE hücre soyunda ekspresyon düzeyinde artış görüldü. Ancak G_{α} ekspresyonunun genel ekspresyon seviyesine görece oranında bir değışim saptanmadı.

Yukarıda anlatılan sonuçlarda görüldüğü gibi pT7/Nde1/ G_{α} plazmidini kullanarak G_{α} proteininin ekspresyonunu indüklemek ve bu proteininin diğeri *E.coli* proteinlerine görece oranını arttırmak mümkün olmadı. Ancak GTPyS bağlama ve Western blot analizi sonuçları hücrelerde Justice ve ark. ile Hong ve ark.'nın (25,30) sonuçlarına uygun olarak saptanabilir miktarda G_{α} proteininin sentezlendiğini ortaya koydu. Bu durumda izlenebilecek iki yoldan birisi farklı ekspresyon sistemlerini deneyerek ekspresyonu arttırmak, bir diğeri ise varolan ekspresyon sistemini kullanarak saflaştırma aşamasına geçmektir. Farklı ekspresyon sistemlerinin denenmesi uzun zaman ve değışik tekniklerin uygulanmasını gerektiren bir yol olduğundan ve bu çalışmanın ileriya dönük amacı saflaştırma ve yapıanalizi

tekniklerinin geliştirilmesi olduğundan öncelikle varolan ekspresyon sistemiyle saflaştırma işlemlerinin denenmesine karar verildi.

Saflaştırma deneylerinde BL21(DE3) hücreleri kullanıldı ve hazırlanan kültürler $A_{600} = 0.6$ değerine ulaştıktan iki saat sonra hücreler toplanarak parçalandı ve yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde saflaştırma aşamalarının uygulanmasına geçildi.

Saflaştırma işlemlerinde ilk olarak Lee ve ark.'na ait kaynağa (37) dayanarak DEAE-Sefasel beç kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürme aşamaları sonrası Fenil-Sefaroz - Q-Sefaroz - Hidroksiapatit kromatografi basamakları izlendi. Söz konusu kaynakta, Fenil-Sefaroz aşamasının toplama grafiğinde genelde belirgin pikler görülmemekle beraber, GTP γ S bağlama aktivitesinin, gradyentin 0.6-0.9 M amonyum sülfat derişimine denk gelen bölgesinde yüksek olduğu saptanmıştır. Q-Sefaroz aşamasında ise hem 280 nm'deki absorbans ölçümleri, hem de GTP γ S bağlama testi sonuçları 125-190 mM NaCl civarında belirgin bir pik vermiş, ayrıca bu aşamaya ait SDS-PAGE analizinde safsızlıkların büyük ölçüde temizlendiği gözlenmiştir.

Yapılan G_{oa} saflaştırma deneylerinde Fenil-Sefaroz aşamasının sonuçları Lee ve ark. ile uyumluysa da, elde edilen Q-Sefaroz toplama grafiği genelde farklılık gösterdi. SDS-PAGE analizleri Fenil-Sefaroz aşamasına göre artan bir ayırım ortaya koymadığı gibi yüksek molekül ağırlıklarındaki protein bantlarının zenginleştiği saptandı. Sonuçta SDS-PAGE analizlerine dayanarak Q-Sefaroz'dan gradyentin 250 mM NaCl derişimi civarında alınan kesimler toplanarak oluşturulan havuz bir sonraki kolona (hidroksiapatit) yüklendi.

Tekrarlanan deneylerde ayırım gücünü arttırabilmek için Fenil-Sefaroz gradyentinin uygulama hızı değiştirildi, Q-Sefaroz toplama tamponunun NaCl derişimi arttırıldı ve son aşamada 1 ml'lik Econo-Pac Ceramic Hydroxyapatite, Type II (Bio-Rad) kullanıldı. Ancak bu kolon da ayırımda etkili olmadı ve SDS-PAGE analizi sonuçları yüklenen örnekle toplanan kesimlerin aynı protein bantlarına sahip olduğunu gösterdi.

Lizat ve hidroksiapatit kesimlerinin referans olarak kullanılan saflaştırılmış G_{oa} (Calbiochem) ile aynı çizgide bulunan bölgeleri, ve lizatta G_{oa} antikoruyla etkileşen bazı bantlar kesilerek amino asit dizi analizine yollandı. EMBL (Heidelberg)'de

gerçekleştirilen amino asit dizi analizi sonuçları lizatta G_{oa} çizgisinde yaklaşık aynı şiddette iki protein dizisi belirlendi:

1) GXTLSAEEXA

2) MKIFVFGNK.

Bu dizilerden birincisi G_{oa} 'nın amino ucundaki 10 amino aside karşılık gelmektedir. İkinci diziden bilinen bir protein sinyali alınmadıysa da antikorla etkileşen diğer proteinlerin *E.coli* proteinleri olduğu anlaşıldı. Hidroksiapatit'ten toplanan ve çok düşük sinyal veren kesimlerde de G_{oa} dizisi saptandı.

Q-Sefaroz kolonunda belirgin bir ayrışma görülmemesi nedeni ile, daha yüksek kapasiteli, ancak düşük çözünürlüklü Q-Sefaroz kolonu yerine, düşük hacimli (1 ml), ama yüksek çözünürlüklü Mono Q kolonunun analitik amaçla denenmesine karar verildi. Ayrıca yüksek molekül ağırlıklarında gözlenen protein bantlarının fazlalığı nedeniyle Fenil-Sefaroz ve Mono Q aşamaları arasına gel filtrasyon kolonu eklendi.

Fenil-Sefaroz kolonundan 0.2-0.5 M amonyum sülfat derişiminde ayrılan kesim gel filtrasyon kolonuna, gel filtrasyondan 145-265 ml'ler arasında toplanan kesim ise Mono Q kolonuna yüklendi. Mono Q kolonunda üç belirgin pik elde edildi. Bu piklerden gradyentin 270 mM NaCl derişiminde çıkan somuncusu Coomassie mavisi boyamada G_{oa} ile aynı yerde güçlü bir bant verdi (Şekil 6.43). Amino asit dizi analizi sonuçları bu proteininin *E.coli* glisin parçalama sisteminde yer alan dört enzimden biri olan T-proteini (aminometiltransferaz) olduğunu ortaya koydu.

G_{oa} 'nın saflaştırılmasına yönelik ikinci grup deneylerde Fenil Sefaroz – Gel Filtrasyon – Resource Q – Hidroksiapatit (Deney 1) ; Fenil-Sefaroz – Resource Q-Gel Filtrasyon (Deney 2) gibi farklı aşamalar izlendi. Mono Q kolonu daha yüksek kapasiteli olması nedeniyle Resource Q kolonu ile değiştirildi. Saflaştırmanın değişik aşamaları Coomassie mavisi boyama ve Western blot analizi sonuçlarıyla değerlendirildi.

Bu deney gruplarında Fenil-Sefaroz'da uygulanan gradyentin 0.4-0.6 M amonyum sülfat derişimine denk gelen bölümleri toplanarak gel filtrasyon kolonuna yüklendi ve G_{oa} 'nın toplama tamponunun 100-130 ml'leri arasında kolondan çıktığı görüldü. Kalibrasyon eğrisine göre bu bölge 67-158 kDa molekül ağırlığındaki

proteinlerin çıktığı bölge olduğundan G_{oa} 'nın kümelenme oluşturduğu görüldü. Bu kolondan da çok iyi bir ayırım elde edilememekle birlikte pikler özellikle GTP γ S bağlama testinin sonuçlarına göre biraraya getirilerek Resource Q kolonuna yüklendi ve buradan GTP γ S bağlama değerinin oldukça yüksek olduğu tek bir pik elde edildi. Elektroforetik analizde ise 40 kDa'nun üzerinde ve altında oldukça kuvvetli iki bant görülürken bu bölgede hiçbir proteine rastlanmadı (Şekil 6.31). Western blot analizleri ise tutarlı sonuç vermedi.

Rekombinant protein miktarının çok düşük olduğu göz önünde tutularak Fenil-Sefaroz aşamasından sonra doğrudan Resource Q kolonuna geçilmesi düşünüldü. Bu yöntemle Resource Q kolonundan sonra bağlama testi sonuçlarının yüksek değere ulaştığı düzgün bir pik elde edildi ve bu pike ait SDS-PAGE analizi G_{oa} 'nın beklendiği yerde oldukça düşük bir sinyal verdi (Şekil 6.36). Bu pikten toplanan proteinlerin gel filtrasyon kolonuna yüklenmesinden olumlu sonuç alınmadı. Resource Q aşaması sonrası toplanan kesimdeki proteinler elektroforetik analizden sonra PVDF membranına aktarıldı ve amino asit dizi analizine gönderildi. Analiz sonucunda, daha önce lizattan elde edilen sonuçlara benzer şekilde, bir tanesi G_{oa} 'ya ait olan iki proteinin sinyalleri birbirine karışmış olarak saptandı. Bir önceki yöntemde olduğu gibi burada da görülen iki kuvvetli bantın *E. coli* proteinleri olduğu saptandı.

Her iki yöntemle toplanan tam saf olmayan örnekler birleştirilerek iki tip hidroksiapatit kolonunda (Ceramic Hydroxyapatite Type II ve Bio-Gel HTP, Bio-Rad) ayırım denendi. Bu deneylerde değişik pH şartları kullanılarak proteinin kolona bağlanmasının ve ayırımın düzeltilmesine çalışıldı, fakat sonuçlar öncekilere göre farklı olmadı.

Yukarıda verilen sonuçlar G_{oa} analiz ve tanıma yöntemleri ışığı altında yorumlandığında SDS-PAGE analizini izleyen Coomassie mavisi boyama ve Western blot analizi sonuçlarıyla değerlendirilen deneylerin G_{oa} proteini ile birlikte aminometiltransferaz'ın da saflaşmasına yol açtığı görüldü. Bu iki analiz sisteminde karşılaşılan sorunlardan birincisi G_{oa} proteininin Coomassie mavisi boyamada zor görülecek derecede az miktarda olmasıydı. Saflaştırılmış G_{oa} 'yı (Calbiochem) referans alarak toplanan kesimler, bu standartla aynı molekül ağırlığına sahip T-proteininin saflaştırılmasıyla sonuçlandı. Western blot analizlerinde ise G_{oa} 'ya özgü

antikoru (NEN-Dupont) *E.coli*'deki pekçok proteinle özgün denebilecek güçlü etkileşimler göstermesi yanıltıcı sonuçlar verdi. Ancak Western blot analizinde G_{α} 'nın yanında ikinci bir standart olarak kullanılan beyin membran kesimlerinde böyle bir etkileşim görülmedi. Bu sonuçlar antikorun yeteri derecede özgün olmadığını ve *E. coli* proteinlerinin birçoğunun bu antikleşebilecek yapıya sahip bulunduklarını düşündürmektedir.

Bu noktada ticari olarak satılan ve bu çalışmada referans olarak kullanılan miristoillenmiş G_{α} (Calbiochem) hakkında da bilgi vermek yararlı olacaktır. Bu standartın fiyatının çok yüksek olması yapı analizi çalışmalarında kullanılmasını engellemektedir. Ayrıca ileride yapılması planlanan heterotrimer yapı çalışmalarını gerçekleştirebilmek için G-protein saflaştırma işlemlerinin kendi laboratuvar koşullarımızda yapılabilmesi istendiğinden bu standartın yapı analizi için kullanılması düşünülmedi. Bu nedenlerle ticari G_{α} yalnızca standart amacıyla kullanıldı.

G_{α} 'nın beyin dokusundan saflaştırılması daha önce başarıyla uygulanmış bir yöntem olmakla beraber dokudan protein saflaştırmak gerek doku çalışmalarının genel zorluklarından, gerekse aynı sınıftaki birbirine çok benzer G-protein tiplerinin ($G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$, $G_{i\alpha3}$, $G_{o\alpha}$ gibi) birbirlerinden ayrılmasındaki güçlükten dolayı tercih edilmedi.

G_{α} saflaştırma çalışmalarının olumlu olmaması bu çalışmanın hedeflerinden birisi olan X ışını küçük açı saçılması ölçümleri için saflaştırılan T-proteinin kullanılmasına yol açtı. Elektroforetik analizde yeterli ölçüde saflaşmış görünen T-protein çözeltileriyle yapılan deneylerde yapısal parametreler ölçüldü. Analizi yapılan saçılma eğrilerinden $D_{max} = 7.5$ nm ve $R_g = 2.39$ nm olarak hesaplandı. Bu girasyon yarıçapı 3.1 nm yarıçaplı bir küresel yapıya karşı geliyorsa da dağılım eğrisi T-proteinin çözeltideki yapısının asimetrik olduğunu göstermektedir.

T-proteine ait X ışını saçılma eğrisi PDB veribankasındaki $G_{i\alpha}G_{i\alpha}$ kimerası ile oluşturulmuş $G_{i\alpha}G_{i\alpha}\beta_1\gamma_2$ heterotrimerindeki α -altbirimi koordinatlarından hesaplanan teorik saçılma eğrisi ile de karşılaştırıldı (Şekil 6.46). İki proteinin moleküler ağırlıkları hemen hemen aynı olsa da amino asit dizileri çok farklı olduğundan iki saçılma eğrisi arasındaki iyi uyum dikkati çekmektedir. Burada heterotrimerik kompleks içinde olmanın α -altbiriminin yapısı üzerine getirdiği

sınırlamaların rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sonucun kullanılan koordinatların çözünürlük derecesi ve veri analizindeki limitasyonlar ışığında da değerlendirilmesi çalışmaları sürmektedir.

Bu çalışmada sunulan sonuçlara bakarak, kazanılan bilgi ve tecrübeyle, bu konudaki araştırmaların gelecekte izleyebileceği yönler düşünülürse, ilk akla gelen yeni ekspresyon sistemlerinin denenmesi olacaktır. G_{α} 'nın Baculovirus sisteminde ekspres edilmesine rağmen hala yapı çalışmalarının yayınlanmamış olması bu proteinin üzerinde çalışılması zor bir protein olduğunu göstermektedir. Yeni geliştirilen vektörleri (örneğin pQE-6) kullanarak kısa zamanda bir ekspresyon taraması yapmak mümkün olacaktır. Sonuçlar olumlu olduğu takdirde G_{α} ile ilgili yapı çalışmalarına devam edip G_{α} ile aynı zamanda diğer G protein altbirimlerinin ekspresyonunu gerçekleştirmeğe çalışmak ve heterotrimerin yapısını da incelemek mümkün olabilir.

Bu çalışmaların yanısıra T-proteinin yapısı ile ilgili çalışmalar da devam edecektir. X ışını küçük açı saçılma deneylerinin yanısıra kuramsal hesaplarla T-protein ve $G_{\alpha}G_{\beta_1}\gamma_2$ heterotrimerindeki α -altbiriminin yapısı arasındaki benzerliğin kaynağı araştırılacaktır. Ayrıca T-proteinini saflaştırarak kristalize etmeğe çalışmak ve detaylı 3 boyutlu yapısını incelemek mümkün olabilir.

8. SONUÇLAR

8.1 Eritroid Hücre Farklılaşmasında G Proteinlerinin Rolü

- i. Hemin ile farklılaşmaya indüklenen (F) ve hemin ile indüklenmeyen (K) K562 hücrelerinde benzidin pozitif oranları belirlendi. Hücrelerden ham zar kesimleri elde edildi.
- ii. K ve F K562 ham zar kesimlerinde GTP bağlama etkinlikleri incelendi. GTP bağlama tepkimesinin ligand ve protein miktarına bağımlılığı gösterildi. K_d ve B_{max} değerleri saptandı. GTPyS bağlanmasının GTP ile baskılandığı gösterildi.
- iii. K ve F K562 ham zar kesimlerinde G proteinlerine özgün antikorlar ile G protein düzeyleri incelendi. Kontrole göre farklılaşma grubunda $G_{q/11\alpha}$ düzeylerinde %22 oranında artış, $G_{s\alpha}$ düzeylerinde beşinci günde %50, altıncı günde %20 oranında artış, $G_{i2\alpha}$ düzeylerinde %12 oranında azalma belirlendi. Ayrıca K562 hücrelerinde $G_{i1\alpha}$, $G_{o\alpha}$ ekspresyonunun bulunmadığı gözlemlendi ve $G_{16\alpha}$ antikoruna ile etkileşim gerçekleşmedi.
- iv. Hücrelerden RNA elde edildi. Nitroselüloz membrana aktarılan RNA örnekleri $G_{s\alpha}$ genine özgün oligonükleotit probu ile hibritleştirildi. K562 hücrelerinde $G_{s\alpha}$ gen ekspresyonu RNA düzeyinde de gösterildi.
- v. K562 hücrelerinde $G_{s\alpha-L}$ 'nin $G_{s\alpha-S}$ 'den daha az düzeyde ekspres edildiği RNA ve protein düzeyinde gösterildi.

8.2 $G_{o\alpha}$ ve T-Proteinlerinin Saflaştırılması, T-Proteininin Çözeltideki Yapısının İncelenmesi

- i. pT7/Nde1/ $G_{o\alpha}$ plazmidi ve BL21(DE3) hücreleri kullanılarak rekombinant $G_{o\alpha}$ proteinin ekspresyonu gerçekleştirildi. Bu sistemde IPTG kontrolünü gözlemek ve *E. coli* proteinlerine görece rekombinant protein ekspresyonunu arttırmak mümkün olmadı.

Yapısal çalışmaları sınırlı da olsa başlatabilmek amacıyla başkaları denenmeden yukarıdaki ekspresyon sistemi G_{α} saflaştırma çalışmalarında kullanıldı.

ii. Rekombinant G_{α} saflaştırma çalışmalarında çeşitli yöntemler izlendi:

Lee ve ark (37) tarafından yayınlanan kromatografi yöntemi (Fenil-Sefaroz - Q-Sefaroz - Hidroksiapaptit) izlendiğinde çok düşük verimle saf olamayan protein elde edildi.

Kromatografi aşamaları Feni-Sefaroz - Gel filtrasyon - Resource Q olarak değiştirildiğinde GTPyS bağlama testleri ile G_{α} 'yı izlemek mümkün olduysa da elektroforetik analiz ve Western blot sonuçları tutarlı olmadı.

Kromatografi aşamaları Fenil-Sefaroz - Resource Q olarak değiştirildiğinde çok düşük verimle saf olmayan protein elde edildi.

iii. Saflaştırma çalışmaları sırasında kromatografi aşamaları Fenil – Sefaroz - Gel filtrasyon - Mono Q olarak değiştirildiğinde ve protein analizi elektroforez ve Western blot yöntemleriyle yapıldığında X ışın yapı çalışmaları için uygun miktar ve saflıkta *E. coli* gliserol parçalayan enzimler sisteminden T-protein izole edildi.

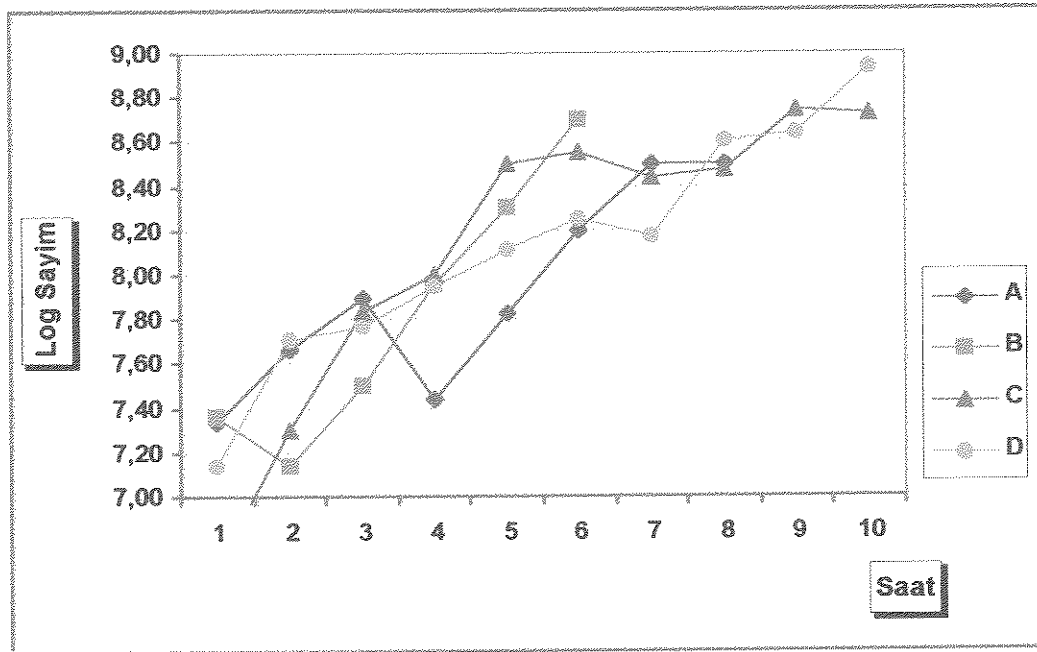
iv. X ışını küçük açı saçılma deneyleri T-proteini ile gerçekleştirildi. Bu proteinin girasyon yarıçapı 2.98 nm olarak hesaplandı ve çözeltide asimetrik bir yapısı olduğu görüldü. Proteinin yapısı PDB veribankasında yapısı bilinen proteinlerle karşılaştırıldığında $G_{\alpha}G_{i\alpha\beta\gamma_2}$ heterotrimerindeki α -altbirimi ile benzerlik bulundu.

9. EKLER

9.1 BL21(DE3) Hücrelerinde G_{ox} Ekspresyonu

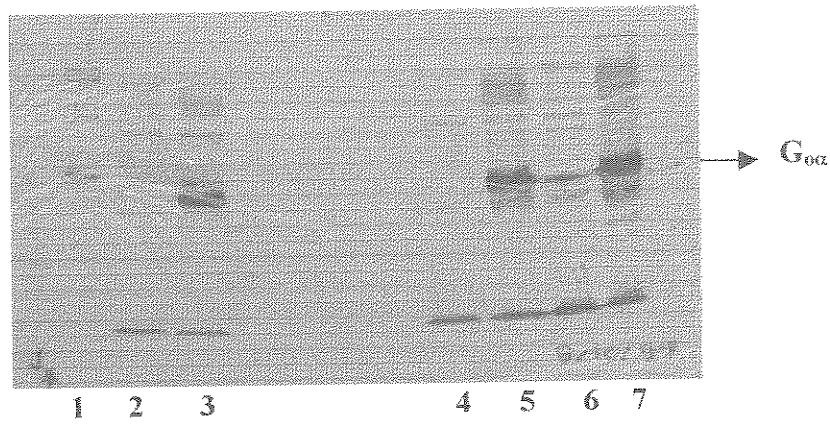
pT7/Nde1/ G_{ox} plazmidini içeren BL21(DE3) *E.coli* soylarında rekombinant protein ekspresyonu ve miktarı değişik besi ortamları ve indüklenme koşulları altında yapılan deneylerle incelendi. Sonuçlar hücrelerin büyüme eğrileri, Western blot analizleri ve GTPyS bağlama deneyleri doğrultusunda değerlendirildi ve elde edilen bulgular plazmid içermeyen hücrelerden alınan sonuçlarla karşılaştırıldı.

Şekil 9.1'de plazmid taşımayan kontrol soylar ile plazmid taşıyan mutant *E.coli* soyları'nın IPTG varlığında ve yokluğundaki büyüme eğrileri karşılaştırılmaktadır.



Şekil 9.1: pT7/Nde1/ G_{ox} plazmidini taşıyan ve taşımayan BL21(DE3) *E.coli* soylarının büyüme eğrilerinin karşılaştırılması. IPTG, $t=5$ 'te eklenmiştir. A: Plazmid içermeyen indüklenmemiş kültür, B: Plazmid içermeyen 0.4 mM IPTG ile indüklenmiş kültür, C: plazmid içeren indüklenmemiş kültür, D: plazmid içeren 0.4 mM IPTG ile indüklenmiş kültür.

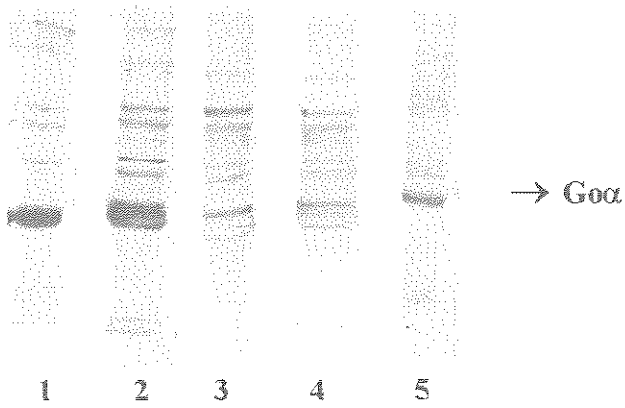
Görüldüğü gibi hücrede yabancı gen taşıyan plazmidin olup olmaması (A ve C eğrileri), yabancı gen ekspresyonunun indüklenmesi (D eğrisi) veya büyüyen hücrelere IPTG eklenmesi büyüme eğrisini etkilemedi. Benzer şartlar altında hücrelerde protein ekspresyonu Western blot yöntemiyle incelendiğinde (Şekil 9.2) IPTG eklenmeden önceki bazal ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu görüldü.



Şekil 9.2: Plazmid taşıyan ve taşımayan BL21(DE3) *E.coli* soylarında G_{α} düzeylerinin Western blot analizi ile karşılaştırılması. 1.protein standartları, 2,4,6 ve 3,5,7 no'lu kuyular sırasıyla plazmid taşımayan ve taşıyan BL21(DE3) hücrelerinin, 0.5 mM IPTG'nin eklendiği $t=0$ ve bunu izleyen 1 ve 2. saatler sonrası ekspresyonlarının tüm alfa altbirimlerine özgü antikor kullanılarak gerçekleştirilen analizlerini göstermektedir (Prof.Dr.Alfred Gilman, P-960 antikor).

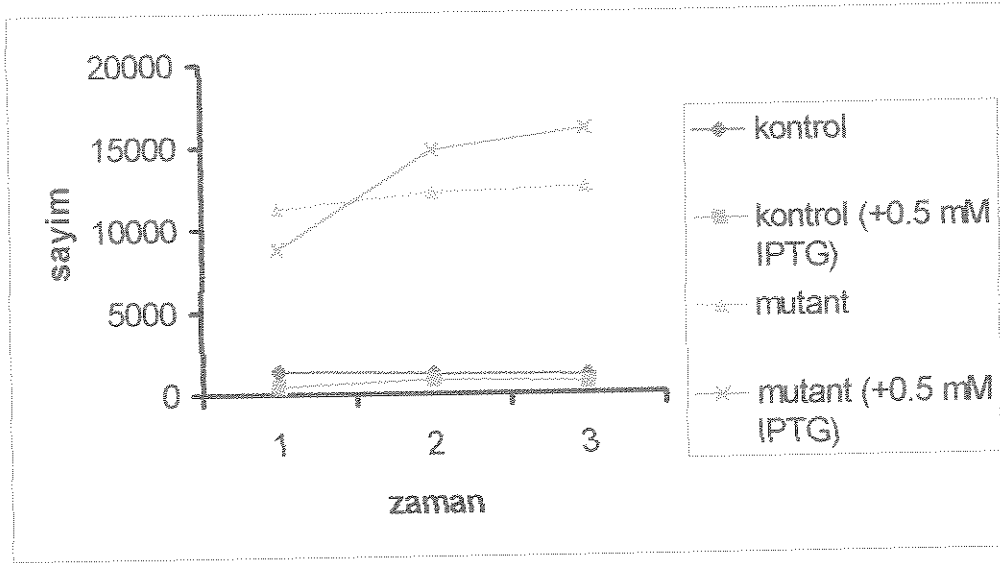
Şekil 9.2'de plazmid taşımayan kontrol hücrelerle plazmid taşıyan hücreler arasında belirgin bir fark gözlemleniyse de, IPTG ekspresyonda saptanabilir bir artışa yol açmadı.

Yüksek derişimdeki IPTG'nin zamanla hücre üzerinde toksik etki yaratabileceği ve proteinin hızlı ve yanlış katlanmasına yol açtığı düşünülerek indüklemeye 50 ve 100 μM 'lık çok düşük IPTG derişimleri kullanılarak tekrarlandı. Şekil 9.3'te 50 μM IPTG ile uzun süreli indüklenmiş bir kültürde G-protein ekspresyon düzeylerinin Western blot analizi görölmektedir.



Şekil 9.3: 50 μM IPTG ile indüklenmiş plazmid içeren kültür. İndüklemeden 1. t=0, 2. t=4, 3. t=14, 4. t=18 saat sonra görülen ekspresyon, 5.beyin membran kesimi. Western blot analizi G_{α} 'ya özgü antikor (NEN-Dupont, NEI-804) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yukarıdaki deneyler ve daha sonra gerçekleştirilen GTP γ S bağlama testleri ekspresyonun IPTG derişimlerinden bağımsız olup düşük düzeyde gerçekleştiği sonucunu desteklemektedir (Şekil 9.4).

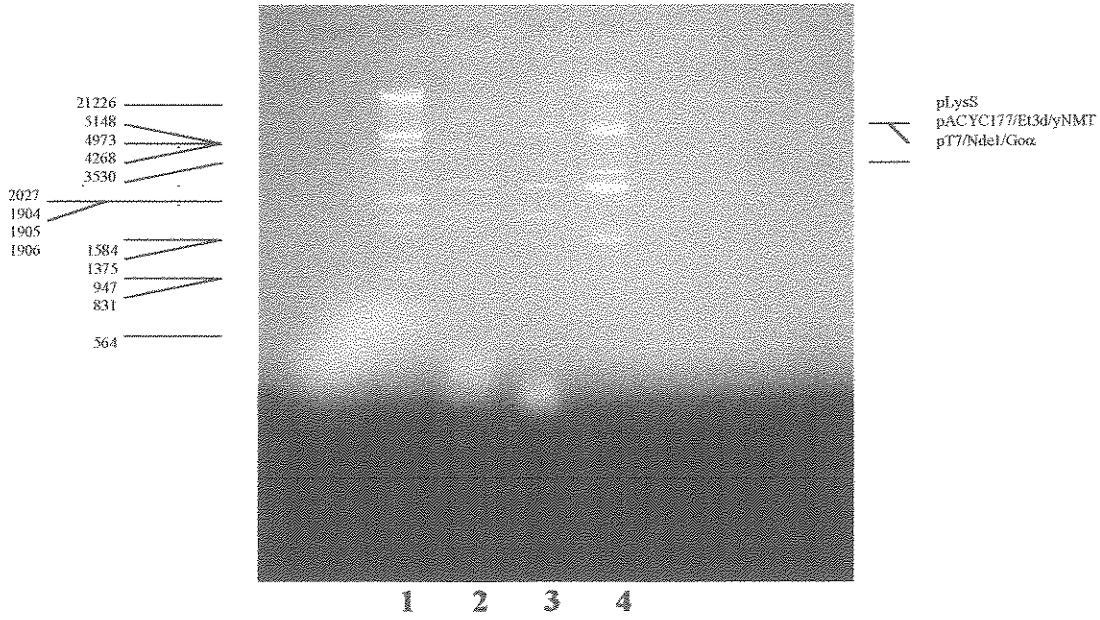


Şekil 9.4 : Plazmid içermeyen (kontrol) ve pT7/Nde1/G_{oa} plazmidini içeren *E.coli* BL21(DE3) soylarının GTP γ S bağlama testi sonuçları. Bağlama testi yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Grafikte IPTG ile indüklemeyen 1,2 ve 3 saat sonraki sayım değerleri görülmektedir. Plazmid içeren hücrelerin GTP γ S bağlama değerleri kontrol hücrelere göre belirgin bir farklılık göstermektedir. IPTG ile gözlenen artış ise anlamlı ölçüde yüksek değildir.

9.2 pT7/Nde1/G_{oa} Plazmid İzolasyonu ve BL21(DE3)pLysS ve

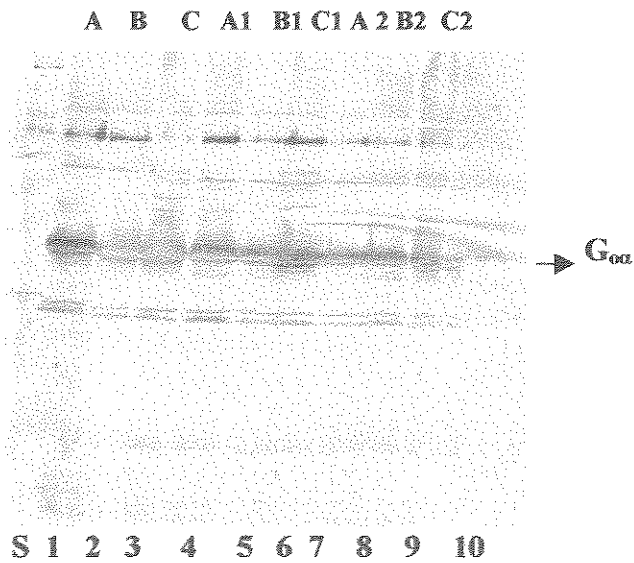
BL21(DE3)pLysE Soylarında G_{oa} Ekspresyonu

Bazal düzeydeki ekspresyonu engelleyerek IPTG etkisini ön plana çıkartmak amacıyla değişik *E.coli* hücreleri konakçı olarak denendi. BL21(DE3) hücrelerinden izole edilen pT7/Nde1/G_{oa} plazmidini BL21(DE3)pLysS ve BL21(DE3)pLysE hücrelerine aktarıldı. Bu hücrelerden izole edilen plazmidlerin elektroforetik analizi (Şekil 9.5) transformasyonun başarılı olduğunu ve kendi plazmidlerinin (pLysS, pLysE) yanısıra pT7/Nde1/G_{oa} plazmidinin varlığını göstermektedir.



Şekil 9.5: pT7/NdeI/G $\alpha\alpha$ plazmidinin izolasyonu.1. λ DNA, 2.NdeI ile kesilmiş plazmid, 3. BL21(DE3) hücrelerinden izole edilen kesilmemiş plazmid, 4.BL21(DE3)pLysS hücrelerinden izole edilen plazmid .

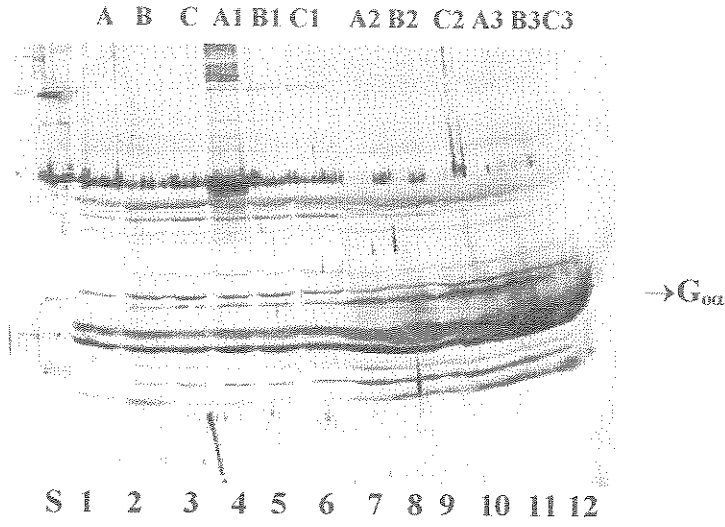
Transforme hücrelerdeki protein ekspresyonu Western blot analizi ile kontrol edildi (Şekil 9.6, 9.7).



Şekil 9.6: BL21(DE3)pLysS hücrelerindeki G $\alpha\alpha$ ekspresyonunun Western blot analizi.

A, B ve C sırasıyla indüklenmemiş, 0.4 mM ve 1 mM IPTG ile indüklenmiş BL21(DE3)pLysS hücrelerini göstermektedir.

S.protein standartları (yukarıdan aşağıya): 97.4 kDa , 66.2 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 1,2,3.indükleme zamanı (t =0), 4,5,6. indüklemeden 1 saat sonraki G $\alpha\alpha$ ekspresyonu (t=1), 7,8,9. Indüklemeden 2 saat sonraki G $\alpha\alpha$ ekspresyonu (t=2), 10.beyin membran kesimi



Şekil 9.7: BL21(DE3)pLysE hücrelerindeki $G_{\alpha\alpha}$ ekspresyonunun Western blot analizi.

A, B ve C sırasıyla indüklenmemiş, 0.4 mM ve 1 mM IPTG ile indüklenmiş BL21(DE3) pLysE hücrelerini göstermektedir. S. protein standartları (yukarıdan aşağıya): 97.4 kDa, 66.2 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 1,2,3. indükleme zamanı ($t=0$), 4,5,6. indüklemeden 1 saat sonraki $G_{\alpha\alpha}$ ekspresyonu ($t=1$), 7,8,9. indüklemeden 2 saat sonraki $G_{\alpha\alpha}$ ekspresyonu ($t=2$), 10,11,12. indüklemeden 3 saat sonraki $G_{\alpha\alpha}$ ekspresyonu ($t=3$).

BL21(DE) pLysE hücrelerinde toplam ekspresyonda artış gözlemleniyse de, her iki hücre tipinde de bazal ekspresyonun engellenmediği ve $G_{\alpha\alpha}$ ekspresyonunda IPTG derişimine bağlı bir yükselme olmadığı görüldü.

10. KAYNAKLAR

- 1- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: Differentiated cells and the maintenance of tissues. 3rd ed Garland publishing. Molecular biology of the cell. New York. Chp:22. 1139-1193. 1994.
- 2- Amatruda, T.T., Steele, D.A., Zlepak, V.Z., Simon, M.I.: $G_{\alpha 16}$, a G protein α subunit specifically expressed in hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:5587-5591. 1991.
- 3- Anafi, M., Gazit, A., Zchavi, A., Ben-Neriah, Y., Levitzki, A.: Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. Blood. 82: 3524-3529. 1993.
- 4- Anderson, L.C., Jokinen, M., Gahmberg, C.G.: Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. Nature. 278: 364-365. 1979.
- 5- Artemyev, N.O., Hamm, H.E. Probing G protein function. Structural Biology, 1: 752-755, 1994.
- 6- Barr, A.J., Brass, L.F., Maning, D.R. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. J.Biol.Chem., 272: 2223-2229, 1997.
- 7- Boulin, C., Kempf, R., Koch, M.H.J., McLaughlin, S.M. Data appraisal, evaluation and display for synchrotron radiation experiments: hardware and software. J.Nucl.Instrum.Methods, A249, 399-407, 1986.
- 8- Bourguignon, J., Vauclaire, P., Merand, V., Forest, E., Neuburger, M., Douce, R. Glycine decarboxylase complex from higher plants. Molecular cloning, tissue

- 9- Cantor, C.R., Schimmel, P.R. Biophysical Chemistry, Part II : Techniques for the study of biological structure and function. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Ch.13, s.692, 1980.
- 10- Clapham, D.E., Neer, E.J.: G-protein $\beta\gamma$ subunits. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 37:167-203, 1997.
- 11- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., Sprang, S.R. Structures of active conformations of $G_{i\alpha 1}$ and the mechanism of GTP hydrolysis. Science, 265: 1405-1411, 1994.
- 12- Conklin, B.R., Bourne, H.R.: Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$, receptors, and effectors. Cell, 73:631-641, 1993.
- 13- Corre, I., Hermouet, S.: Regulation of colony-stimulating factor 1-induced proliferation by heterotrimeric G_{i2} proteins. Blood. 86: 1776-1783. 1995.
- 14- Denis-Henriot, D., Lacasa, D., Goldsmith, P.K., De Mazancourt, P., Giudicelli, Y. Site-related differences in G protein α subunit expression during adipogenesis *in vitro*: Possible key role for $G_{q/11\alpha}$ in the control of preadipocyte differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 220: 43-448, 1996.
- 15- Galvin-Parton, P.A., Watkins, D.C., Malbon, C.C. Retinoic acid modulation of transmembrane signaling. Analysis in F9 teratocarcinoma cell. J.Biol.Chem., 265: 17771-17774, 1990.
- 16- Gambari, R., Raschella, G., Fantoni, A. Cytologic evidence for increased rRNA gene activity in hemin-induced K562(S) cells. Cancer Genetics and Cytogenetics, 17: 113-122, 1985.

- 17- Gao, P., Malbon, C.C. Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells to primitive endoderm is regulated by the $G_{12\alpha}/G_{s\alpha}$ axis via phospholipase C and adenylyl cyclase. *J.Biol.Chem.*, 271: 30697-30698, 1996.
- 18- Gierschik P., Morro B., Milligan G., Rubin C., Spiegel A.: Changes in the guanine-nucleotide binding proteins, Gi and Go, during differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS. Lett*, 199:103-106, 1986.
- 19- Graziano , M.P., Casey , P.J., Gilman , A.G. Expression of cDNA's for G-proteins in *E.coli* . *J.Biol.Chem.*, 262 : 11375-11381, 1987.
- 20- Graziano , M.P., Freissmuth , M., Gilman , A.G. Expression of $G_{s\alpha}$ in *E.coli*. *J.Biol.Chem.*, 264 : 409-418, 1989.
- 21- Gilman , A.G. , Linder , M.E.: G-proteins. *Sci. Am.* , 267: 36-43, 1992.
- 22- Gopalakrishna, T.V., Anderson, W.F. Mouse erythroleukemia cells. *Methods. Enzymol.*, 57: 507-511, 1979.
- 23- Guyton, A.C., Hall, J.E. Red blood cells, anemia, and polycythemia in *Textbook of Medical Physiology*. 9th ed. ,W.B. Saunders Company. Ch.32, 425-433,1994.
- 24- Hepler , J.R. , Gilman , A.G.: G-proteins. *Trends. Biochem.Sci.*, 17:383-391, 1992.
- 25- Hong , J., Haun , R.S., Tsai , S., Moss , J., Vaughan , M. Effect of ADP-ribosylation factor amino-terminal deletions on its GTP-dependent stimulation of cholera toxin activity. *J.Biol.Chem.*, 269 : 9743-9745, 1994.

- 34- Koch, M.H.J. Structure and condensation of chromatin in *Protein-Nucleic Acid Interaction*, Eds: Saenger, W. and Heinemann, U., Macmillan Press, s.163-204, 1989.
- 35- Lambright , D.G. , Noel , J.P. , Hamm , H.E. , Sigler , P.B. Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G-protein. *Nature* , 369:621-628, 1994.
- 36- Lavu , S., Clark , J., Swarup , R., Matsushima, K., Paturu, K., Moss , J., Kung , H.:Molecular cloning and DNA sequence analysis of the human guanine nucleotide binding protein G_{α} . *Biochem.Biophys.Res.Comm.* , 150 : 811-815, 1988.
- 37- Lee , E. , Linder , M.E. , Gilman , A.G. Expression of G-protein α -subunits in *E.coli*. Goeddel, D.V., ed. *Methods Enzymol.* , Vol.237, Academic Press, Inc., California, Ch.12, s.146-165,1994.
- 38- Linder , M.E., Gilman , A.G. Purification of recombinant $G_{i\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ proteins from *E.coli*. Goeddel, D.V., ed. *Methods Enzym.* Vol.195, Academic Press, Inc., California, Ch.18, s.202-215, 1991.
- 39- Logothetis , D.E. , Kurachi , Y. , Galper , J. , Neer , E.J. , Clapham , D.E. The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* , 325: 321-326, 1987.
- 40- Malbon, C.C. Heterotrimeric G-proteins and development. *Biochem. Pharmacol.*, 53:1-4, 1997.
- 41- Mattera, R., Graziano, M.P., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A.G., Brown, A.M. Splice variants of the α subunit of the G protein G_s activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science*, 243: 804-807, 1989.

- 26- Hong, Y., Martin, J.F., Vainchenker, W., Eruslimsky, J.D.: Inhibition of protein kinase C suppresses megakaryocytic differentiation and stimulates erythroid differentiation in HEL cells. *Blood*. 87. 123-131. 1996.
- 27- Hommo, Y., Okabe, K.J., Hozumi, M., Uehara, Y., Mizuno, S.: Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemic cells by herbimycin A, an inhibitor of tyrosinekinase activity. *Cancer. Res.* 49: 331-337. 1989.
- 28- Hulme, E.C. Interactions of muscarinic acetylcholine coupling. A practical approach. IRL press, Oxford, 1-100, 1990.
- 29- Jordan, F.L. Distribution and expression of G-protein rat cerebral cortical cells. *Dev. Brain Res.* 67:11-18, 1992.
- 30- Justice, J.M., Bizziotes, M.M., Stevens, L.A., Moss, J., Vaughan, M. Involvement of N-myristoylation in monoclonal antibody recognition sites on chimeric G-protein alpha subunits. *J.Biol.Chem.* 270 : 6436-6439, 1995.
- 31- Kelvin, D.J., Simard, G., Tai, H.H., Yomaguai, T.P., Connolly, J.A.: Growth factors, signaling pathways and the regulation of proliferation and differentiation in BC3H1 Muscle cells. *J. Cell. Biol.* 108: 159-167. 1989.
- 32- Kesseling, F., Psicher, K., Porzig, H. Chages in G protein pattern and in G-protein-dependent signaling during erythropoietin- and dimethylsulfoxid-induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Blood*, 84: 4088-4098
- 33- Koch, M.H.J. Scattering from non-crystalline systems in *Handbook on Synchrotron Radiation*. Ed. Ebashi, S., Koch, M.H.J., Rubenstein, E., Ch.6, 241-268, 1991.

- 42- McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J., Margloskee, R.F. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, 357: 563-569, 1992.
- 43- Meißner, J.D., Brown, G.A., Mueller, W.H., Scheibe, R.J. Retinoic acid-mediated decrease of G_{as} protein expression: involvement of G_{as} in the differentiation of HL-60 myeloid cells. *Exp. Cell. Res.* 225:112-121.
- 44- Miller, B.A., Foster, K., Robinsaw, J.D., Whitfield, C.F., Bell, L., Cheung, J.Y. Role of pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding proteins in the response of erythropoietin. *Blood*, 77: 486-492, 1991.
- 45- Mixon, M.B., Lee, E., Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Gilman, A.G., Sprang, S.R. Tertiary and quaternary structural changes in G_{ial} induced by GTP hydrolysis. *Science*, 270: 954-960, 1995.
- 46- Morishita, R., Nakayama, H., Isobe, T., Matsuda, T., Hashimoto, Y., Okano, T., Fukada, Y., Mizuno, K., Ohno, S., Kozawa, O., Kato, K., Asano, T. Primary structure of a γ subunit of G protein, γ_{12} , and its phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 270:29469-29475, 1995.
- 47- Mulaney, L., Milligan, G. Elevated levels of the guanine-nucleotide binding protein, G_o are associated with differentiation of neuroblastoma X glioma hybrid cells. *FEBS Lett.* 244: 113-118, 1989.
- 48- Murphy, P.M., Brann, M., Goldsmith, P., Spiegel, A., Malech, H.L. Detection of multiple forms of G_{ix} in HL 60 cells. *FEBS Lett.* 221: 81-86 1987.
- 49- Nishimoto, T., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G_o . *Nature*, 362: 75-79, 1993.

- 50- Noel , J.P. , Hamm , H.E. , Sigler , P.B. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* , 366:654-663, 1993.
- 51- Offermans, S., Schafer, F., Hoffman, B., Bobbien, E., Spicher, K., Hinsch, D., Schultz, G., Rosenthal, W. Agonist sensitive binding of photoreactive GTP analog to a G protein subunit in membranes of HL-60 cells. *FEBS Lett.* 260: 14-18, 1990.
- 52- Okamura-Ikeda , K., Ohmura , Y., Fujiwara , K., Motokawa , Y. Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *Eur. J. Biochem.*, 216: 539-548, 1993.
- 53- Olate , J. , Allende, J.E.: Structure and function of G-proteins. *Pharmacol Ther.* 51:403-419, 1991.
- 54- Oliver, B., Lowry, H., Rosebrough, N.J., Forr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin reagent. *J.Biol.Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 55- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., Wittinghofer, A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*, 341:209-214.
- 56- Poolock, K., Creba, J., Mitchell, F., Milligan, G. Stimulus response coupling in FMLP-stimulated U-937 monocytes: effect of differentiation on G_{i2} expression. *Biochim.Biophys.Acta*, 1051: 71-77, 1990.
- 57- Rens-Domiano , S. , Hamm , H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.* , 9:1059-1066, 1995.
- 58- Sambrook , J., Fritsch , E.F., Maniatis , T. *Molecular Cloning*. Nolan, C., ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol.1, s:1.83-1.84, 1989.

- 59- Sayers , Z. Structural analysis of proteins using X-ray scattering and diffraction methods. Kan, B.& Severcan, F., eds., TÜBİTAK-MAM Publication, Gebze-Kocaeli, s.43-56, 1997.
- 60- Sayers , Z. Synchrotron X-ray scattering studies of the chromatin fibre structure. Topics Curr. Chem., 145:204-232, 1988.
- 61- Schubert, B., Vandongen, A.M.J., Kirsch, G.E., Brown, A.M. β -adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. Science, 245: 516-519, 1989.
- 62- Sonddek , J. , Lambright , D.G., Noel , J.P., Hamm , H.E., Sigler , P.B. GTPase mechanism of G-proteins from the 1.7 Å crystal structure of transducin α .GDP.AIF₄. Nature, 372: 276-279, 1994.
- 63- Strittmater, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J., Fishman, M.C. G_{ac} is major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. Nature, 344: 836-841, 1990.
- 64- Strittmater, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J., Fishman, M.C. Mediation by G-proteins of signals that cause collapse of growth cones. Science, 260: 779, 1993.
- 65- Su, H., Malbon, C.C., Wang, H. Increased expression of G_{i2a} in mouse embryonic stem cells promotes terminal differentiation to adipocytes. Amer.J.Physiol., 256: C1729-C1734, 1993.
- 66- Svergun, D., Barberato, C., Koch, M.H.J. CRY SOL- a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. J.Appl.Cryst., 28: 768-773, 1995.

- 67- Tenailleau, S., Corre, I., Hermouet, S. Specific expression of heterotrimeric G proteins G_{12} and G_{16} during myeloid differentiation. *Exp. Hematol.*, 25: 927-934, 1997.
- 68- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350, 1979.
- 69- Vallar, L., Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer. Surveys.* 27:325-338. 1996.
- 70- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iñiguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., Sprang, S.R. The structure of the G-protein heterotrimer $G_{i\alpha 1\beta\gamma 2}$. *Cell* 83:1047-1058, 1995.
- 71- Wang, H., Watkins, D.C., Malbon, C.C. Antisense oligonucleotides to G_s protein α -subunit sequence accelerate differentiation of fibroblasts to adipocytes. *Nature*, 358: 334-337, 1992.
- 72- Watkins, D.C., Rapielko, P.J., Ros, M., Wang, H., Malbon, C.C. G protein mRNA levels during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 929-934.

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: SBAG-1710 2- Rapor Tarihi: 26.3.1999

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.1.1997 - 1.1.1999

4- Projenin Adı:

G-Protein Ekspresyonu Üzerine Çalışmalar

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Prof.Dr.Beki Kan, Doç.Dr.Zehra Sayers, Dr.Bahire Küçükaya, Dr.Oya Orun

6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı, Tıbbiye Cad., No:49, Haydarpaşa 81326 -İstanbul

7- Desteleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

8- Öz (Abstract): Heterotrimerik guanin nükleotit bağlayıcı proteinler (G-proteinler) pek çok hücre yüzey reseptörünü hücre içi efektör proteinlere bağlayan aracı proteinlerdir. G-proteinleri aracılığıyla gerçekleştirilen olaylar dizisi duysal algılama, nöronal etkinlik, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi çeşitli sistemlerin düzenlenmesi ile sonuçlanır. Bu projede iki farklı çalışma paralel olarak yürütülmüştür.

1. G proteinlerinin eritroid hücre farklılaşmasındaki rolünün incelenmesi,

2. Merkezi sinir sisteminde en yaygın bulunan G protein tipi olan G α proteininin alfa altbiriminin saflaştırılması ve T-proteinini'nin saflaştırılarak X ışınları ile yapı analizinin yapılması.

Anahtar Kelimeler: farklılaşma-K562-eritroid-G α alfa-saflaştırma-ekspresyon

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler

Orun, O., Kan, B., Koch, M.H.J., Sayers, Z. Partial purification and characterization of G α lpha. 10th Int.Conf.on Second Messengers and Phosphoproteins. Nov98 Israel

10- Bilim Dalı: 101.10.01, 101.04.01

Doçentlik B. Dalı Kodu:

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım (*) : ☐ Sınırlı

☒ Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu :

☐ Gizli

☒ Gizli Değil