

37686

T.C.

İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi :
Doç. Dr. Rüstem NURTEN


ÖKARYOTİK PROTEİN SENTEZİNİN
ELONGASYON AŞAMASININ
ETKİ MEKANİZMALARI

(Yüksek Lisans Tezi)

Işıl ALBENİZ (ÜSTÜNDAĞ)

İstanbul, 1989

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



Yüksek Lisans tezimin yönetiminde ve yürütülmesinde, değerli fikirleri ve bilgileri ile bana destek ve yardımcı olan sayın hocam Prof.Dr. Engin BERMEK'e, tez konumun yürütülmesi sırasında bilgilerinden ve teşvik edici yardımlarından yararlandığım danışmanım Doç.Dr. Rüstem NURTEN'e teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

SAYFA

I. GİRİŞ	1
1. Protein Sentezi.....	1
2. Protein Sentezine Katılan Öğeler.....	2
2.1. Haberci ("messenger") RNA.....	2
2.2. Aminoasil-transfer RNA (AA-tRNA).....	3
2.3. Ribozom.....	3
2.4. Protein Faktörleri.....	5
3. Protein Sentezinin Aşamaları.....	5
3.1. Aminoasitlerin Aktifleşmesi.....	7
3.2. İnisiyasyon-Polipeptid Zincirlerinin Oluşumunun Başlaması.....	8
3.3. Elongasyon-Polipeptid Zincirinin Uzaması	8
3.3.1. AA-tRNA'nın Ribozoma Bağlanması.	9
3.3.2. Peptid Bağının Oluşumu.....	9
3.3.3. Translokasyon.....	9
3.3.4. Terminasyon-Polipeptidlerin Olu- şumunun Sonlanması.....	10
4. Elongasyon Faktörleri.....	11
4.1. Prokaryot Elongasyon Faktörleri.....	11
4.2. Ökaryotik Elongasyon Faktörleri.....	12
5. EF-2'nin ADP-ribozillenmesi.....	13
6. Tezin Amacı.....	14
II. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	15
1. Çalışmada Kullanılan Maddeler.....	15
1.1. Kimyasal Maddeler.....	15
1.2. Kromatografik Gereçler.....	16
1.3. Radyoaktif Gereçler.....	16
1.4. Eriyiklerin Bileşimi.....	16
2. EF-2'nin Saflaştırılması.....	18
3. Elektrofokus İşlemi.....	21

SAYFA

4. EF-2'nin Elektroforetik Analizi.....	21
5. EF-2'nin Difteri Toksini Varlığında ADP-ribozillenmesi.....	24
6. EF-2'nin Difteri Toksini Yokluğunda ADP-ribozillenmesi.....	24
7. Radyoaktivitenin Ölçülmesi.....	26
8. Protein Tayini.....	26
III. BULGULAR.....	28
1. Değişik Dokularda EF-2'nin Eldesi.....	28
1.1. Sıçan Karaciğerinden EF-2'nin Eldesi....	28
1.2. Sıçan Karaciğer Dokusundan Elde Edilen EF-2'nin Elektroforetik Analizi.....	31
1.3. Sıçan Böbreğinden EF-2 Eldesi.....	32
1.4. Sıçan Böbrek Dokusundan Elde Edilen EF-2 Kesimlerinin Elektroforetik Analizi.....	32
1.5. Sıçan Akciğer Dokusundan EF-2'nin Eldesi.	36
1.6. Sıçan Akciğer Dokusundan Elde Edilen EF-2 Kesimlerinin Elektroforetik Analizi.....	36
1.7. Sıçan Beyin Dokusundan EF-2'nin Eldesi...	37
1.8. Sıçan Beyin Dokusundan Elde Edilen EF-2'nin Elektroforetik Analizi.....	37
IV. TARTIŞMA.....	39
V. ÖZET.....	41
VI. SUMMARY.....	42
KAYNAKLAR.....	43
KISALTMALAR.....	49

I. GİRİŞ

1. Protein Sentezi

Canlı sistemlerin tüm yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesinde kendine benzer canlıyı meydana getirmesinde ve doğada canlı sistemler arasında görülen farklılıkların oluşmasında sorumlu bileşik DNA (Deoksiribonükleik asit) molekülüdür.

Kalıtsal olayların hücre düzeyinde ve moleküler düzeyde nasıl gerçekleştiğinin bilinmesi için bu olaya katılan bileşiklerin yapı ve özelliklerinin tanımlanması gerekir. Kalıtsal bilginin protein moleküllerine çevrilmesi süreci gen ekspresyonu olarak adlandırılır. Bu olay iki aşamada gerçekleşir.

Transkripsiyon olarak adlandırılan ilk aşamada DNA'da saklı bulunan kalıtsal bilgi haberci RNA (mRNA) molekülüne aktarılır. mRNA moleküllerinde bulunan nükleotit'lerin içerdiği dört çeşit bazın (A,C,G,U) üçlü sıralar halinde birleşmesi ile oluşan 64 şifre sözcüğü (kodon) proteinlerde bulunan 20 çeşit amino asidi belirler. Transkripsiyonu izleyen ikinci aşama translasyon olarak adlandırılır. Bu aşamada mRNA'da sıralı kodonlar ribozom adı verilen organeller tarafından sırayla okunarak proteinlerin birincil yapısını oluşturan amino asit dizilerine dönüştürülür.

Ribozom üzerinde meydana gelen translasyon aşaması kodonları tamamlayıcı(komplementer) baz dizileri (antikodonları) içeren aracı tRNA molekülleri yardımı ile gerçekleşmektedir. Ayrıca bu işlemler sırasında birçok protein faktör ve enzim de görev almaktadır.

2. Protein Sentezine Katılan Öğeler

2.1. Haberci ("messenger") RNA

Protein sentezinin gerçekleşmesi için gerekli genetik bilgiyi taşıyan RNA molekülüne "messenger" yada haberci RNA (mRNA) adı verilir. Protein sentezinde kalıp görevini üzerine almış mRNA molekülleri farklı büyüklüklere sahiptirler. mRNA, DNA molekülünün sarmal yapan iki ipliğinin belli yerlerinin açılması ile bu ipliklerden biri üzerinden sentez edilir. Bir protein sentezinin gerçekleşmesi için gereken bilgiyi içeren mRNA molekülü monosistronik (teksistronlu), birden daha fazla protein sentezi için gerekli bilgiyi içeren mRNA molekülü ise polisistronik (çok sistronlu) mRNA olarak adlandırılır. mRNA sistronun ortalama büyüklüğü, 300-500 arasında amino asitinden oluşacak bir polipeptid zincirini kodlamak üzere 900-1500 nükleotit kadardır.

mRNA'nın özellikleri 1961 yılında Jakob ve Monod tarafından tanımlanmıştır (1). E.coli hücresinde mRNA'nın ömrü iki dakika kadardır. mRNA'nın işlevi tamamlanır tamamlanmaz ribonükleaz enzimi ile parçalanır. Çekirdekli hücrelerde ise mRNA daha uzun zaman bozulmadan kalabilir.

E.coli Lac Operonu üzerine yaptıkları çalışmada araştırmacılar, mRNA'nın

- Polinükleotit olması,
- Sahip olduğu baz dizisinin DNA'nındaki ile aynı(komplementer) olması,
- Uzunluğun şifrelediği polipeptit zincirinin büyüklüğüne göre çok değişik olması,

- Ribozomlar ile geçici etkileşmesi,
- Sentezinin ve yıkılmasının çok kısa sürede gerçekleşmesi, gibi özelliklerinin olduğunu ortaya koymuşlardır(2-3).

2.2. Aminoasil-transfer RNA (AA-tRNA)

mRNA üzerindeki kodonların belirlediği amino asitler ribozoma tRNA molekülleri tarafından taşınır. mRNA ile amino asitler arasındaki etkileşim tRNA molekülleri yardımıyla olmaktadır (4-5).

Her amino asit için özgün enaz bir tRNA molekülü vardır. Pekçok tRNA molekülünün yapıları saptanmıştır (6-7). Her tRNA molekülünün nükleotit dizisinde amino asidi şifreleyen kodona komplementer üçlü bir nükleotit dizisi (antikodon) bulunur. mRNA üzerindeki kodon ile onu tamamlayan tRNA antikodunu arasında baz çiftleşmesi yoluyla şifre sözcüğü karşılığı olan amino aside çevrilir. Ancak önce amino asitlerin kendilerine özgü tRNA'lara bağlanmaları gerekmektedir (8-9).

2.3. Ribozom

Protein sentezinin meydana geldiği yer olan ribozomlar karmaşık bir yapıya sahiptir (10,11).

Ribozomun görevi mRNA molekülünde bulunan kalıtsal şifrenin doğru biçimde okunarak karşılığı olan amino asit dizisine çevrilmesi ve bu amino asitler arasında peptit bağlarının oluşmasını sağlamaktır (12).

Ribozomlar RNA ve protein içerir ve iki alt birimden oluşur. Bu birimler birleşerek mRNA üzerinde protein sentezini başlatırlar. Ribozomlar endoplazmik retikulum zarlarına bağlı olabileceği gibi sitoplazmada serbest haldede bulunabilirler.

Ribozom küçük alt birimi mRNA'ya bağlanarak mRNA'nın kodonu ile tRNA antikodonunun birbirlerine uyum sağlayıp sağlamadığını denetler. Ribozom büyük alt birimi ise ribozoma bağlanan tRNA moleküllerinin taşıdığı amino asitleri peptit bağları kurarak polipeptit zincirinin karboksil ucuna ekler (13,14). Peptit bağlarının oluşumu büyük ribozom alt birimi ögesi olan peptidil transferaz enzimi ile sağlanır (13).

Ribozomların alt birimlerinin birarada bulunabilmesi için oldukça az Mg^{+} konsantrasyonuna (1mM) gereksinim gösterirler. Eger Mg^{+} konsantrasyonu çok azaltılırsa ribozom alt birimleri birbirinden ayrılır. Prokaryot ve Ökaryotlarda iki farklı büyüklükte ribozom bulunur. Bunlar sırasıyla 70 S ve 80 S ribozomlardır. S değeri moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak ultrasantrüfleme yöntemindeki çökme katsayısıdır.

Prokaryot ribozomları 50 S ve 30 S alt birimlere, Ökaryot ribozomları 40 S e 60 S alt birimlere ayrılır. 70S katsayısıyla gösterilen prokaryot ribozom molekül ağırlığı 2.8×10^6 daltondur (15). 80 S sedimantasyon katsayısıyla gösterilen ökaryot ribozomu ise 4.3×10^6 dalton molekül ağırlığına sahiptir (16). E.coli ribozomları büyük alt birimde 33 küçük alt birimde 21 olmak üzere 54 protein içerir (17,18). Ribozom proteinlerinin çeşitlerinin sayısı ökaryot türlerine göre değişir ve prokaryotlardan daha fazladır (19,20). Hücrelerde 5 yada daha fazla sayıda ribozomun mRNA ile oluşturduğu, protein sentezinde fonksiyonel olarak etkili yapılar polizom olarak adlandırılır. Buna göre bir mRNA molekülü üzerinde aynı anda birden çok ribozomun çalışabilmesi mümkündür.

2.4. Protein Faktörleri

Protein sentezinin değişik aşamalarında görev alan protein faktörlerine çeşitli organizmalarda verilmiş olan farklı simgeler şekil 1'de topluca gösterilmiştir (21,22).

	<u>Prokaryot</u>	<u>Ökaryot</u>
	IF-1	e IF-1
	IF-2	e IF-2
	IF-3	e IF-3
Başlama		e IF-4A
faktörleri		e IF-4B
		e IF-4C
		e IF-4D
		e IF-5
		e IF-2A
Uzama	EF-Tu	EF-1 (EF-I _L , EF-I _H)
faktörleri	EF-Ts	(EF-I _α , EF-I _β)
	EF-G	(eEF-Tu, eEF-Ts)
Sonlanma	RF-1	EF-2
faktörleri	RF-2	R
	RF-3	

Şekil 1. Protein sentezinde rol oynayan faktörlere verilmiş farklı simgeler.

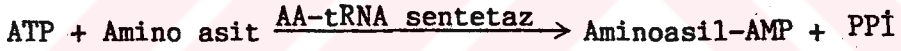
3. Protein Sentezinin Aşamaları

Protein sentezi mRNA üzerinde bir proteinin (polipeptit zincirlerinin) sentezi için gerekli bilgiyi içeren sistronun 5' ucundaki başlangıç (AUG) kodonundan başlayarak sistron boyunca devam eder ve ribozomun sonlanma kodonuna ulaşması ile (UAG, UGA, UAA) sona erer. Bu oluşum üç evrede gerçekleşir. Her bir evre kendine özgü öğelere gereksinim duyar. Bu evreler sırasıyla protein sentezinin başlangıç (inisiyasyon), uzama (elongasyon), sonlanma (terminasyon) aşamalarıdır. Bu aşamalar Şekil 2'de şematik olarak gösterilmiştir.

Protein sentezi ribozom üzerinde gerçekleşen bu üç evrenin yanısıra amino asitlerin aktifleşmesi olarak adlandırılan bir öncü evreyide kapsar.

3.1. Amino Asitlerin aktifleşmesi

Protein sentezinin doğru biçimde yapılması bu olayda rol oynayan tRNA ların kendilerine özgü amino asitlerle doğru biçimde yüklenmesine bağlıdır. Bu yüklenme olayında görev yapan enzim aminoasil-tRNA sentetazdır. Amino asitler karboksil grupları üzerinden AA-tRNA sentetaz enzimi yardımıyla onları belirleyen şifre sözcüklerini tamamlayıcı antiko-don bölgeleri taşıyan tRNA moleküllerinin 3' ucundaki adenozinin 3' OH grubuna birer ATP molekülünün tüketimi ile ester bağı ile bağlanır (23,24). Bu oluşum iki aşamada meydana gelir ilk aşamada amino asitlerin COOH grubu özgün aminoasil-tRNA sentetaz enzimlerinin yardımı ile, ATP'den pirofosfat grubunun açığa çıkmasıyla oluşan, AMP molekülünün 5' fosfat grubuna anhidrit bağı ile bağlanır.



İkinci aşamada aminoasil grubu yine AA-tRNA sentetaz enzimi aracılığı ile AMP'den özgün tRNA molekülüne aktarılır.



Ester bağı ile özgün tRNA moleküllerine bağlanan amino asitler yüksek enerji düzeyine getirilmiş, yani aktifleştirilmiştir (25). Ester bağının ribozom üzerinde hidrolizi ile serbest hale gelen enerji peptit bağının oluşumunda kullanılır.

3.2. İnisiyasyon-Polipeptit Zincirlerinin Oluşumunun Başlaması

Protein sentezinin ribozomlarda doğru olarak gerçekleşmesi için, ribozomun mRNA üzerinde sistron'un başlangıç bölgesine bağlanması gerekir. Bu başlangıç noktasını ise mRNA daki AUG kodonu belirler. Böylelikle, ribozomların mRNA üzerindeki herhangi bir nükleotit dizisine bağlanıp anlamsız ve biyolojik işlevi olmayan peptit zincirlerinin meydana gelmesi önlenmiş olur. Protein sentezinin doğru biçimde yapılması için sadece AUG kodonunun verdiği işaret yeterli değildir. Bunun ötesinde polipeptit zincirinin hangi AUG kodonundan başlayacağını başlangıç AUG kodonunun 5' yanında bulunan özel nükleotit dizisi ve mRNA'nın ikincil yapısında belirler (26). AUG kodonu varlığında ve başlangıç faktörlerin yardımı ile ribozoma -prokaryotlarda amino grubu formaldehit ile kaplı- metiyoninle yüklü özel bir başlangıç tRNA'sı bağlanır. Başlangıç kodonu ile (AUG) fmet-tRNA'nın antikodunu arasındaki etkileşim sonucu mRNA bu komplekse katılır. Amino grubu kapalı N-formilmetyonin tRNA (fmet-tRNA_{met}^f) peptit zincirinin amino ucundan karboksil uç yönüne doğru büyümesi koşullandırılır. Protein sentezi sonunda amino ucuna takılı met (f) grubu özel enzimler tarafından proteinden ayrılır. Başlangıç kompleksinin oluşmasında inisiyasyon faktörleride görev almaktadır (23).

3.3. Elongasyon-Polipeptit Zincirinin Uzaması

Ribozomda iki özel bölge bulunmaktadır. Bu bölgelerden birine, aminoasil-tRNA molekülünün özel bir şekilde bağlandığı yer aminoasil bölge yada A-bölgesi, diğerine ise peptidil-tRNA molekülünü taşıyan peptidil bölge yada P-bölgesi adı verilir.

Protein sentezinin elongasyon aşaması, mRNA kodonlarının belirlediği aa-tRNA moleküllerinin A-bölgesine bağlanmasını ribozomun P bölgesinde bulunan peptidil-tRNA'nın peptidil bölümünün karboksil grubunun aa-tRNA'nın aminoasil

bölümünün amino grubuna peptit bağı meydana getirerek aktarılmasını (peptidil transfer) ve ribozomun mRNA üzerinde 5'→3' yönünde bir kodon boyu kayması (translokasyon)'nı kapsar.

3.3.1. AA-tRNA'nın Ribozoma Bağlanması

AA-tRNA'nın ribozoma bağlanmasında prokaryotlarda EF-Tu, ökaryotlarda EF-1 α olarak adlandırılan faktörler görev almışlardır. EF-Tu (EF-1 α). GTP-AA-tRNA kompleksinin ribozoma bağlanması GTP hidrolizi ile gerçekleşir. Bunu hidroliz sonucu (EF-1 α) EF-Tu. GDP ve Pi oluşumu izler (27,28). AA-tRNA'nın ribozoma bağlanması sırasında mutlaka bir GTP molekülünün hidrolizi söz konusudur (29,30). GTP hidrolizi ile meydana gelen konformasyon değişimi ile EF-Tu. GDP kompleksi ribozomdan ayrılırken A bölgesindeki AA-tRNA peptit bağının oluşumu için alıcı konformasyon özelliğini kazanır(31).

3.3.2. Peptit Bağının Oluşumu

Peptidil transfer adı altında tanımlanan reaksiyonda, ribozomun P-bölgesinde bulunan peptidil tRNA'nın peptidil kısmının karboksil grubu yukarıda anlatıldığı biçimde A bölgesine bağlanan AA-tRNA'nın aminoasil kısmının α -amino grubuna peptid bağı oluşturarak aktarılır. Bu reaksiyon sonucu P bölgesinde deasillenmiş bir tRNA molekülü kalır.

Peptidil transferaz reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli önkoşul, AA-tRNA'nın aminoasil bölgede serbest kalmış olması, yani EF-Tu'nun görevini tamamlayarak ribozomdan ayrılmış olmasıdır. Peptidil transfer reaksiyonu GTP kullanımını, aynı zamanda protein faktörlerinin varlığını gerçekleştirmez. Bu olay ribozom varlığında gerçekleşen bir tepkimedir (32,33).

3.3.3. Translokasyon

Translokasyon aşamasında üç farklı aynı zamanda birbiri ile bağlantılı olaylar ribozom üzerinde gerçekleşir. Bu aşamalar,

- mRNA molekülünün ribozom üzerinde bir kodon boyunca kaymasını,
- Peptidil-tRNA'nın A-bölgesinden P-bölgesine geçişini,
- tRNA'nın ribozomdan deasilenmiş olarak ayrılmasını, kapsar.

Elongasyon evresinin devam edebilmesi için peptidil-tRNA'nın ürün konumundan verici substrat peptidil-tRNA konumuna geçmesi ve yeni bağlanacak AA-tRNA'yı belirleyecek şifre sözcüğünün A-bölgesine girmesi gerekmektedir (34).

Translokasyon sırasında peptidil-tRNA'nın ürün konumundan verici substrat konumuna geçmesi, ribozomun mRNA üzerinde bir kodon boyu kayması sırasında yeni bir sözcüğün A-bölgesine girmesi gerçekleşir. Bu arada deasilenmiş tRNA ribozomdan ayrılır.

Translokasyon prokaryotlarda EF-G, ökaryotlarda ise EF-2 olarak gösterilen protein faktörleri ile meydana gelir. Her iki faktörde etkinliklerini ancak GTP varlığında gösterirler. Translokasyon sırasında EF-2 (EF-G) ribozom ile katalitik olarak etkileşir. Her translokasyon adımı için bir molekül GTP hidroliz edilir.

Translokasyonun GTP ve faktörlerin yokluğunda gerçekleşmesini gösteren bir dizi bulgu translokasyonun esasta ribozomun kendine özgü bir işlevi olduğunu sezindirmektedir.

3.3.4. Terminasyon-Polipeptitlerin Oluşumunun Sonlanması

Olayın tamamlanması ribozomun aminoasil bölgesi karşısına mRNA'nın bitim işareti olarak iş gören kodonların birinin gelmesi ile söz konusu olur. Bu kodonlar sırasıyla UAG, UGA ve UAA'dır. Ribozomlar bu kodonlara geldikleri zaman sonlanma faktörlerinin (Şekil 1) etkisi altında alt birimlerine ayrılır. Sentezi tamamlanmış olan polipeptit zinciri ester bağının kırılması ile kendini taşıyan tRNA

molekülünden, peptidil grubundan yoksun kalan tRNA (deasil-lenmiş tRNA) ise ribozomdan ayrılır.

4. Elongasyon Faktörleri

4.1. Prokaryot Elongasyon Faktörleri

EF-Tu, EF-Ts ve EF-G şeklinde adlandırılan üç elongasyon faktörleri bakteri ribozomları üzerinde polipeptit zincirinin uzamasında görev alır. EF-Tu ve EF-Ts faktörü kısaca EF-T olarak isimlendirilir. Bu faktörler E.coli Bacillus stearothermophilus ve Pseudomonas fluorescens gibi bakteri türlerinden yalıtılmıştır (35).

Bütün bakteri elongasyon faktörleri homojen olarak saflaştırılmış ve kristalleştirilmiştir (35). Bu elongasyon faktörlerinin molekül ağırlıkları farklı yöntemlerle EF-Tu için 39.000-51.000, EF-G için 71.000-85.000 arasında değişen molekül ağırlıkları bulunmuştur (35). EF-Tu, AA-tRNA'yı oluşturduğu EF-Tu.GTP.AA-tRNA üçlü kompleks yoluyla 70 S ribozomuna iletir. Bağlanmadan sonra GTP hidrolizi meydana gelir. EF-Tu.GDP kompleksi ribozomdan ayrılır. EF-Tu doğal koşullarda GTP ile olan ikili komplekste üçlü kompleks oluşturacak yapısal uygunluğa sahiptir (36).

EF-Ts'nin görevi EF-Ts.EF-Tu (=EF-T) ara kompleksi oluşturarak EF-Tu.GDP kompleksinden EF-Tu.GTP kompleksini oluşturmaktadır (37). EF-Ts, EF-Tu.GTP kompleksini veya serbest EF-Tu'dan üçlü kompleksin oluşumunu etkilemez.

EF-G'nin ise GTP ribozom ile birlikte üçlü kompleks oluşturduğu ve üçlü kompleksteki GTP'nin ikinci aşamada GDP ve Pi ye hidrolizlendiği bilinmektedir (38).

4.2. Ökaryotik Elongasyon Faktörleri

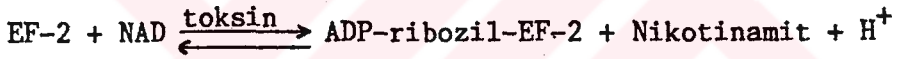
Ökaryotik elongasyon faktörlerinden EF-1'in aktivitesi eEF-Tu (yada EF-1 α) ve eEF-Ts (yada EF-1 β) olarak adlandırılan iki alt faktör tarafından oluşturulur. eEF-Tu'nun molekül ağırlığı 47.000-50.000 dalton olan bir (α) polipeptit zincirinden meydana gelmiştir. eEF-Ts'nin ise molekül ağırlığı 22.000-26.000 dalton arasında bir (γ) polipeptidin dimeri olduğu gösterilmiştir (39). EF-1 EF-1_H (ağır EF-1) yapılarının oluşumuna yol açabilir. EF-1 α prokaryotik EF-Tu gibi A-tRNA'yı ribozoma GTP varlığında bağlar. Aynı zamanda EF-1 ve guanozin nükleotitler arasında kompleksler oluşabilmektedir (40,41). EF-2 ise ökaryotlarda polipeptit zincirlerinin uzamasının translokasyon aşamasında işlev yapan enzimdir. Değişik ökaryotik dokulardan alınan EF-2 tek bir polipeptit zincirinden oluşmuştur. Molekül ağırlığı elde edildiği dokuya göre 65.000-120.000 dalton arasında değişebilir. EF-2 ile EF-G arasında sistein içeriği bakımından fark gösterirler. Sülfidril grupları EF-2'de 22, EF-G'de ise 6'dır (42,43). EF-G'den farklı olarak EF-2 difteri toksini varlığında protein sentez etkinliğini yitirir. EF-2'nin ayrıca RNA'ya bağlandığı ve guanin nükleotitleri ile kalımlı olarak etkileştiği bilinmektedir (44,45,46).

Difteri toksinin NAD molekülünden ADP-riboz grubunun EF-2 ye bağlayarak polipeptit sentezinin durmasına yol açar. Protein sentezinin durmasına yol açan ADP-ribozillenme reaksiyonunun EF-2'nin işlevini ne yönde etkilediği araştırılmaktadır. ADP-ribozillenen EF-2'nin GTP'yi bağlayabildiği ve ribozom.EF-2.GTP kompleksi oluşturabildiği ve kompleste ki GTP'nin daha sonra hidroliz reaksiyonu sonucuparçalandığı bilinmektedir.

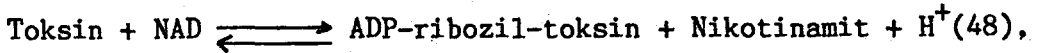
5. EF-2'nin ADP-Ribozillenmesi

62.000 dalton molekül ağırlığına sahip olan difteri toksinin in proteolitik yolla iki fragmente parçalanması ve bu fragmentlerin arasındaki disülfid köprüsünün indirgenmesi ile enzimatik aktivitesi meydana gelir (47). Enzimatik kısım olan fragment A, NAD varlığında EF-2'nin inaktifleşmesine yol açar (47). B fragmentinin ise toksinin hücre membranına bağlanan bölgesine karşılık geldiği varsayılır (47).

Difteri toksinin hücre dışı sistemlerde polipeptit sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Difteri toksini hücre dışı sistemlerde EF-2'ye NAD molekülünün adenzindifosforiboz (ADPR) grubunu kovalent bağlayarak EF-2'yi ADPR-EF-2 molekülüne dönüştürür. Bu durumda EF-2 protein sentez etkinliklerinde katalitik etkinliğini kaybeder (48).



şeklindeki reaksiyon iki aşamalı reaksiyon ile açıklanabilir.



Her EF-2 molekülüne tek bir ADP-riboz grubunun bağlandığı bağlanmanın EF-2 molekülündeki diftamit adı verilen bir histidin türeviden gerçekleştirildiği gösterilmiştir (51,52,53).

6. Tezin Amacı

Hücre metabolizmasının temel olaylarından biri olan protein sentezi henüz ayrıntıları ile aydınlatılmış değildir.

Protein sentezinin mekanizmalarını açıklayabilmek için bu sistemde gerekli öğelerin kolay ve yeter miktarlarda elde edilmesi gereklidir. Bu amaçla, Elongasyon evresinde görev alan elongasyon aktörü 2 (EF-2) nin değişik sıçan dokularından saflaştırılmasının bu dokulardaki protein metabolizmasında ışık tutabileceği düşünülmüş ve değişik dokulardan EF-2 kesimleri hazırlanarak aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Bulunan EF-2 miktarları ve aktiviteleri bu dokulardaki protein sentez etkinliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

II. GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

1.1. Kimyasal Maddeler

Akrilamit (İki kere kristalleştirilmiş) (Merck, Darmstadt)
Adenozin 5'-Trifosfat (Sigma, ST. Louis)
Adenozin 5'-Difosfat (Sigma, St. Louis)
Amfolin (pH---5-8) (IKB, Bronma, İsveç)
Bronfenol mavisi (Merck Darmstadt)
"Coomasie" Parlak mavisi (Brilliant blau) R-250 (Biomol, Ilvesheim)
Difteri toksini (Boehringer, Werke ve Refik Saydam Hıfzısıhha Enst.)
Ditiyotreytol (Calbiochem, Lucerne)
Guanozin 5'difosfat (Boehringer Mannheim)
Guanozin 5'-trifosfat (Boehringer Mannheim)
Kreatin fosfat (Boehringer Mannheim)
Kreatin fosfokinaz (Boehringer Mannheim)
2-Merkaptoetanol (Merck) Darmstadt)
Nikotinamid (Serva, Heidenberg)
Nikotinamid adenin dinükleotit (Serva Heidenberg)
N,N',Metenbisakrilamit (İki kere kristalleştirilmiş) Biomol, Ilvesheim
N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamin (Fluca, Buchs)
PMSF(fenilmetilsulfonilflorid)
Sodyum dodesit sülfat (Biomol Ilvesheim)
Toluen (Merck Dermstadt)
Tripsin (Biomol Ilvesheim)
tRNA(Boehringer Mannheim)
Sukroz, Gliserin, Aseton, Metanol, Etanol, Asetik asit, Triclor asetik asit, Tris, HCl, MgCl₂, NaHCO₃, NaOH, KCl, KOH, NaBH₄, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂, NaCl₂, EDTA gibi tüm maddeler analize uygun saflıkta Merck Darmstandt'dan sağlandı.

1.2. Kromatografik Gereçler

Çalışmalarda kromatografik gereç olarak kullanılan Sephadex G-25, Sephadex G-100 ve DEAE Sephadex A-50 Pharmacia'dan (Stokholm), Diethylaminoetil (DEAE) Sellüloz (DE-52) ve Fosfosellüloz (P-II) Whatman (Meidstom, Kent)'den sağlandı. Hidroksil apatit, Tiselius ve arkadaşları yöntemi ile laboratuarda hazırlandı (54).

1.3. Radyoaktif Gereçler

Nikotinamid ($U-^{14}C$) Adenindinükleotit amonyum tuzu, (spesifik aktivitesi 303 Ci-mol) (Amersham)'dan sağlandı.

1.4. Eriyiklerin Bileşimi

Doku homojenleştirme tamponu(Med A):

5 mM $MgCl_2$

25 mM KCl

50 mM Tris-HCl PH-7.4

7 mM 2-mercaptoetanol

250 mM sukroz

0.2 mM PMSF

Standart Dializ Tamponu (DP):

50 mM tris-HCl pH 7.4

0.1 mM EDTA pH 7.0

7 mM 2-mercaptoetanol

250 mM sukroz

0.1 mM PMSF

Hidroksil apatit Kromatografisi Başlangıç Tamponu
(sol 1):

1 mM K-fosfat pH 6.8

7 mM 2-mercaptoetanol

0.1 mM EDTA

Fosfosellüloz Kromatografisi Başlangıç Tamponu (AP):

50 mM K-fosfat pH 6.8

7 mM 2-mercaptoetanol

0.1 mM EDTA

250 mM sukroz

Elektrofokus için Başlangıç Tamponu:

250 mM tris-HCl pH 7.4

2 mM 2-mercaptoetanol

250 mM sukroz

Anot eriyiği:

0.2 ml H_3PO_4 , 12 gr sukroz, 14 ml H_2O

Katot eriyiği:

0.2 ml etilendiamin, 9.8 ml H_2O

Ağır eriyik:

28 gr sukroz, 1.8 ml amfolin, 30 μ l 2-mercaptoetanol,
42.5 ml EF-2 (DP içinde)

Hafif eriyik:

0.6 ml amfolin, 30 μ l 2-mercaptoetanol, 60 ml EF-2
(DP içinde)

Bir Boyutlu (Laemmlı) PAG Elektroforezi Tamponları:

Ayrırma Geli Çözeltisi:

%15 Akrilamid

%0.15 Bis

125 mM Tris-HCl, pH 8

%0.1 SDS

%0.2 Amonyumpersülfat

%0.03 TEMED

Konsantrasyon Geli Çözeltisi:

%5 Akrilamid

%0.13 Bis

125 mM Tris-HCl, pH 6.8

%0.1 SDS

%0.2 Amonyumpersulfat

%0.03 TEMED

Elektrot Tamponu:

25 mM Tris bazı

250 mM Gliserin

%0.1 SDS

'Coomassie' Boyama Çözeltisi:

%0.25 'Coomassie' Parlak Mavisi

%45 Metanol

%9 Asetik Asit

Boya Çıkartma Çözeltisi:

%10 Asetik Asit

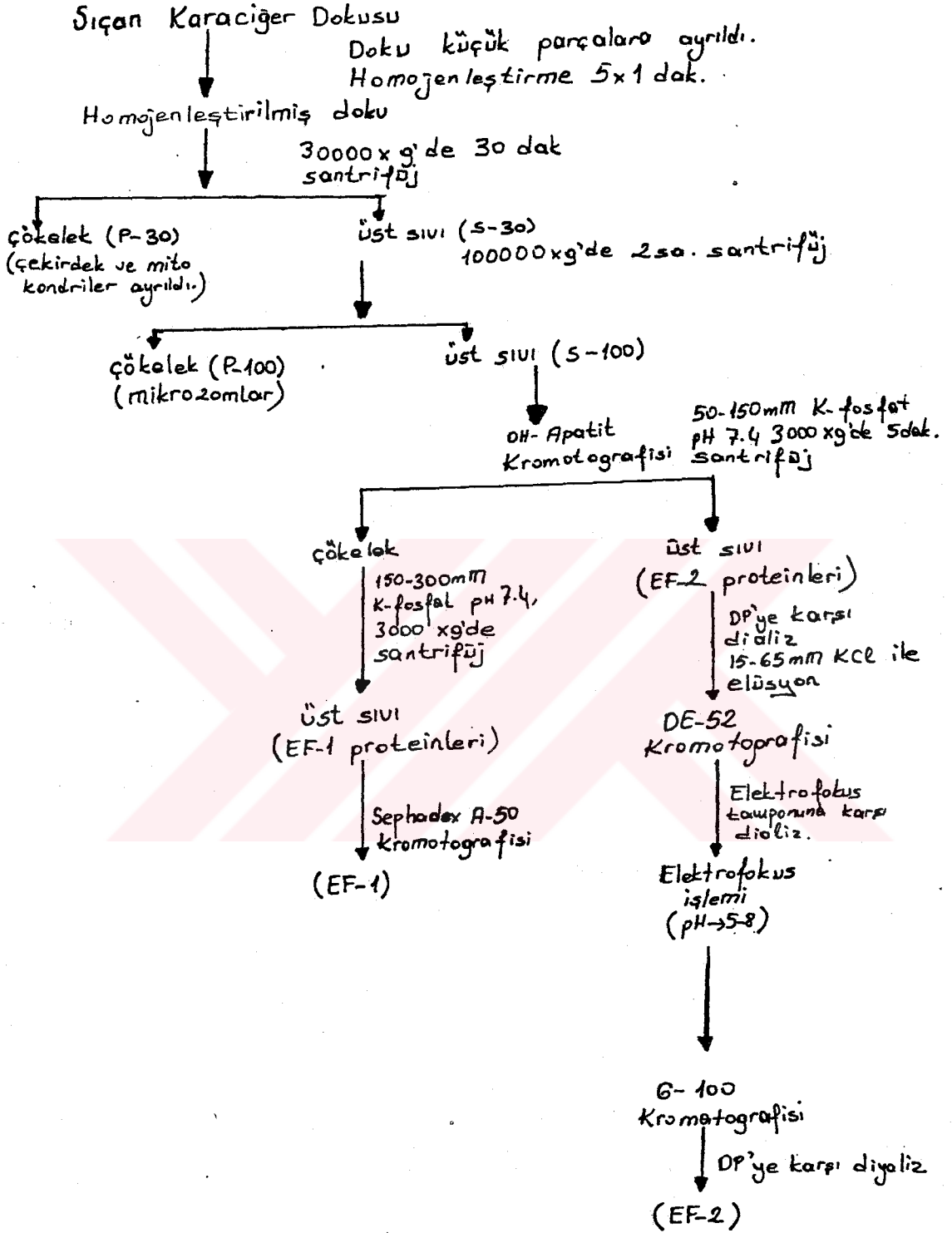
%5 Metanol

2. EF-2'nin Saflaştırılması

EF-2 sıçan karaciğer dokusundan Şekil 3'te gösterilen yol izlenerek saflaştırıldı. Tüm saflaştırma işlemleri 0-4°C ta ve proteinaz inhibitörü PMSF varlığında yürütüldü. Kafaları kesilerek öldürülen sıçanlardan çıkarılan karaciğer dokuları 0°C'deki homojenleştirme tamponu (Med A) içerisine alındı. Med A ile birkaç kez yıkandıktan sonra karaciğer dokuları doku makasları ile kesildi. Daha sonra küçük parçalara ayrılmış doku, üzerine 1:2 (g/ml) olacak şekilde homojenleştirme tamponu eklenerek, Elvehjem Potter homojenleştiricisi ile 700 dev/dak 5 kere homojenize edildi. Elde edilen homojenat daha sonra Sorvall RC-5 santrifüjünde SS-34 tipi rotorla 15.000 dev/dak (30.000 xg) de 30 dak santrifüj edildi. 30 dakika sonunda üst sıvı (S-30) alınarak,

Beckman L5-50 ultrasantrifüjünde titanium-60 tip rotorla 40.000 dev/dak (100.000xg) de santrifüj edildi. S-100 kesimi elde edildi. S-100 kesimi Hidroksil apatit ile karıştırıldı. Düşük devirli santrifüjle çökeltilen Hidroksil apatit, başlangıç tamponu ile karıştırılıp çökeltildi ve bu işlem üst sıvıdaki optik yoğunluk (A_{280}) sıfırlanıncaya kadar tekrarlandı. Hidroksil apatit sırasıyla 10 mM(pH 7.4), 50 mM ve 150 mM K-fosfat ile yıkandı. ADP-ribozillenme yöntemiyle EF-2 içeren kesimler belirlenerek toplandı. Bu kesimler DP'ye karşı gece bouncadializlendi. Dializden alınan örnekler daha sonra DP ile dengelenmiş DEAE-sellüloz (DE-52) kolonuna uygulandı. Kolon sırası ile DP, DP+15, DP+65 ile yıkanarak 1 ml lik kesimler toplandı. Bu kesimlerin A_{280} ve A_{260} değerleri okundu. Yüksek A_{280} veren kesimler ADP ribozilasyon testine tabi tutuldu. Aktivitelerin yüksek olduğu kesimler biraraya getirildi AP'ye karşı diyalizlendi. Daha sonra diyalizden alınan bu kesim AP ile dengelenmiş fosfo-sellüloz (P-11) kolonuna tatbik edildi. Sırasıyla AP, AP+50, AP+250 tamponları ile yıkanan kolondan AP+250 den inen örnekler OD değerlerine bakılarak ADPR ribolizasyon testine tabi tutuldu. Yüksek sayım veren aktif kesimler birleştirilerek DP'ye karşı diyalize verildi. Bu kesimler daha sonra küçük miktarlara bölünerek ileride kullanılmak üzere likit azot'da dondurularak saklandı.

EF-2'nin daha saf bir şekilde elde edilmesi için DEAE-sellüloz kromatografisinden sonra elde edilen aktif kesim P-11 kolonuna verilmeden elektrofokus tamponuna karşı diyaliz edildi. LKB 8100 kolonu kullanılarak yapılan elektrofokus işlemi sonunda elde edilen kesimlerin ADP ribozilasyon testi ile belirlenen aktif kesimler biraraya getirildi. Bu kesimin amfolinlerden arındırılması amacıyla G-100 kolon kromatografisi yapıldı. Böylece saf EF-2 elde edilmiş oldu.



Şekil 3. Sıçan karaciğer, böbrek, akciğer beyin dokularından elongasyon faktör II (EF-2)'nin saflaştırılma aşamaları.

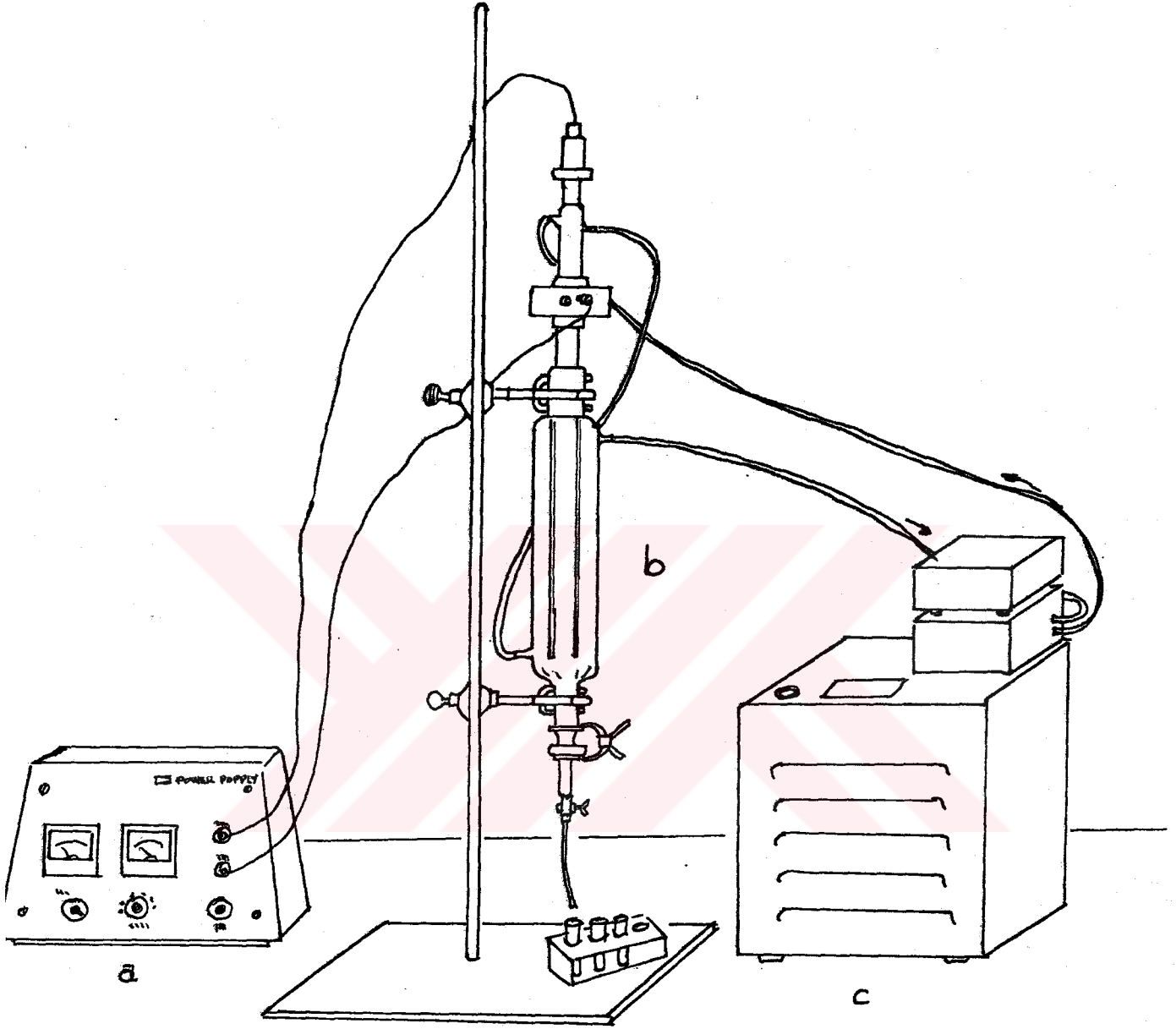
3. Elektrofokus İşlemi

Protein fraksiyonlarının izoelektrofokus işlemi için LKB 8100 kolonu (110 ml) kullanıldı (Resim 1). Önce enzim kesimi 7 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM MET, 250 mM şeker içeren tampona karşı diyaliz edildi. Birgün öncesinden Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklanan ağır, hafif, anot ve katot eriyikleri hazırlandı. Ağır ve hafif eriyikler Tablo 1'de görüldüğü gibi 24 gradyent tüpü içinde biraraya getirildi. Elektrofokus koluna anot eriyiği 1.6 cm yükseklik verecek miktarda konulduktan sonra gradyent tüplerinin içeriği sırasıyla kolona yavaşça akıtılarak tabakalandı. Oluşan bu gradyent üzerine katot eriyiği tabakalandı. 48 saat 4°C'de 2 Watt güçte doğru akım uygulanarak yürütülen elektrofokus işlemi sonucunda 2 ml'lik kesimler kolonun altı açılarak toplandı ve aktivite testine tabi tutuldu. Aktif kesimler biraraya getirildi. Daha sonra bu kesimlerde bulunan amfolinlerden kurtulmak amacıyla G-100 kolon kromatografisi kullanıldı. Tüm işlemler +4°C'de yapıldı.

4. EF-2'nin Elektroforetik Analizi

Çeşitli dokulardan saflaştırılan EF-2'nin analizi sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi ile Laemmli yöntemine göre resim 2'de görülen plak ("slab") gel elektroforezi aleti ile yapıldı (55).

Elektroforez "Slab" (plak) (160 mm x 160 mm x 160mm) gellerinde yürütüldü. Gel plaklarının dökülmesi için ilk önce kalıplar hazırlandı. İki cam levha arasına plastik bantlar konularak üst üste getirildi. Her plastik bant ile cam arasında kalan bölme %2'lik agar geli ile kapatıldı. Daha önceden hazırlanmış %15 akrilamid içeren (pH 8.0) ayırma geli Pastör pipet yardımı ile köpürtülmeden cam kalıplara 11 cm yüksekliğinde döküldü. yüzeye tabaklanan 1 cm yüksekliğindeki su ile düzgün bir gel yüzeyi elde edildi. Gelin polimerleşmesi için bir gün beklendi. Üzerindeki su tabakası



Resim 1. İzoelektrofoküs işlemi için kullanılan düzenek.
a) 2 Watt gücünde elektrik akımını sağlayan güç kaynağı.
b) İzoelektrofoküs işleminin yapıldığı LKB 8100 İzoelektrofoküs cihazı.
c) İzoelektrofoküs işleminin $+4^{\circ}\text{C}$ de yapılmasını sağlayan Kryostat.

Tablo-1. Elektrofokus işleminde basamaklı şeker gradyentinin oluşturulması.

Fraksiyon No	Ağır Çözelti (ml)	Hafif Çözelti (ml)
1	4.6	0
2	4.4	0.2
3	4.2	0.4
4	4.0	0.6
5	3.8	0.8
6	3.6	1.0
7	3.4	1.2
8	3.2	1.4
9	3.0	1.6
10	2.8	1.8
11	2.6	2.0
12	2.4	2.2
13	2.2	2.4
14	2.0	2.6
15	1.8	2.8
16	1.6	3.0
17	1.4	3.2
18	1.2	3.4
19	1.0	3.6
20	0.8	3.8
21	0.6	4.0
22	0.4	4.2
23	0.2	4.4
24	0.0	4.6

filtre kağıdı ile emdirilerek alındı. Polimerleşmiş ayırma geli üzerine %7.5 akrilamit içeren (pH 6.8) derişim gel eriyiği döküldü ve üzerine yine düzgün bir yüzey elde etmek için sutabakalandı. Bu sırada gel plaklarının üzerine örneklerin uygulanacakları kuyuları oluşturmak üzere bir kalıp "tarak" yerleştirildi. 30 dak içerisinde polimerleşmesi beklendi. 30 dak sonunda tarak dikkatle çıkarıldı. Plagın alt kısmındaki plastik bant çıkarıldı. Elektrofrez kabına monte

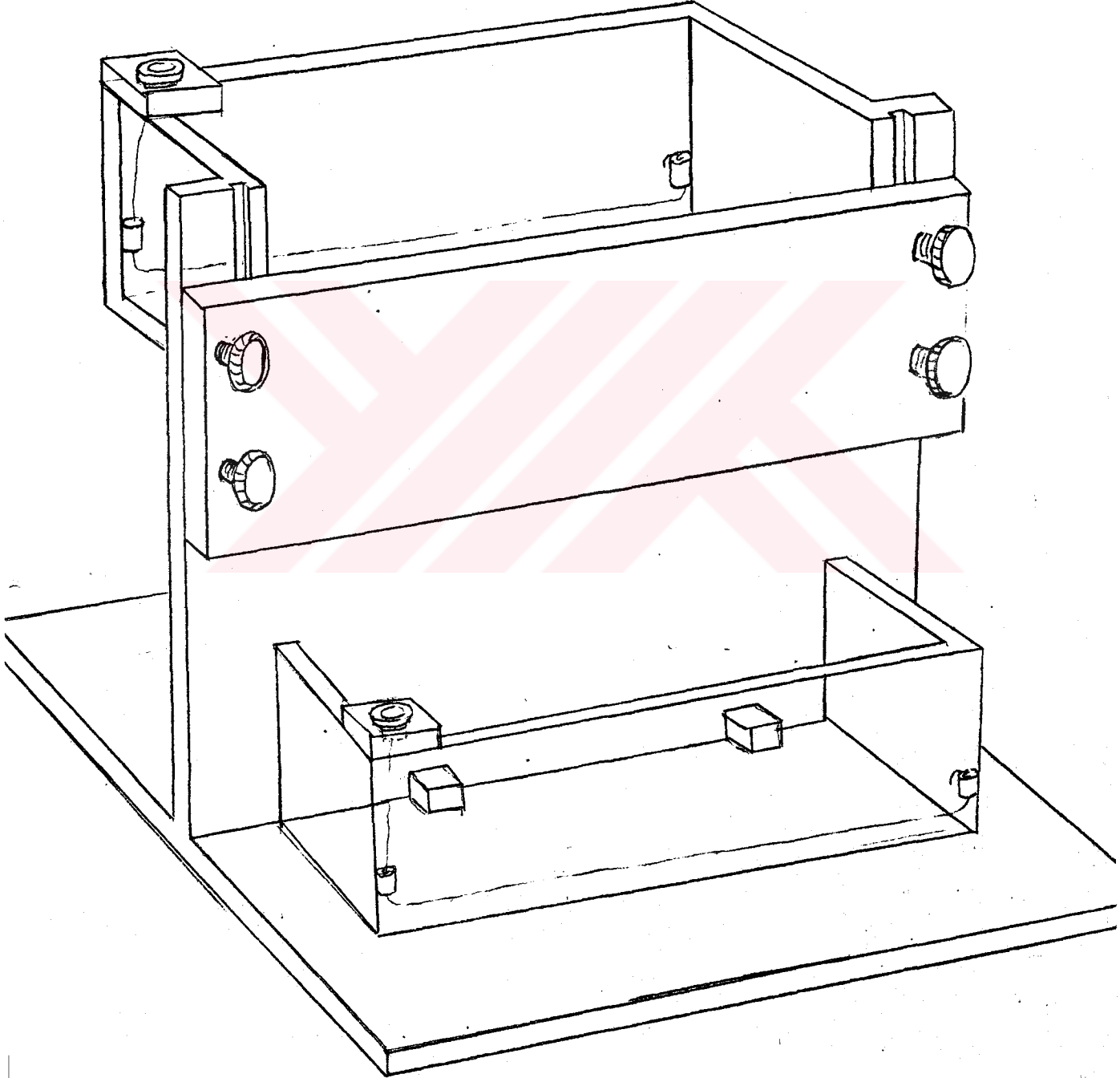
edildi. Protein örnekleri denatürleştirici eriyik (PDB) içine alınarak 90°C da 1 dak bekletildi ve derişim gelindeki kuyulara teker teker konuldu. Aletin alt (anot) ve üst (katot) kapları elektrot tamponu ile dolduruldu. Elektroforez sırasında gel üzerinde gözlenen işaretli boya (BFB) derişim gelini geçerken 20 mA, ayırma gelini geçerken 40 mA uygulandı. BFB boyası gelin alt bölgesine gelinceye kadar elektroforeze devam edildi. En uç noktaya gelindiğinde elektroforez işlemleri durduruldu. Gel plak kalıpları elektroforez kabından çıkartıldı. Plastik bantlar çıkartılarak gelin ortaya çıkması sağlandı. Gel plakları "Coomassie" parlakmavisi çözeltisinde 30 dak süre ile boyandıktan sonra boya çıkarma eriyiğine alınarak boyanın çıkması beklendi. Gelde proteinlerin olduğu bölgeler koyumavi bantlar olarak gözlemlendi.

5. EF-2'nin Difteri Toksini Varlığında ADP-Fibozillenmesi

EF-2'nin miktarı difteri toksinine bağlı ADP-ribozillenme yoluyla ölçüldü. EF-2 2 μ M(¹⁴C) NAD ve 2 μ gr difteri toksini varlığında 20°C'da 15 dak süre ile inkübe edildi. ADP-ribozillenen EF-2 (ADPR-EF-2) miktarının belirlenmesi için tepkime karışımlarından alınan belli bir miktarda olan örnek Whatman GF-C filtresine emdirildi. 0°C'ta %10TCA içindeki Teflon sepet içine konarak reaksiyon durduruldu. Örnek TCA içersinde filtre kağıdı içersinde çöktürüldü. Daha sonra sırasıyla %5 lik TCA ve etanolde birer dak yıkandı. Proteine bağlanmamış substrat uzaklaştırıldı. Filtreler kurutuldu içerdikleri radyoaktivite miktarları saptandı.

6. EF-2'nin Difteri Toksini Yoğkluğunda ADP-ribozillenmesi

EF-2 nin difteri toksini yokluğunda ADP-ribozillenmesi için EF-2, 2 μ M(¹⁴C) NAD varlığında 37°C'de yarım saat, 1 saat, 2 saat inkübe edildi. ADP-ribozillenen EF-2 miktarını belirlemek için tepkime reaksiyonlarından belli miktarlarda örnekler alınarak Whatman GF/C filtrelerine yayıldı. Yukarıdaki bölümde anlatıldığı gibi 0°C'da %10TCA'da



Resim 2 : 2 Boyutlu poliakrilamid gel elektroforez cihazı.

reaksiyon durduruldu. Sırasıyla %5'lik TCA ve etanolde birer dak yıkandıktan sonra filtreler kurutulularak içerdikleri radyoaktivite miktarı saptandı.

7. Radyoaktivitenin Ölçülmesi

Kurutulmuş aynı zamanda radyoaktif örnekleri taşıyan Whatman GF/C filtreler cam ölçüm şişelerine konuldu. Her bir şişeye 2 ml sintilasyon sıvısı (toluol içinde %0.4 2.5 difeniloksazol) konuldu. İçerdikleri radyoaktivite miktarları Packard-Tricarb sıvı sintilasyon spektrometresinde saptandı. (^{14}C) için sayım verimi %303 olarak saptandı.

Cpm (=dakikadaki sayım) in pmol'a çevrilmesi için,

$$\text{pmol} = \frac{\text{cpm} \times 100}{2.22 \times \text{Sayım verimi} \times \text{Spesifik Aktivite}(\text{Ci/mol})}$$

bu formül kullanıldı.

8. Protein Tayini

Protein miktarları Lowry yöntemine göre saptandı (56). Çeşitli dokulardan elde edilen EF-2 kesimlerin protein analizleri Lowry yöntemine göre yapıldı. Standart eğriyi elde etmek için 9 örnek içine artan bilinen miktarlarda BSA diğer örneklerle protein içeriği belirlenecek EF-2 kesimleri konuldu. Bütün tüpler su ile 90 µl hacime tamamlandı. Daha sonra tüplere sırasıyla 2 N NaOH'dan 50 µl ve %100 TCA'dan 10 µl ilave edildi. 30 dak 37°C ta inkübasyondan sonra %2 Na_2CO_3 , %1 CuSO_4 , %2 K-NaTartarat içeren (sol 2) den 1 ml eklendi. 10 dak 20°C'da inkübe edildi. Daha sonra 1:1 sulandırılmış Folin Reagent'inden 100 µl eklenerek sırasıyla 30 dak 37°C'da 5 dak 4°C'da bekletildi (sol 3). Bundan sonra 750 nm'deki absorpsiyon değerleri (A_{750}) okundu. A_{750} değerleri karşılıkları protein miktarlarının bir işlevi olarak

veren standart doğru çizildi. Bu doğrudan yararlanarak protein miktarı bilinmeyen kesimlerin okunan A_{750} değerlerine karşılık gelen protein miktarları saptandı.



III BULGULAR

1. Değişik dokularda EF-2'nin eldesi

1.1. Sıçan Karaciğerinden EF-2'nin eldesi

Sıçan karaciğerinden Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde her saflaştırma sürecinde elde edilen EF-2 kesimlerine ilişkin değerler Tablo 2 ve 3'de verilmektedir. Her seferinde 6 sıçan karaciğer dokusundan (25gr) başlanarak iki ayrı saflaştırma sonucunda EF-2 elde edilmiştir. Birinci saflaştırmada OH-apatit kesimine kıyasla 55,3 kat saflaştırma gerçekleştirilmiş ve toplam 7nmol EF-2 elde edilmiştir.

İkinci saflaştırmada gene OH-apatit kesimine kıyasla saflaştırma gerçekleştirilmiş ve toplam 6,6 nmol EF-2 elde edilmiştir.

Kesim	Protein Derişimi (mg/ml.)	Hacim (ml.)	Toplam Protein (mg.)	EF-2 miktarı (pmol/mg.)	Toplam EF-2 (pmol)	Kesimdeki nisbi EF-2 miktarı (%)	EF-2 Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
S-100	38	75	2850	—	—	—	—	—
OH-Rpatit	1.5	150	225	153	34625	1.5	1	100
DE-52	0.15	56	8.4	2637	22151	26	17.3	63
P-11	—	—	—	—	—	—	—	—
Elektrofokus	0.12	7	0.84	8333	7000	83	55.3	20

Tablo 2

Tablo 2. Sıçan Karaciğerinden EF-2 eldesi (L. Saflaştırma)

* 10 pmol=1mg.

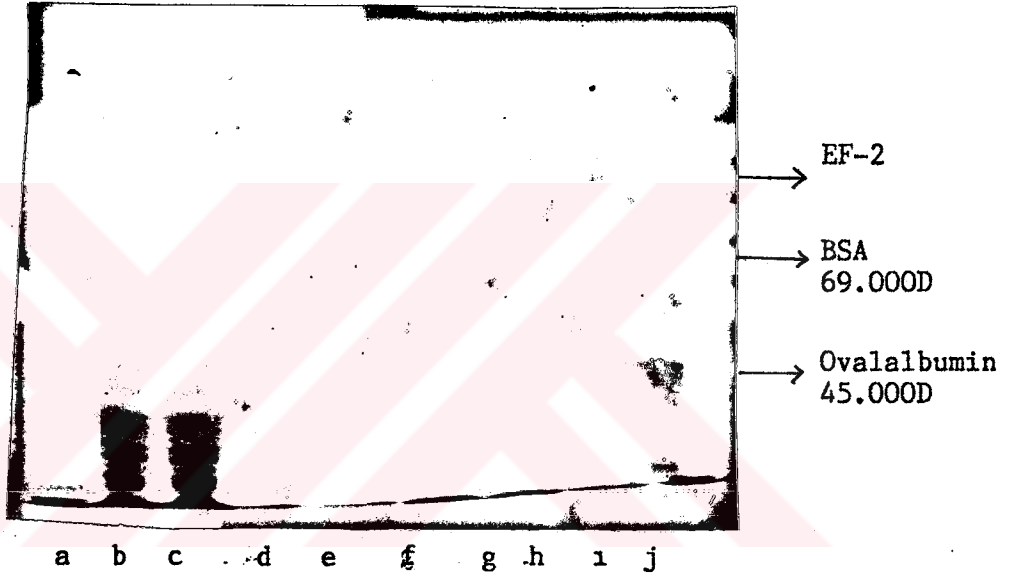
Kesimdeki nisbi EF-2 miktarı, Toplam EF-2 miktarını, toplam protein miktarına oranlamak suretiyle hesaplanmıştır.

Kesim	Protein Derişimi (mg/ml)	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	EF-2 miktarı (pmol/mg)	Toplam EF-2 (pmol)	Kesimdeki nisbi EF-2 miktarı (%)	EF-2 Saflaştırma Katsayısı	Uerim (%)
S-100	38	85	3230	—	—	—	—	—
OH-Apatit	1.5	145	217.5	114.94	25.000	1,14	1	100
DE-52	0.25	32	8	1950	15600	19.5	17.1	62
P-11	—	—	—	—	—	—	—	—
Elektrofokus	0.11	8	0.88	7500	6600	75	65	26

Tablo 3. Sıçan Karaciğerinden EF-2 eldesi (2. Saflaştırma)

1.2. Sıçan Karaciğer Dokusundan Elde Edilen EF-2'nin Elektroforetik Analizi

Preparasyon sırasında EF-2'nin değişik aşamalar sonrası elde edilen kesimleri Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde elektroforeze tabii tutuldu. Bu kesimler Şekil 4'de c,e,g,ı'da görülmektedir.



Şekil-4. Sıçan böbrek ve karaciğerinden elde edilen değişik EF-2 içeren kesimlerin sodyumdodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi ile incelenmesi. a) Standartlar. b) S-100 kesimi (böbrek). c) S-100 kesimi (karaciğer). d) DE-52 kolonundan 65 mmKCl ile indirilmiş kesim (böbrek). e) DE-52 kolonundan 65 mm KCl ile indirilmiş kesim (karaciğer). f) Hidroksil apatit sonrası dializlenmiş kesim (böbrek). g) Hidroksil apatit sonrası dializlenmiş kesim (karaciğer). h) P-11 kolonundan AP+250 ile indirilmiş EF-2 kesimi (böbrek). ı) Elektrofokusdan sonra G-100 kolonundan DP ile indirilmiş ve konsantre edilmiş EF-2 kesimi (karaciğer). j) Standartlar.

Bu elektroforezde kullanılan standartların molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 45.000 D.Ovalalbumin ve 69.000 D. B.S.A. (Bovine serum Albumin) dir.

Şekildeki verilerden EF-2'nin molekül ağırlığı 90.000 Dalton olarak hesaplanmıştır. Ayrıca sıçan karaciğer EF-2'sinin elektrofokus işlemi ve G-100 kolon kromatografisinden sonra büyük oranda (>90%) sağlanmış olduğu belirlenmiştir.

1.3. Sıçan Böbreğinden EF-2'nin Eldesi

Sıçan böbreğinden saflaştırma aşamalarından sonra elde edilen EF-2 değerleri Tablo 4 ve 5'de topluca verilmiştir. Tablo 4 ve 5'de görüldüğü gibi 6 sıçan böbrek dokusundan (9 gr.) birinci saflaştırma sonunda 2 nmol EF-2 elde edilmiştir. 50 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

İkinci saflaştırma sonucunda 76 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Total olarak 2.7 nmol EF-2 elde edilmiştir. Her iki saflaştırmada OH-Apatit kesimine kıyasla gerçekleştirilmiştir.

1.4. Sıçan Böbrek Dokusundan Elde edilen EF-2 Kesimlerinin Elektroforetik Analizi

Preparasyon sürecinde saflaştırma çalışmaları sonrası elde edilen sıçan böbrek EF-2'si Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı üzere elektroforeze tabii tutuldu. Bu kesimler Şekil 4'de b,d,f,h da görülmektedir.

Preparasyonun son aşamasını oluşturan P-11 kolon kromatografisinden sonra elde edilen EF-2 kesiminde molekül ağırlıkları 85.000 ve 53.000 olarak hesaplanan iki bant görülmektedir.

Kesim	Protein Derişimi (mg/ml.)	Hacim (ml.)	Toplam Protein (mg.)	EF-2 miktarı (pmol/mg.)	Toplam EF-2 (pmol)	Kesimdeki nisbi EF-2 miktarı (%)	EF-2 Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
S-100	17	22	374	—	—	—	—	—
OH-Apatit	0.7	75	52.5	110	5790	1.1	1	100
OE-52	0.32	4	1.28	2109	2700	21	19	46
P-11	0.12	3	0.36	5555	2000	55	50	34

Tablo 4

Tablo 4. Sıçan böbreği EF-2'sinin eldesi (1. Saflaştırma)

Kesim	Protein Derişimi (mg/ml)	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	EF-2 miktarı (pmol/mg)	Toplam EF-2 (pmol)	Kesimdeki nisbi EF-2 miktarı (%)	EF-2'nin saf. Kat. sayısı	Uerim (%)
S-100	18	25	450	—	—	—	—	—
OH-Apatit	0.8	70	56	89.1	4990	0.8	1	100
DE-52	0.29	5	1.45	2068	3000	20	25	60
P-11	0.11	4	0.44	6136	2700	61	76	54

Tablo 5

Tablo 5. Sıcan böbreği EF-2'sinin eldesi (2. safloştırma)

Kesim	Protein Derişimi (mg/ml)	Hacim (ml.)	Toplam Protein (mg.)	EF-2 miktarı (pmol/mg.)	Toplam EF-2 (pmol)	Kesimdeki EF-2 miktarı (%)	EF-2 Saf. Kat. sayıs.	Verim (%)
S-100	2.8	24	67.2	—	—	—	—	—
OH - Apatit	0.2	100	20	83.5	1670	0.83	1	100
DE-52	0.18	3	0.54	1611	870	16.1	19	52
P-11	—	—	—	—	—	—	—	—

Tablo 6

Tablo 6. Sıçan akciğerinden elde edilen EF-2'nin saflos-tırma değerleri.

1.5. Sıçan Akciğer Dokusundan EF-2'nin Eldesi

Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı üzere sıçan akciğerinden elde edilen EF-2'nin değişik aşamalardaki saflaştırma değerleri Tablo 6'da verilmektedir. 6 sıçan akciğer dokusundan (9 gr.) başlanarak bu saflaştırma süreci sonucunda 19 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. 6 sıçan kullanılarak toplam 0.8 nmol EF-2 elde edilmiştir. Tablo 6'da görüldüğü gibi materyalin azlığı dolayısıyla P-11 kolon kromatografisi uygulaması akciğer dokusu için yapılamamıştır.

1.6. Sıçan Akciğer Dokusundan Elde Edilen EF-2 Kesimlerinin Elektroforetik Analizi

Preparasyon sırasında elde edilen EF-2'nin değişik aşamalar sonrası elde edilen kesimleri Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde elektroforeze tabii tutuldu. Bu kesimler Şekil 5'de a,d,e,f de görülmektedir.



Şekil-5. Sıçan beyin ve akciğerinden elde edilen değişik EF-2 içeren kesimlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforeziyle incelenmesi.

- a) Standartlar (Albumin egg 45.000 D, BSA 69.000 D)
- b) S-100 kesimi (beyin)
- c) Hidroksil apqtit sonrası dializlenmiş kesim (beyin)
- d) Hidroksil apqtit sonrası dializlenmiş kesim (Akciğer)
- e) DE-52 kolonundan 65 mM KCl ile indirilmiş kesim (Akciğer)
- f) S-100 kesimi (Akciğer)

1.7. Sıçan Beyin Dokusundan EF-2'nin Eldesi

Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı üzere sıçan beyin dokusundan elde edilen EF-2'nin değişik aşamalardaki saflaştırma değerleri Tablo-7'de verilmektedir. 6 sıçan beyin dokusundan (10 gr.) başlanarak bu saflaştırma süreci sonunda (OH-Apatit aşamasında) %0.63'lük bir saflaştırma verimine ulaşılmıştır (EF-2 miktarı % si).

10 gr. 6 sıçan beyin dokusundan tablo 7'de görüldüğü gibi saf kesim elde edilememiştir. Karaciğer, böbrek dokularına nazaran çok az bir aktivite burada görülmüştür. Beyin üzerine yapılan preparasyon denemeleri sonucunda birbirine benzer değerler elde edilmiştir.

1.8. Sıçan Beyin Dokusundan Elde Edilen EF-2'nin Elektroforetik Analizi

Preparasyon sürecinde saflaştırma aşamaları sonrası elde edilen sıçan beyin EF-2'si Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı üzere elektroforeze tabii tutuldu. Bu kesimler Şekil 5'de a,b,c'de görülmektedir.

Şekil 5'te de görüldüğü üzere EF-2, beyin dokusundan muhtemelen bu dokunun özelliklerine bağlı olarak yetersiz ölçüde elde edilmiştir.

Kesim	Protein Derişimi (mg/ml)	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	EF-2 miktarı (pmol/mg)	Toplam EF-2 (pmol)	Kesimdeki nisbi EF-2 miktarı (%)	EF-2 saf. kat. sayısı.	Verim (%)
S-100	0.7	18	12.6	—	—	—	—	—
OH-Apatit	0.2	55	11	63.6	700	0.63	1	100
DE-52	—	—	—	—	—	—	—	—
P-11	—	—	—	—	—	—	—	—

Tablo 7

Tablo 7. Sıran beyin dokusundan elde edilen EF-2'nin saflaştırma değerleri:

IV. TARTIŞMA

Sıçan karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin dokularından EF-2 eldesi için uygulanan saflaştırma yöntemleri sonucunda değişik aşamalardaki protein derişimleri, toplam protein miktarı, EF-2 miktarı, saflaştırma katsayısı ve verim değerleri saptanmıştır.

Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı üzere EF-2 miktarını belirlemek amacıyla uygulanan ADP-ribozillenme testinin değerleri S-100 aşamasında daha sonraki kesimlere kıyasla orantısız ölçüde ve düşük bulunmuştur. Bu nedenle bununla ilgili değerler tablolara alınmamıştır. EF-2 miktarı ile ilgili değerlendirme OH-Apatit kesiminden itibaren yapılmıştır. ADP-ribozillenme testinin sonucunda elde edilen düşük değerler S-100 de bulunabilecek ve ADP-ribozillenmeyi baskılayan bir inhibitör etkiden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

EF-2 saflaştırma katsayısına göre karaciğer, böbrek, akciğer, beyin dokularının karşılaştırılmasında karaciğer dokusunun 55.3 ve 65'lik değerleri, böbrekte 50 ve 76, akciğerde 19 olarak belirlenirken beyinde bu dokudaki EF-2 miktarının azlığı nedeniyle benzer bir değerlendirme yapılamamıştır.

Ayrıca başlangıç doku miktarına göre elde edilen EF-2 miktarlarının karşılaştırılmasında saflaştırma sürecinin son aşaması olan elektrofokus işlemi sonucunda 1 gr. karaciğer dokusundan 0.28 pmol EF-2 elde edilirken bu değer

böbrek dokusu için P-11 aşamasından sonra 0.3, akciğer dokusu için DE-52 aşamasından sonra 0.1, beyin için ise OH-Apatit aşamasından sonra 0.07 olarak belirlenmiştir. Bu değerlendirmeden de anlaşılacağı gibiancak karaciğer dokusu ile saflaştırma sürecinin son aşamasına kadar gidilebilmiştir.

Ayrıca saflaşmayı toplam EF-2 miktarına göre değerlendirdiğimizde iki sıçandan elde edilen karaciğer dokusu ile elektrofokus aşamasına kadar gelinerek toplam 7 nmol EF-2 elde edilirken, böbrek ile P-11 aşamasına kadar 2.7 nmol, akciğer ile DE-52 aşamasına kadar gelinerek 0.87 nmol, beyin ile ise OH-Apatit aşamasından sonra ancak 0.7 nmol EF-2 elde edilmiştir. Bu değerlendirmeye göre de en fazla verim sıçan karaciğer dokusundan elde edilmiştir. Bütün bunlara göre verim ve saflaştırma etkinliği açısından sıçan karaciğer dokusu ile çalışmanın üstünlüğü ortaya çıkmaktadır.

Sıçan karaciğerinden elde edilen EF-2 elektrofokus daha sonra ise G-100 kolon kromatografisi işlemine tabi tutulmuştur. Bu EF-2'yi PAGE Laemli yöntemi ile elektroforez yaptığımızda büyük oranda saflaşmış (%90) tek bir band şeklinde görülmüştür. Bu Band 94.000 D. tekabül eder. Sıçan böbreğinden elde edilen EF-2 P-11 işleminden sonra PAGE Laemli yöntemi ile elektroforez yaptığımızda, karaciğere nazaran daha az saflıkta (%90) tek bir band şeklinde görülmüştür. Bu bandın moleküler ağırlığınının 80.000 D.'na tekabül ettiği görülmüştür. Sıçan böbreğinden elde edilen EF-2 P-11 işleminden sonra PAGE Laemli yöntemi ile elektroforez yaptığımızda karaciğere nazaran daha az saflıkta ve natif EF-2'nin moleküler ağırlığından daha düşüktür. Saflaşma açısından böbrek EF-2 sinin elektroforetik analizinde de minor bandın yanında moleküler ağırlıkları 85.000 ve 53.000 olan iki ana bant bulunmuştur. Böbrek EF-2 sinin muhtemelen proteolitik bir etkiye maruz kaldığı görülmüştür.

Bütün bu değerlendirmelere göre de sıçan karaciğer dokusunda EF-2 eldesinin her bakımında verimli olabileceği sonucuna varılmıştır.

V. ÖZET

Karaciğer, böbrek, akciğer, beyin gibi değişik sıçan dokularından EF-2 saflaştırıldı. Her doku için homojenleştirme, santrifüj, OH-apatit, DEAE sellüloz, fosfosellüloz kolon kromatografileri ve elektrofokus gibi aynı yöntemler uygulandı. Bütün bu aşamalar sonucunda sıçan karaciğeri ve böbreğinden EF-2 saf olarak elde edildi. Ancak sıçan karaciğeri verimlilik ve saflık açısından diğer dokulara göre daha üstün bulundu. Sıçan karaciğer EF-2'sinin elektrofokus işlemi ve G-100 kolon kromatografisinden sonra büyük oranda (yaklaşık %90) saflaşmış olduğu belirlendi. Akciğer dokusu ile ancak DEAE sellüloz kromatografisi aşamasına kadar gelinebildi. Bu dokuda verim oldukça düşüktü. Beyin dokusunda ise EF-2 miktarı akciğerden de daha düşük bulundu. OH-apatit ile kesimlemeden sonra işleme devam edilemedi.

Bütün bu bulgulardan sonra EF-2'nin en saf ve en yüksek verimle, protein sentez etkinliği en yüksek olduğu sıçan karaciğer dokusundan elde edilebileceği sonucuna varıldı.

S U M M A R Y

EF-2 is tried to be purified from the liver, kidney lung and brain tissues of rats. Each specimen is processed by homogenization, centrifugation, OH-apatite, DEAE cellulose and phosphocellulose column chromatographies and electrofocusing respectively. After all these procedures, EF-2 had been purified only from the tissues of the liver and the kidney. The productivity and purity of EF-2 was found better when rat liver had been used. After electrofocusing and G-100 column chromatography we isolated very pure (%90) EF-2 from rat liver. With the lung specimen the procedures were stopped at the DEAE cellulose chromatography stage because the EF-2 yield was low. In the brain tissue the amount of EF-2 was found to be lower than the lung tissue. So we couldn't continue after the OH-apatite chromatography.

After these results we concluded that EF-2 can be isolated in the highest yield and in the purest form from the rat liver where most of the protein synthesis takes place.

K A Y N A K L A R

1. Jakob, F. and Monod, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J.Mol.Biol.* 3-318-356(1961)
2. Brenner, S., Jakob, F. and Meselson, M.: An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature.* 190: 576-581 (1961)
3. Berger, S.L. and Cooper, H.L.: Very short-lived and stable mRNAs from resting human lymphocytes. *Proc.Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 3873-3877 (1975)
4. Crick, F.H.C.: On protein synthesis in the biological replication of macromolecules. *Sym. Soc. Exp. Biol.* 12: 138 (1958)
5. Chapeville, F., Lipmann, F., von Ehrenstein G., Weisblum, R., Ray, W.J. and Benzer, S.: On the role of soluble RNA in coding for amino acids. *proc. Nat. Acad. Sci.* 48: 1086-1090 (1962)
6. RajBhandary, U.L., Chang, S.H., Stuart, A., Faulkner, D.D., Hoskinson, R.M. and Khorana, H.G.: Studies on polynucleotides LXVIII. The primary structure of yeast phenylalanine transfer RNA *Proc.Nat. Acad. Sci. U.S.* 57:751-758 (1967)
7. Suddaht, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Snedden, D., Kim, J.J., Kim, S.H. and Rich, D.: Three dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 3.0 Å⁰ resolution. *Science* 248: 20-24 (1960)
8. Zamecnik, P.C.: Protein Synthesis Harvey Lect. 54: 256 (1960)
9. Hoagland, M.B., Keller, E.B. and Zamecnik, P.C.: Enzymatic carboxylactivation of amino acids. *J.Biol.Chem.* 218: 345-351 (1956)

10. Kurland, L.G.: Structure and function of bacterial ribosome. *Ann. Rev. Biochem.* 11: 377-408 (1972)
11. Brimacombe, R., Stoffler, G. and Wittmann, H.: Ribosome Structure. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 217-249 (1978)
12. Both, G.W., Furuiche, Y., Muthokrishnan, S. and Shatkin, A.S.: Effect of 5' Terminal Structure and Base Composition on Polynucleotide Binding to Ribosomes. *J.Mol. Biol.*, 104, 637-642 (1976).
13. Monro, R.E.: Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from E.coli. *J.Mol. Biol.* 26: 147-151 (1967)
14. Lucas-Lenard, J. and Lipmann, F.: Protein biosynthesis. *Ann.Rev.Biochem.* 10: 409-448 (1971)
15. Spirin, A.S. and Gavrilo, L.P.: The Ribosome. Springer, Berlin. Heidelberg, New York (1969)
16. Wool, I.G.: The Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes. *Ann.Re.Biochem.* 48, 719-754 (1979)
17. Üçer, U.: Dissertasyon, Georg-August-Universitesi, Göttingen, (1976)
18. Kurland, C.G.: Structure and function of the bacterial ribosomes. *Ann.Rev. Biochem.* 410: 377-408 (1972)
19. Sherton, C.C. and Wool, I.G.: Determination of the number of proteins in liver ribosomes and ribosomal subunits by two-dimensional polyacrylamide gelelectrophoresis. *J.Biol.Chem.* 247: 4460-4467 (1972)
20. Üçer, U. and Bermek, E.: Separation of the proteins in human tonsiler cytoplasmic ribosomes by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur.J.Biochem.* 50: 183-189 (1974)
21. Nierhaus, K.H., Rheinberger, H.J.: An alternative model for the elongation cycle of protein hiosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 9: 428-432 (1984)

22. Rheinberger, H.j., Schilling, S., Nierhaus, K.H.: The ribosomal elongation cycle: tRNA binding, translocation and tRNA release. *Eur.J.Biochem.* 134: 421-428 (1983)
23. Zamacnik, P.C.: Protein Synthesis Harvey Lect. 54:256 (1960)
24. Hoagland, M.B., Keller, E.B. and Zamecnik, P.C.: Enzymatic carboxylactivation of amino acids. *J.Biol. Chem.* 218: 345-351 (1956).
25. Lipmann, F.: Polypeptide chain elongation in protein biosynthesis. *Science* 164: 1024-1031 (1969)
26. Both, G.W., Furuichi, Y., Muthokrishnan, S. and Shetkin, A.J.: Effect of 5' terminal structure and base composition on polynucleotide binding to ribosomes. *J.Mol.Biol.* 104: 637-642 (1976)
27. Brot, N., Radfield, B. and Weissbach, H.: Studies on the reaction of the AA-tRNA.EF-Tu.GTP complex with ribosomal subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1388-1395 (1970)
28. Lucas-Lenard, J., Tao, P. and Haenni, A.: Further studies on bacterial polypeptide elongation. *Cold. Spring Harb. Symp.Quant.Biol.* 34: 455-462 (1969)
29. Skoultchi, A., Ono, Y. Waterson, J. and Lagyel, P.: Peptide chain elongation. *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 34:437-454 (1969)
30. Weisbach, H., Radfield, B., Moon, H.M.: Interactions of elongation factor-1 from animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 156:267-275 (1973)
31. Miller, D.L., Weisbach, H.: Aminoacyl-tRNA transfer factor. "Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis" (Eds:Weissbach,H., Pestka,S.), Academic Press (1977)
32. Monro, R.E.: Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from *Escherichia Coli*. *J.Mol.Biol.* 26:147-152 (1967)

33. Nierhaus, K.H., Schulze, H., Cooperman, B.S.: Molecular mechanisms of the ribosomal peptidyltransferase center. *Biochem. Int.* 1: 185-192 (1980)
34. Spirin, A.S.: Ribosomal translocation: Facts and models. *Acad. Sci. USSR. Ins. Prot. Res.* 1-40 Pushchino (1983).
35. Lucas-Lenard, J. and Beres, L.: Protein biosynthesis-peptide chain elongation. *The Enzymes* 10:53-86 (1974)
36. Ravel, J.M., Shorey, R.L., Froehner, S. and Shive, W.: A study of the enzymic transfer of aminoacyl RNA to E.coli ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 514-526 (1968)
37. Miller, D.L. and Weisbach, H.: An interaction between the transfer factors required for protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 132: 146-150 (1969)
38. Nishizuka, Y. and Lipmann, F.: The interrelationship between guanosine triphosphate and amino acid polymerization. *Arch. Biochem. Biophys.* 116: 344-350 (1966)
39. Grasmuk, H. Nolan, R.D. Drews, J.: The isolation and characterization of elongation factor eEF-TS from Krebs. II Mouse-Ascites Tumor Cells and its role in the elongation process. *Eur.J.Biochem.* 92: 479-490 (1978)
40. Moon, H.M. and Weisbach, H.: Interaction of brain transferase I with guanosine nucleotides and aminoacyl-tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 254-262 (1972)
41. Moon, H., Redfield, B. and Weisbach, H.: Interaction of eukaryote elongation factor EF-1 with guanosine nucleotides and aminoacyl-tRNA. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.* 69-1249-1252 (1972)
42. Arai, K.I., Kawakita, M., Kaziro, Y., Maeda, T., Ohnishi, S.: Conformational transition in polypeptide elongation factor Tu as revealed by electron spin resonance. *J.Biol.Chem.* 249: 3311-3315 (1974)

43. Eokstein, F., Burns, W., Parmegianni, A.: Synthesis of guanosine 5'-di and triphosphate derivatives with modified terminal phosphatase. Effect on ribosome-elongation factor G-depended reactions. *Biochemistry* 14:5225-5232 (1975)
44. Sipirin, A.S., Ovchinnikov, L.P.: RNA-binding proteins involved in realization of genetic information in eucaryotic cells. *Folia Biol. (Praha)* 29:115-139 (1983)
45. Bodley, J.W., Lin, L., Salas, M., Tao, M.: Studies on translocation. V. Fusidic acid stabilization of a eucaryotik ribosome-translocation factor. GDP complex. *FEBS Lett.* 11:153-156 (1970)
46. Girschovich, A.S., Pozdynekov, V.A., Ovchinnikov, Y.A.: Localization of the GTP bindingsite in the ribosome elongation factor G-GTP complex. *Eur.J.Biochem.* 69:321-328 (1976)
47. Collier, R.j.: Diphteria toxin mode of action and structure. *Bact. Rev.* 39: 54-85 (1975)
48. Book, K.W., Gang, V., Beer, H.P., Kronaw, r., and Grunicke, H. *Eur. J. Biochem.* 4. 357 (1968)
49. Bonventre, P.F., and Imhoff, J.G., *J. Exp. Med.* 124, 1107 (1966)
50. Bonventre, P.f., and Imhoff, J.g., *J. Exp.Med.* 126, 1079 (1967)
51. Goor, R.S., and Maxwell, E.S., *J. Biol. Chem.* 245, 616 (1970)
52. Honjo, T., Nishizuka, O., Hayaishi and Kato, I.: Diphteria toxin depended adenosine diphosphat ribozylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J.Biol.Chem.* 243: 3553-3555 (1968)
53. Van Ness, B.G., Barrowclough, B., Bodley, j.W.: Recognition of elongation factor by diphteria toxin is not solely defined by the presence of diphtamide. *FEBS Lett.* 120: 4-6 (1980)

54. Tiselius, A., Hjertin, S., Levin, O.: Protein chromatography on Ca-phosphat columns. Arch. Biochem. Biophys. 65:132-155 (1956)
55. Laemmli, U.K.: Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)

K I S A L T M A L A R

A	Absorbsiyon
AA-tRNA	Aminoasil-transfer ribonükleik asit
ADP	Adenozin difosfat
ADPR	Adenozin difosfat riboz
ADPR-EF-2	Adenozin difosfat riboz taşıyan EF-2
AMP	adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
cpm	Sayım/dak
dak	Dakika
DEAE-Sellüloz	Dietil aminoetil sellüloz
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
g	Yerçekim ivmesi
GMP	Guanozin monofosfat
GTP	Guanozin trifosfat
GDP	Guanozin difosfat
mRNA	Haberçi (messenger) ribonükleik asit
MET	2-Merkaptoetanol
NAD	Nikotinamid --adenin-dinükleotit
OH-apatit	Hidroksil apatit
PoliPhe	Yalnız felilalanil içeren bir polipeptit
PMSF	Fenilmetilsulfonilflorit
PPO	2.5-difenil oksazol
=rpm	Devir/dak
rRNA	Ribozom RNA'sı
tRNA	Transfer RNA
Sa	Saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamin
Tris	Tris (hidroksimetil)-aminometan