

27718

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

G PROTEİNLERİNİN ÇEŞİTLİ DOKULARDAKİ
DAĞILIMI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

TAMAM ALSEBAEİ

Danışman : Doç.Dr.Beki KAN

İstanbul 1993

Lisansüstü tez çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen bilgi ve görüşlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Beki KAN'a, bana laboratuvarında çalışma olanağı tanıyan Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kaya EMERK'e, Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Osman Ziya SAYHAN'a, Biyofizik, Tıbbi Biyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ

1.1. G Proteinlerinin Çeşitleri	1
1.2. G Proteinlerinin Yapısı	2
1.2.1. α Altbiriminin Yapısı	3
1.2.2. $\beta\gamma$ Kompleksinin Yapısı	4
1.2.2.1. β Altbiriminin Yapısı	4
1.2.2.2. γ Altbiriminin Yapısı	5
1.3. G Proteinlerinin Çalışma Mekanizması	5
1.4. G Proteinlerinin Adenilat Siklaz Aktivitesinin Kontrolündeki Rolü	7
1.5. G Proteinleri Aracılığıyla İyon Kanallarının Kontrolü	8
1.6. G Proteinlerinin Çeşitli Bakteri Toksinleri İle ADP-ribozillenmesi	8
1.7. G Protein Ailesinin Değişik Bir Temsilcisi ras Proteini p21	9
1.8. G Proteinlerinin Farklı Dokulardaki Dağılımı	10
1.9. G Proteinlerinin Klinik Açısından Önemi	12
1.10. Tezin Amacı	14

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

2.1. Kimyasal Maddeler	15
2.2. Radyoaktif Maddeler	17
2.3. Elektroforetik Analizde Kullanılan Stand.	17
2.4. İmmünolojik Problar	17
2.5. Elektroforetik Gereçler	17
2.6. Çalışmada Kullanılan Aletler	18
2.7. Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi	18
2.8. Sıçan Beyin Dokusundan Homojenat Eldesi	21

2.9. Sıçan Beyin Dokusundan Membran Kesimi Eldesi	23
2.10. Kalp ve Mide Dokusundan Homojenat Eldesi ve Membran kesimlerinin Hazırlanması	25
2.11. Membran Kesimlerinde Protein Miktarı Tayini	25
2.12. [³⁵ S]GTPyS Bağlama Testi	26
2.13. Radyoaktivitenin Ölçülmesi	26
2.14. SDS-Poliakrilamid Gel Elektroforezi	27
2.15. Elektroforetik Transfer	27
2.16. İmmünojenik Belirleme-Western Blot : Alkalen Fosfataz Sistemi	28

3. BULGULAR

3.1. Farklı Dokulardan Membran Kesimlerinin Hazırlanması	29
3.2. Mide, Kalp ve Beyin Membranlarının Guanin Nükleotit Bağlama Etkinliklerinin İncelenmesi	30
3.2.1. Beyin Membran Özütlerinin Derişim Eğrisi	30
3.2.2. Mide ve Kalp Özütlerinde Derişim Eğrisi	32
3.2.3. Beyin Membran Özütlerinde Özgün Bağlanma Etkinliğinin Saptanması	33
3.2.4. Sıcaklığın GTPyS Bağlama Etkinliğine Etkisi	34
3.2.5. Nükleotitlerin [³⁵ S]GTPyS Bağlama Tepkimesine Etkisi	38
3.3. Farklı Dokuların Membranlarında G Protein Miktarlarının İmmünojenik Belirleme Yöntemiyle Belirlenmesi	40

4. TARTIŞMA	41
5. ÖZET	44
6. SUMMARY	45
7. KISALTMALAR	46
8. KAYNAKLAR	47

1. GİRİŞ

Hücre membranının iç yüzeyinde bulunan, yüzey reseptörleri ile efektör enzim sistemleri arasındaki bağlantıyı sağlayan, hücre içi sinyal iletimine aracılık eden ve guanin nükleotitleri bağlayan protein türlerine G proteinleri denir.

1.1 G Proteinlerinin çeşitleri :

G proteinlerinin birçok çeşiti bulunmakta ve tanımlanan G protein sayısı giderek artmaktadır. Bunlar içinde ilk bulunan ve özellikle en ayrıntılı incelenmiş olan G proteini, adenilat siklaz enzimini uyarıcı işleve sahip G_s 'tir (1). β -adrenerjik reseptörlerle bağlantılı olarak görev yapan G_s 'in yanısıra α -adrenerjik reseptörler ve muskarinik reseptörlerle bağlantılı olarak çalışan, adenilatsiklaz'ın inhibisyonuna (2) ve K^+ kanallarının açılmasına yol açan G_i (3) retinal hücrelerine düşen fotonun görmeyle sonuçlanan uyarı potansiyeline dönüşmesini sağlayan transdüsün (G_t) (4) ve G_i ile birlikte beyinde Ca^{++} ve K^+ kanallarının düzenlenmesinde rol oynayan G_0 (5) başlıca G proteinleri arasında yer alırlar (Tablo 1).

Tablo 1 : Bazı G proteinleri ve efektöre getirdiği sinyalin hücre üzerindeki fizyolojik etkileri.

Uyaran	Hedef Hücre Reseptör Tipi	G Protein	Efektör	Etki
Epinefrin Glukagon	Yağ (β -adrenerjik)	G_s	Adenilat siklaz	Yağların yıkımı
Epinefrin Glukagon	Karaciğer (β -adrenerjik)	G_s	Adenilat siklaz	Glikogen yıkımı
Epinefrin	Kalp (β -adrenerjik)	G_s	Adenilat siklaz	Kasılma hız ve gücünde artış
Asetilkolin	Kalp (muskarinik)	G_i	K^+ kanalı	Kasılma hız ve gücünde azalma
Enkefalin	Beyin nöronları	G_i/G_0	Ca^{++} ve K^+ kanalları	Elektriksel etkinlikte değişme
Işık	Retina (rodopsin)	G_t	cGMP fosfo- diesteraz	Işığın algılanması

1.2 G Proteinlerinin Yapısı :

G proteinleri, ras ve ras'a benzer proteinlerle, protein sentezinde rol alan elongasyon ve inisiyasyon faktörlerini de kapsayan GTP bağlayıcı geniş bir protein grubunun bir üyesidir (6, 7).

G proteinlerinin çok çeşidi olmakla beraber, bu değişik G proteinleri yapısal ve fonksiyonel benzerlikler gösterirler (8).

G proteinleri α , β ve γ altbirimlerinden oluşurlar. G proteinleri arasında farklılığı α altbirimi belirlemekle beraber, G proteinlerinin β ve γ altbirimleri arasında da yapısal farklılıklara rastlanmıştır.

1.2.1 α altbiriminin yapısı :

α -altbirimi guanin nükleotitlerini yüksek affinite ile bağlar. Ayrıca α -altbirimi kendi yapısından kaynaklanan GTPaz aktivitesine adenilat siklaz ve fosfolipaz C'yi etkileme kapasitesine de sahiptir (9).

α -altbiriminin üstündeki bölgeler guanin nükleotit, $\beta\gamma$ kompleksi, reseptör, efektör, hücre membranı ve henüz anlaşılmamış yapılarla da etkileşir. Etkileşimlerin çeşitliliği gözönüne alındığında, belli bir G protein α alt tipine ait amino asit dizisinin tümüyle korunmuş olması şartıdır değildir. α -altbirimlerinin belirli bölgeleri yüksek düzeyde korunmuşken ($> \% 90$), diğerleri o alt tipe özgüdür (korunum $< \% 60$). Az korunumlu olan bölge reseptör ile efektör bağlanması gibi protein-protein etkileşmesinde yer alırken, çok korunumlu olan bölge, GTP bağlama ve hidrolizleme gibi ortak fonksiyonları sağlayan bölgedir (10). α -altbirimlerinin

yapısı ile fonksiyonu arasındaki bağlantı çok araştırılmış olmasına karşın tam olarak anlaşılmamıştır. SDS-poliakrilamit gel elektroforezi sonucu α -altbiriminin 39-52 kDa. arasında değişen bir ağırlığa sahip olduğu saptanmıştır.

1.2.2 $\beta\gamma$ Kompleksinin Yapısı :

β ve γ altbirimleri birbirine bağlı olmakla beraber bu bağlanma $\beta\gamma$ kompleksinin işlevini gerçekleştirebilmesi için yeterli değildir. Çeşitli G proteinleri arasında yer değiştiren $\beta\gamma$ kompleksinin reseptörlerle direkt etkileşime girip girmediği henüz açıklığa kavuşmamıştır.

$\beta\gamma$ kompleksi şu olaylarda yer alır :

1. G proteinlerinin GDP'den ayrılmasını baskılar. Böylece α -altbirimini inaktif durumda bırakır.
2. G proteininin reseptöre yüksek ilgiyle bağlanmasını sağlar.
3. Bazı efektörlerin düzenlenmesinde rolü olduğu tahmin edilmektedir.
4. Hücre membranına bağlanmaktadır.

1.2.2.1 β Altbiriminin Yapısı :

Memelilerin β altbirimi 340 amino asit dizisinden oluşur. Bunlar da tekrarlanan sekiz bölgeden herbiri 40 amino asit içerir. SDS-PAGE'in sonucu molekül ağırlığının 35-36 kDa. arasında değiştiği gözlenmiştir (11).

1.2.2.2 γ Altbiriminin Yapısı :

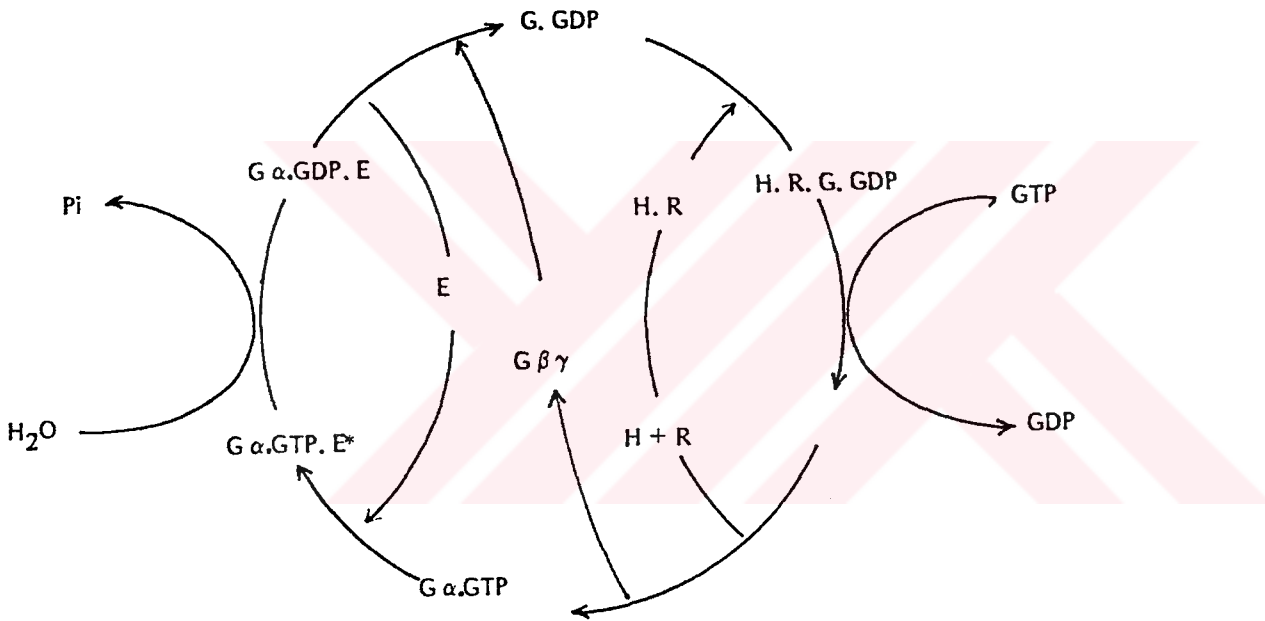
γ altbirimi 70 amino asitten oluşur ve 5-10 kDa. molekül ağırlığına sahiptir. γ altbiriminin karboksil ucunun tetrapeptit bölgesinde translasyon sonrası işlemler gerçekleşir, bu da $\beta\gamma$ kompleksinin membrana bağlanmasında önem taşır (12). Bu bölge aynı zamanda α -altbirimi ve reseptörle etkileşir (13-15).

α , β ve γ altbirimleri elde edildikleri tür ve dokuya göre, translasyon sonrası yapısal değişimlere bağlı olarak farklılık gösterirler.

1.3. G proteinlerinin Çalışma Mekanizması :

Uyarılmamış G proteini altbirimlerine ayrılmamış bir yapı düzenindedir. Bu yapı düzeninin kararlılığına GDP'de yardımcı olmaktadır. Reseptöre özgün ligand bağlandığında G proteininin GDP'ye olan ilgisi azalırken GTP'ye olan ilgisi yükselir. Bu durumda G proteini GDP'yi serbest bırakırken GTP'yi bağlayarak $\beta\gamma$ altbirimlerinin G proteininden uzaklaşmasına neden olur. Bu durumdaki G proteinine aktif G proteini denir. Aktif G proteini (G_{α} -GTP) etkiliyeceği enzime giderek bağlanır. Fakat G_{α} altbiriminin doğal GTPaz etkinliği G proteini üzerindeki

GTP molekülünü hidrolize ederek GDP'ye dönüştürür. G_{α} -GDP kompleksinin enzime olan ilgisinin azalması bu kompleksin enzimden ayrılmasına yol açar. Enzimden ayrılan G_{α} -GDP kompleksi $\beta\gamma$ altbirimleri ile birleşerek G_{α} -GDP- $\beta\gamma$ inaktif formuna döner (Şekil 1) (16-18).



Şekil 1: Sinyal dönüşümü ve G protein Döngüsü.

H, hormon ; R, reseptör ; H.R., hormon-reseptör kompleksi ; G, $G_{\alpha\beta\gamma}$ (G proteininin α , β ve γ altbirimlerinden oluşan oligomerik şekli); E, efektör ya da enzim; E^* , efektörün aktifleşmiş şekli.

Tek bir reseptör birçok G proteinini etkileyebildiği gibi bir çok reseptör de tek bir G proteinini etkileyebilir. Aynı zamanda tek bir G proteini de farklı enzimleri etkileyebilir.

1.4. G Proteinlerinin Adenilat Siklaz Aktivitesinin Kontrolündeki Rolü :

Reseptörler, stimulatory (uyarıcı) G_s proteini ve inhibitory (baskılayıcı) G_i proteini aracılığıyla adenilat siklaz aktivitesini kontrol ederler (19, 20). β -adrenerjik agonistler (21), Dopamin (22), izoproterenol (23), glukagon (24), ACTH, LH (25) gibi uyarıcı reseptörlere bağlanan ligantlar G_s 'i etkiliyerek adenilat siklaz'ı aktive eder ve hücre içi cAMP derişimini arttıırırlar. Opioid peptitler (26), asetilkolin (27) ve β -adrenerjik reseptöre bağlanan epinefrin gibi inhıbe edici reseptörlere bağlanan ligantlar G_i 'yi etkiliyerek adenilat siklazı inhıbe eder ve hücre içi cAMP derişimini azaltırırlar.

1.5. G Proteinleri Aracılığıyla İyon Kanallarının Kontrolü :

Atriyal hücrelerinde, muskarinik asetil kolin reseptörüyle K^+ kanallarının kontrolünde pertussis toksinine duyarlı G_i veya G_o proteinleri aracı olmaktadır. Muskarinik reseptör agonistleri G_i 'nin GTPaz aktivitesini arttırmırlar. G_i 'nin pertussis toksini ile ADP ribozillenmesi bu etkiyi ortadan kaldırır (28-30). Öte yandan IP_3 ve GTP'nin hücre içi depolardan kalsiyum salınımı kontrolünde önemli rollere sahip olduğu anlaşılmıştır (31, 32). İnositol lipid metabolizmasına aracılık eden farklı bir G protein olduğu düşünülmüş ve G_p olarak adlandırılmıştır. Özellikle cAMP ve Ca^{++} iyonlarının sinerjistik etki yaptığı karaciğer, kalp gibi dokularda fosfolipaz C aktivasyonu ve adenilat siklaz inhibisyonuna farklı G proteinlerinin aracı olabileceği düşünülmektedir (33, 34).

1.6. G Proteinlerinin Çeşitli Bakteri Toksinleri İle ADP-Ribozillenmesi.

Çeşitli bakteri toksinleri G proteinlerini etkileyerek ADP-ribozillenme reaksiyonunun oluşumuna neden olurlar. Örneğin kolera toksini $G_{s\alpha}$, boğmaca toksini ise

$G_{i\alpha}$ 'ya NAD molekülünün ADP-riboz grubunu kovalent biçimde bağlanmasını katalizler. $G_{s\alpha}$ 'nın ADP-ribozillenmesi ile G_s , GTPaz etkinliğini yitirir ve böylece GTP hidrolizlenmediğinden efektör enzim sürekli uyarılmış şekilde kalır (35-37). $G_{i\alpha}$ 'nın ADP-ribozillenmesine neden olan boğmaca toksini ise G_i üzerinde gerçekleşen GDP/GTP değişimini engeller, G_i 'yi inaktif konformasyonda kilitler böylelikle adenilat siklaz dolaylı olarak aktif durumda kalır.

1.7. G Protein Ailesinin Değişik Bir Temsilcisi : Ras Proteni p21 :

G proteinlerinin önemli temsilcilerinden olan ras proteini, p21 diğer G proteinleri gibi hücre membranının iç yüzeyinde bulunur. Ancak p21, α , β ve γ altbirimlerine sahip olan diğer G proteinlerinden farklı olarak 21.000 Da. ağırlığında tek bir polipeptit zincirinden oluşur; Bu nedenle de p21 olarak adlandırılmıştır. Mitojenik sinyallerin hücre içine iletisinde rol oynayan ras proteininin GTPaz etkinliğini ortadan kaldıran bazı

mutasyonlar kanser oluşumuna yol açar (38). GTPaz etkinliğini yitirmiş ras proteininin, tıpkı bundan önceki bahsedilen ADP-ribozillenmiş G_{sa} gibi özgün efektör sistemi kalıcı olarak uyardığı ve böylece hücreyi sürekli mitojenik uyarı altında tuttuğu düşünülmektedir. Bu şekilde bir onkogene dönüşmüş ras geninin insanda karşılaşılan pek çok kanser türünde rol oynadığı saptanmıştır (39). Böylece gerek kolera toksininin etkisi, gerekse mutant ras proteini örneği efektör sisteminin etkinliğinin transdükleyici G proteinleri tarafından ince ayarının hücre ve organizma için taşıdığı önemi ortaya sermektedir.

1.8. G Proteinlerinin Farklı Dokulardaki Dağılımı :

Hücre içi taşınım, salgılama gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde yer alan G proteinleri α , β ve γ altbirimlerinden oluşurlar. Guanin nükleotit bağlama bölgesini içeren α -altbiriminin farklı G proteinlerinin özgünlüğünü belirlediği, reseptör ve efektör proteinleri ile etkileşiminden sorumlu olduğu, birbirlerine sıkıca bağlanmış olan β ve γ altbirimlerinin ise farklı G proteinleri arasında değiş tokuş edildiği düşünülmektedir

G_{α} -altbirim genlerinin belli bir doku ya da hücre tipindeki ekspresyonunu karşılaştırmalı olarak inceleyen az sayıda araştırma vardır. $G_{\alpha 0}$, $G_{\alpha i 1}$, $G_{\alpha i 2}$ ve $G_{\alpha i 3}$ genlerinin kodlayan cDNA'ları kullanıldığı bir çalışmada (41), bu genlerin mRNA'larının olfaktör nöroepitel, beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, kalp ve bağırsak dokularının hepsinde saptandığı, ancak miktarlarının dokuya özgün bir biçimde değiştiği belirtilmiştir. $G_{s\alpha}$ en çok kalp ve böbrek dokusunda, $G_{\alpha 0}$ beyin, böbrek ve bağırsakta $G_{\alpha i 1}$ beyin ve böbrekte yüksek miktarda, olfaktör, karaciğer ve kalp dokularında az miktarda saptanmıştır. Buna karşın, $G_{\alpha i 2}$ 'in en çok akciğerde $G_{\alpha i 3}$ mRNA'sının ise beyin dışında bütün dokularda sentezlendiği belirlenmiştir.

Garibay ve ark. (42)'da $G_{\alpha i 2}$, $G_{\alpha i 3}$ ve $G_{s\alpha}$ mRNA'larının sıçan dokularında, insan ve sıçan hücre hatlarında farklı miktarlarda bulunduğunu gözlemişlerdir.

$G_{0\alpha}$ 'ya karşı geliştirilmiş antikörlerin kullanıldığı immünolojik bir çalışmada da $G_{0\alpha}$ 'nın evrim boyunca ve en çok nöral dokulara lokalize olduğu gösterilmiştir (43). Ancak, aynı çalışmada G_0 'ın karaciğer, kalp ve böbrek gibi periferik dokularda da az miktarda bulunduğu belirtilmektedir.

1.9. G Proteinlerinin Klinik Açısından Önemi :

Bir çok fizyopatolojik olayda G protein altbirimlerinin anormal ekspresyonu ya da işlev bozukluğunu tanımlayan çalışmalar yayınlanmıştır. Bu çalışmaların birçoğunda G protein anomalilerinin hastalık oluşum mekanizmasında önemi açıklıkla belirtilmemiş olduğundan, bu değişikliklerin hastalığa bağlı ikincil değişiklikler olduğu düşünülmüştür. Ancak, aşağıda kısaca değinilen örneklerde G proteinlerinin ekspresyonunda ve işlevinde olan bozuklukların hastalık mekanizmasında potansiyel önemi olduğu düşünülmektedir.

G proteinlerinde özgün bir bozukluğun yol açtığı hastalıklar arasında kolera ve boğmaca sayılabilir. Ölümcül ishalle seyreden kolerada vibrio cholera toksini etkisi ile $G_{s\alpha}$ proteininin ADP ribozillenmesi sonucu, GTPaz etkinliği azalmakta, G_s geriye dönüşümsüz bir şekilde uyarılmakta, adenilat siklaza sürekli aktif kalması sonucu hücre içi cAMP derişimi artmaktadır. Boğmacaya yol açan bordatella pertusis de bir toksin salgılar. Bu toksinin ADP ribozillediği G proteini G_i dir. G_i 'nin ADP ribozillenmesi cAMP artışına yol açmaktadır. Boğmacanın bazı klinik belirtileri toksinin G_i 'yi baskılamasına bağlanabilir.

G proteinlerinin endokrin sistem bozukluklarındaki rolleri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Hipertiroid sıçanlarda $G_{\alpha i}$ ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. Östrojenik steroid hormonlarının G protein işlevini değiştirdiğini ileri süren bir çok çalışma mevcuttur. Diabetes mellitus'ta G protein işlevinde bozukluklar saptanmıştır. Örneğin, insüline bağlı olmayan diabetik hastaların platelet membranlarında α -adrenerjik ajanların yol açtığı inhibisyonda artışla birlikte $G_{\alpha i 2}$ ve $G_{\alpha i 3}$ miktarlarında azalma gözlenmiştir. Son yıllarda yürütülen bazı araştırmalar G proteinlerinin insülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir.

α -altbirimlerinin mutasyonlar sonucu etkinleşmeleri ve normal α -altbirimlerinin aşırı ekspresyonları ile büyüme ve neoplazi arasında bağlantı kurulmaktadır. G proteinlerinin ayrıca tümör invazyonu ve metastazlarda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir.

G proteinlerinin nöropsikiyatrik bozuklukların bir kısmında rolleri olduğunu düşündüren birçok çalışma vardır. Etanol, opiatlar ve kokain gibi birçok ilacın kronik kullanımının G proteinleri işlevinde bozukluğa yol açması, G proteinlerinin ilaçlara tolerans mekanizması açısından önemi olduğunu düşündürmektedir. İlaçlara bağımlılık olayında G protein işlevinde ikincil değişik-

liklerin rol oynaması olasıdır. Psikiyatrik bozuklukların bazılarının örneğin, şizofreni G protein anomalilerine bağlı olduğu ileri sürülmüşse de, günümüzde bunu destekleyecek bulgular yetersizdir (44).

1.10 Tezin Amacı :

Guanin nükleotitlerinin bağlayan G proteinleri hücre zarı tarafından alınan sinyallerin hücre içi sinyallere dönüştürülmesinde görev alan heterotrimerik proteinlerdir. Hücre içi taşınım ve salgılama gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde etkin olan G proteinlerinin, hücre büyüme ve farklılaşmasında düzenlenmesinde de katkıda bulunduğu gösterilmiştir. G protein ekspresyonundaki bozuklukların bazı hastalıkların oluşumunda potansiyel önemi olduğu düşünülmektedir.

G proteinlerinin farklı dokularda farklı miktarlarda dağıldığını gösteren birkaç çalışma mevcuttur. G proteinlerinin farklı dokulardaki dağılımının belirlenmesi işlevsel rollerinin açıklığa kavuşması açısından önemlidir.

Bu tez çalışmasında, G proteinlerinin guanin nükleotit bağlama etkinliklerinin ve miktarlarının beyin, mide ve kalp dokularında karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Kimyasal Maddeler

Akrilamit	(Merck)
Amonyumpersülfat	(Sigma)
Asetikasit (Glasiyal)	(Merck)
Bisakrilamit	(Sigma)
Sığır Serum Albümini	(Promega)
Bromofenol Blue	(Sigma)
Bromochloroindolyl Fosfat (BCIP)	(Promega)
Kalsiyum Klorür	(Sigma)
"Coomassie" Parlak Mavisi	(Merck)
Ditiyotiretiol (DTT)	(Anachemia)
Etilenediamintetraasetikasit (EDTA)	(Sigma)
Folin	(Harleco)
Gliserol	(Merck)
Glisin	(Merck)
Guanozin 5'-trifosfat (GTP)	(Sigma)
Guanozin 5'-difosfat) (GDP)	(Sigma)
Guanozin 5'-0-(2-tiyodifosfat) (GTPyS)	(Sigma)
Hepes	(Malinckredt)
Potasyum klorür	(Sigma)
Lubrol	(Sigma)
Metanol	(Merck)
Magnezyum klorür	(Sigma)
Sodyum klorür	(Sigma)
Sodyumazid	(Sigma)
Nonidet-P40	(Sigma)

Nitrobluetetrazolium (NBT)	(Promega)
Fenilmetilsülfonilfloril (PMSF)	(Sigma)
Ponso-S	(Sigma)
2,5-difeniloksazol (PPO)	(Sigma)
Sukroz	(Sigma)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	(Sigma)
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	(Sigma)
Toluol	(Merck)
Tris	(Merck)
Tween-20	(Promega)
β -Merkaptoetanol	(Merck)
Sodyum deoksikolat	(Sigma)
Antitavşan IgG (Fc). Alkalen	(Promega)
Fosfataz Konjuge	

2.2 Radyoaktif Maddeler :

[³⁵S]GTPyS, Özgün etkinliği 1344 Ci/mmol, Dupont-New-England Nuclear (Boston).

2.3 Elektroforetik Analizde Kullanılan Standartlar:

Standartlar (Sigma)	Molekül Ağırlığı
β-Galaktosidaz	116.000 D.
Sığır Albümini	66.000 D.
Yumurta Albümini	45.000 D.
Karbonik Anhidraz	29.000 D.

2.4 İmmunolojik Problar :

Prof.Alfred Gilman'ın laboratuvarından temin edilen özgün antikorlar kullanıldı.

Antikor	Antijen	Amino asit dizisi	Etkileştiği Protein
P960	Sentetik Peptid	GTSNSGKSTIVKQMK	G _α

2.5 Elektroforetik Gereçler :

Bio-Rad Minigel Aleti ve Elektroforetik Transfer aleti kullanıldı.

TED Çözeltisi

20 mM Tris-HCl pH 8.0
1 mM EDTA
0.1 mM PMSF
1 mM DTT

Kalp ve Mide Yıkama Tamponu (D Çözeltisi)

30 mM Na-Hepes pH 7.5
10 mM EDTA

Kalp ve Mide Homojenizasyon Tamponu I (E Çözeltisi)

30 mM Na-Hepes pH 7.5
10 mM EDTA
250 mM Sukroz
0.1 mM PMSF

Kalp ve Mide Homojenizasyon Tamponu II (F Çözeltisi)

30 mM Na-Hepes pH 7.5
4 mM EDTA
250 mM Sukroz

[35S]GTP γ S Seyreltme Tamponu

10 mM Tris-HCl pH 7.5
10 mM DTT

Filtre Yıkama Tamponu

20 mM Tris-HCl pH 8.0
100 mM NaCl
25 mM MgCl₂

Örnek Seyreltme Tamponu

20 mM Hepes pH 8.0
1 mM EDTA
1 mM DTT
% 0.1 Lubrol

Elektroforez Tamponu (2 x)

Tris 12 gr.
Glisin 60 gr.
SDS 4 gr.
Distile su ile 2 lt'ye tamamlandı.

PAGE Ayırışım Geli (% 10)

1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamit/Bisakrilamit (30:0.8)	3.35 ml
% 10 Amonyumpersülfat	80 µl
TEMED	6 µl
Distile su	4 ml

PAGE Derişim Geli (% 4)

1 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamit/Bisakrilamit (30:0.8)	1.3 ml
% 10 Amonyumpersülfat	80 µl
TEMED	12 µl
Distile su	7.35 ml

Elektroforez Örnek Tamponu (4 x)

1 M Tris-HCl pH 6.8	2 ml
% 10 SDS	2 ml
Gliserol	3.2 ml
% 0.1 Bromfenolmavisi	0.8 ml

Gel Boyama Çözeltisi

% 0.2 "Comassie" mavisi
% 50 Metanol
% 10 Asetik asit

Gelden Boya Çıkartma Çözeltisi

% 50 Metanol
% 10 Asetik asit

Transfer Tamponu (TB) pH 8.3

25 mM Tris
192 mM Glisin
% 20 Metanol

Ponso-S Boyama Çözeltisi

Glasiyal Asetik asit 2.5 ml
Ponso-S 0.05 gr
Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı

Blok Tamponu

% 1 BSA
% 0.05 Tween-20
TBS Tamponu içinde hazırlandı.

Tris-Tuz Tamponu (TBS)

37 mM NaCl
3 mM KCl
25 mM Tris

Lowry Karışımı :

Çözelti I : Na_2CO_3 20 gr.
0.1 N NaOH içinde 500 ml'de çözüldü.

Çözelti II : EDTA 250 mg
0.1 N NaOH 200 ml
içinde çözüldürüldü. Çözelti I ve çözelti II
karıştırılıp 0.1 N NaOH ile 1 lt'ye tamamlandı.

Birincil Antikor Çözeltisi

% 3 BSA
% 0.2 Nonidet P-40
% 0.2 Sodyumazid
2 mM CaCl_2
60 mM NaCl
10 μl Anti-tavşan G_α
14 ml TBS içerisinde hazırlandı.

İkincil Antikor Çözeltisi

Anti-tavşan IgG-Fc alkalen fosfataz konjugat
TBS içerisinde 7500 kez seyreltilerek hazırlandı.

Geliştirici Tampon

100 mM Tris-HCl pH 9.5
100 mM NaCl
5 mM MgCl_2
20 ml olarak hazırlandı ve
132 μl NBT
66 μl BCIP eklendi.

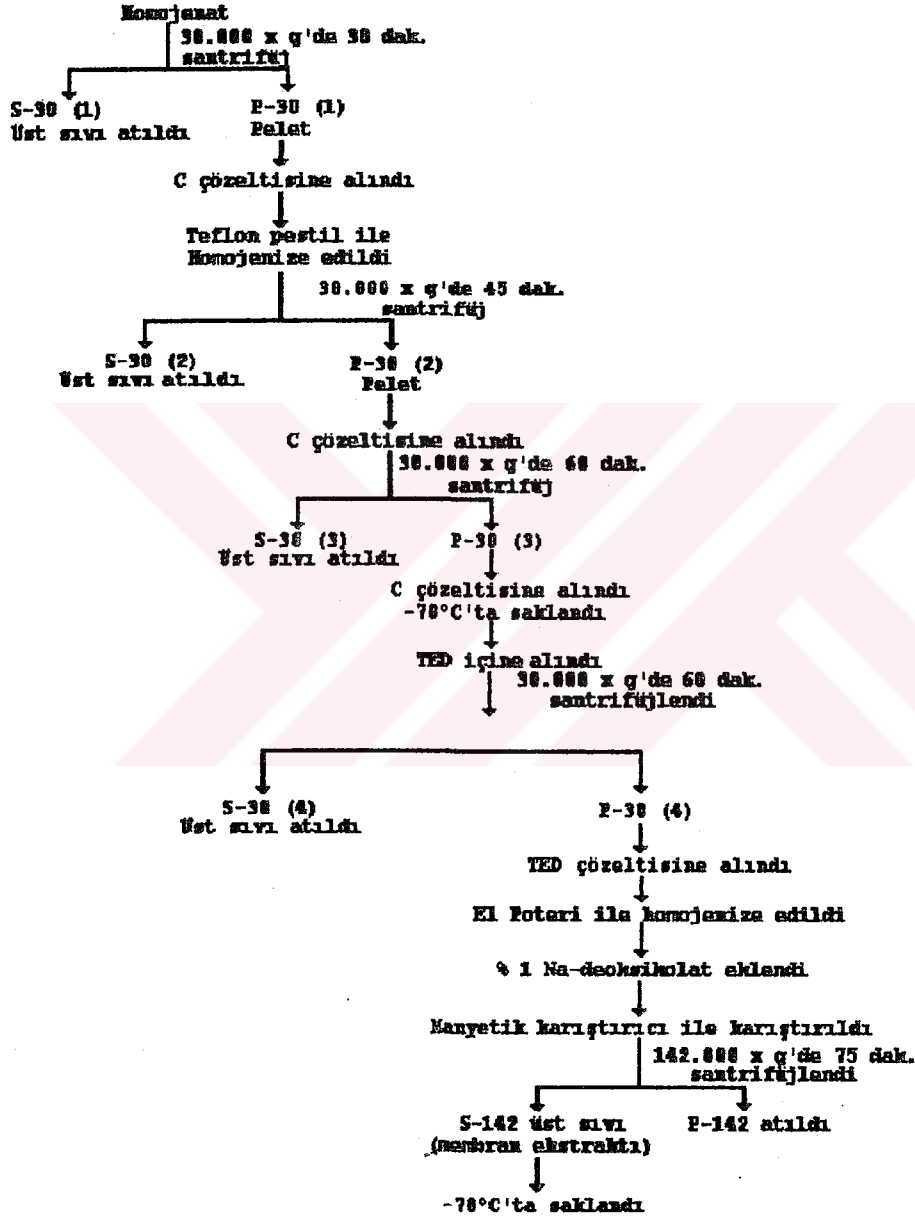
2.8 Sıçan Beyin Dokusundan Homojenat Eldesi :

Tüm işlemler proteaz inhibitörü PMSF varlığında 0-4°C'ta yürütüldü. Kafaları kesilerek öldürülen sıçanların beyin dokusu hemen çıkarılarak 0°C'taki A çözeltisi içine alındı, kan'dan arındırıldı ve tartıldı. Bir ağırlık birimine iki hacim B çözeltisi eklenerek, doku küçük parçalara kıyıldı ve el poteri ile homojenize edildi.

2.9 Sıçan Beyin Dokusundan Membran Kesimi Eldesi :

Homojenleşmiş doku DuPont-Sorvall Combi ultra-santrifüjünde T-875 tipi rotorla 30.000 x g'de 30 dak. santrifüjlendi. Çökelek P-30 (1) C çözeltisine alındı, Teflon uçlu homejenizatörle 100 dev/dak'da homojenize edildi ve 30.000 x g'de 45 dak. santrifüjlendi. Çökelek P-30 (2) C çözeltisi ile tekrar yıkanarak ve 30.000 x g'de 60 dak. santrifüjlendi, çökelek P-30 (3) çok ufak hacimde C çözeltisi içine alınarak -70°C'ta saklandı. Membran ekstraktı elde etmek için P-30 (3) kesimi TED tamponu içine alındı ve 30.000 x g'de 60 dak. santrifüjlendi. Pellet TED çözeltisi içinde el poteri ile 3 kez homojenize edildi, % 1 Na-deoksikolat eklendi ve manyetik karıştırıcı ile 0°C'ta 30 dak. yavaşça karıştırıldıktan sonra 142.000 x g'de 75 dak. santrifüjlendi. Pelet atıldı, üst sıvı -70°C'ta saklandı (Tablo 2).

Tablo 2: Sığan beyin dokusundan membran kesimlerinin eldesi.



2.10 Kalp ve Mide Dokusundan Homojenat Eldesi ve Membran Kesimlerinin Hazırlanması :

Tüm işlemler beyin için anlatıldığı şekilde yürütüldü. Ancak, dokular çıkarıldıktan sonra D çözeltisine alındı, homojenizasyon E çözeltisi içinde gerçekleştirildi. Membran kesimi eldesi esnasında ise F çözeltisi kullanıldı.

2.11 Membran Kesimlerinde Protein Miktar Tayini :

Protein miktarları standart olarak sığır serum albümin'in (BSA) kullanıldığı Lowry yöntemiyle belirlendi (45). BSA (0-100) µg arasında değişen miktarlarda ve bilinmeyen örnekler reaksiyon hacmi 100 µl olacak şekilde tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine Lowry karışımından 1 ml ilave ederek vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 30 dak. bekletildi. Her tüpe 100 µl % 50 folin ilave edilerek 50 dak. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 700 nm'de absorbans değerleri okundu. Bilinen protein miktarlarına karşı çizilen standart doğrudan bilinmeyen protein miktarları belirlendi.

2.12 [³⁵S]GTPyS Bağlama Testi :

Beyin, kalp ve mide dokularının membran kesimlerinde [³⁵S]GTPyS bağlama tepkimesi, 60 µl reaksiyon hacminde 25 mM HEPES, 30 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 µM GTPyS ve [³⁵S]GTPyS (300.000 cpm) varlığında 40 dak. süreyle 32°C'ta gerçekleştirildi. Örnekler nitrosellüloz filtrelere (Millipore Type HA 0.45 µm) emdirildi ve filtreler yıkama tamponu ile yıkandı. Kurutulan filtreler sıvı sintilasyon sayacında sayılarak bağlanan [³⁵S]GTPyS miktarları belirlendi.

2.13 Radyoaktivitenin Ölçülmesi :

[³⁵S]GTPyS içeren ve kurutulan filtreler % 0.4 PPO içeren toluol içinde özel cam şişelere yerleştirildi. Radyoaktivite miktarı Packard sıvı sintilasyon sayacında saptandı. Sayacın verimi % 95 olarak belirlendi. 1 dakikalık sayım (cpm) aşağıdaki formül kullanılarak pmol boyutlarına çevrildi.

$$\text{cpm} \times 100$$

$$\text{Pmol} = \frac{\text{cpm} \times 100}{2.22 \times \text{sayım verimi (\%)} \times \text{spesifik aktivite (Ci/mol)}}$$

2.14. SDS-Poliakrilamit Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) :

Beyin, kalp ve mide dokularından elde edilen membran kesimleri (S-142), (P-30) % 5 β -merkaptoetanol içeren örnek elektroforez örnek tamponu içinde 90°C'ta 3 dak. denatüre edildi. Elektroforez Laemmli'ye göre (46) uygulandı. 20 μ l hacim içinde olan örnekler Hamilton şırıngası kullanılarak derişim mini geline uygulandı ve elektroforez 100 V'ta 1-1.5 saat süre ile yürütüldü.

2.15. Elektroforetik Transfer :

Elektroforez işlemi bittikten sonra geller transfer tamponuna aktarılarak 30 dak. bekletildi. 9.5 x 5.5 cm boyutlarında nitrosellüloz membran 11 x 8 cm boyutlarında iki adet filtre kağıdı aynı tampon içinde dengelendi. Gel kasetindeki gri panelin üzerine sırasıyla sünger, filtre kağıdı, gel, nitrosellüloz membran, filtre kağıdı ve sünger yerleştirilerek kaset kapatıldı, tanka yerleştirildi, ısınmayı önlemek üzere buz kutusu yerleştirildi ve tank transfer tamponuyla dolduruldu. Transfer işlemi 100 V'ta 1 saat karıştırılarak yürütüldü. Transferin gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemek için membranlar Ponso-S boyama

tamponuna alındı, 3 dak. bekletildi, protein bantları gözlendikten sonra protein standartları işaretlendi. Membran distile su ile yıkandı, filtre kağıdında kurutuldu ve 4°C'ta saklandı.

2.16. İmmünolojik Belirleme - Western Blot :
(Alkalen Fosfataz Sistemi)

Nitrosellüloz membranlar transfer işleminden sonra blok tamponuna alınarak oda sıcaklığında 60 dak. çalkalandı. TBS tamponuyla kısaca yıkandıktan sonra birincil antikor çözeltisi eklendi ve 3.5 saat oda sıcaklığında çalkalandı. TBS ile beşer dak. üç kez yıkandı ve alkalen fosfataz-konjuge ikincil antikor eklenerek oda sıcaklığında 1.5 saat karıştırılarak bekletildi. TBS ile yıkama işlemlerinden sonra membranlar filtre kağıdına emdirilerek kurutuldu ve geliştirici tampon içine alındı. İstenen görüntü elde edilinceye kadar 5-10 dak. çalkalandıktan sonra tepkime distile suyla durduruldu, membranlar kurutuldu, streç film ve aliminyum folyo içinde 4°C'ta saklandı.

3. BULGULAR

3.1 Farklı Dokulardan Membran Kesimlerinin Hazırlanması :

Mide, kalp ve beyin dokusundan membran kesimi (P-30) ve membran özütleri (S-142) hazırlandı ve protein miktarları belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3 : Mide, kalp ve beyin membranlarında protein miktarları.

Mide (5 gr), kalp (2.8 gr) ve beyin (1.4 gr) dokusundan membran kesimleri (P-30) ve membran özütleri Gereç ve Yöntemlerde belirtildiği şekilde hazırlandı. Protein miktarları Lowry yöntemine göre (40) belirlendi.

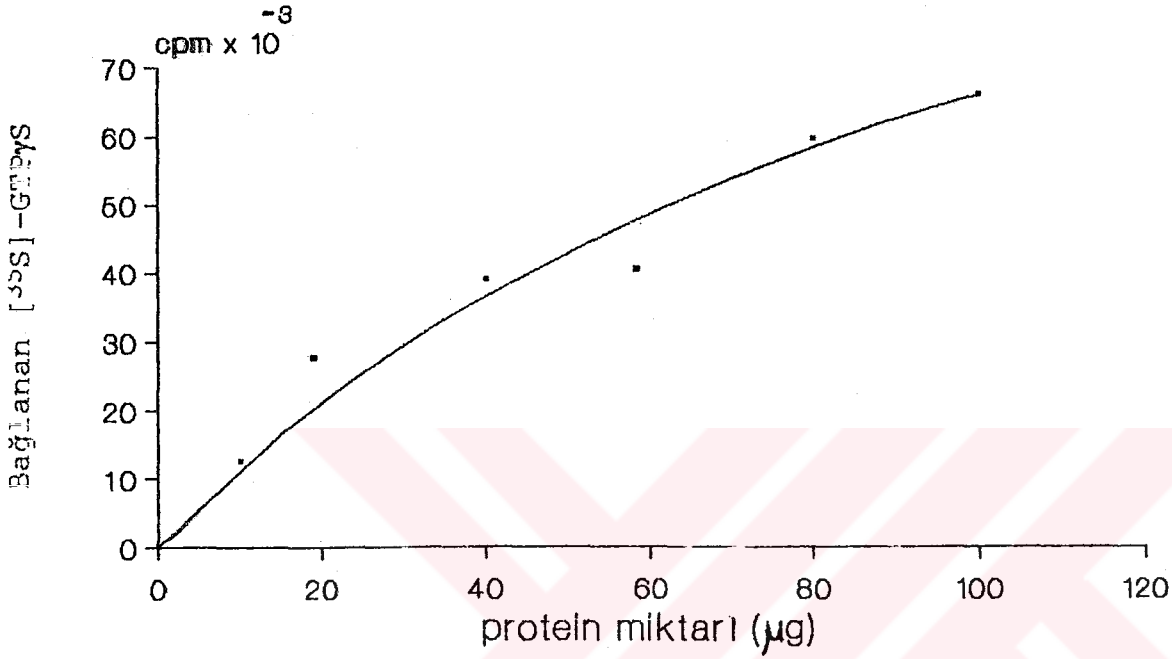
Örnek	Hacim (ml)	Protein Derişini (mg/ml)	Toplam Protein (mg)
Mide P-30	4.2	7.45	31.29
S-142	3.5	5.15	18.03
Kalp P-30	4.2	8.55	35.91
S-142	3.7	6.85	22.35
Beyin P-30	3.6	12.3	44.28
S-142	2.0	17.7	35.4

3.2 Mide, Kalp ve Beyin Membranlarının Guanin Nükleotit Bağlama Etkinliklerini İncelenmesi

Mide, kalp ve beyin dokusundan hazırlanan membran özütlerinde guanin nükleotit bağlama etkinliği GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu olan GTP γ S varlığında incelendi.

3.2.1 Beyin Membran Özütlerinin Derişim Eğrisi :

Beyin membran özütlerinde artan protein miktarlarının [³⁵S]GTP γ S bağlama etkinliğine etkisi incelendi. Guanin nükleotit bağlama etkinliğinin toplam protein miktarına bağımlı olduğu gözlemlendi (Şekil 2). Bağlama etkinliği 100 μ g protein için 40 dak.da 23.3 x 10⁻³ pmol olarak belirlendi.

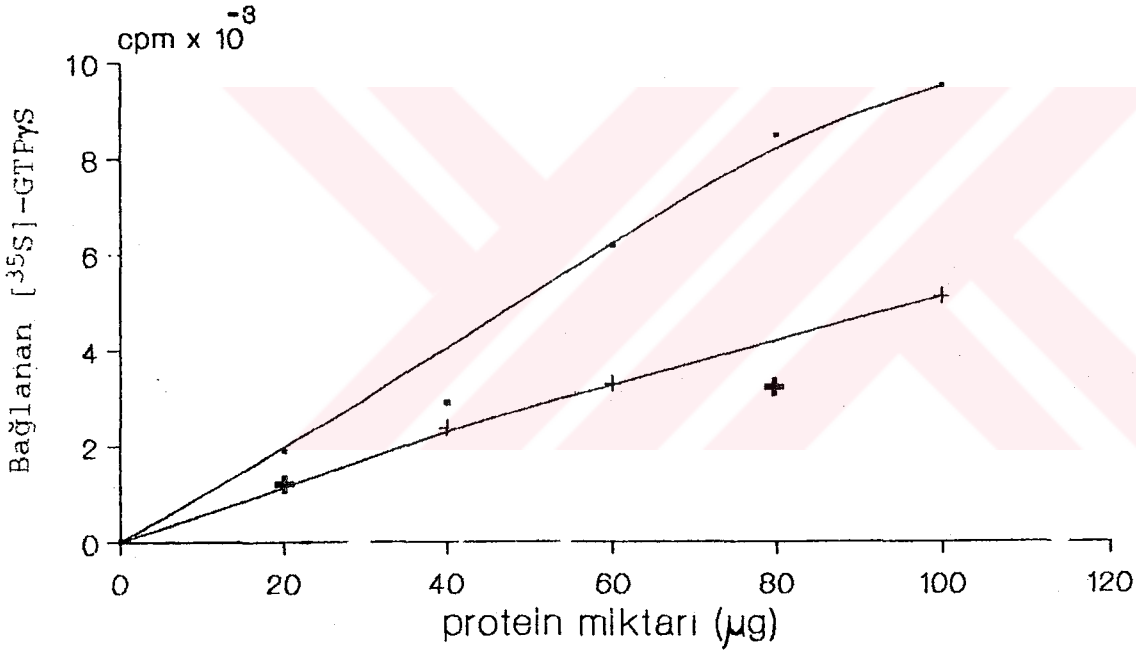


Şekil 2 : Beyin membran özütlerinde GTPγS bağlama etkinliği değişim eğrisi.

0-100 μg protein içeren membran özütleri 60 μl tepkime karışımı içinde 300.000 cpm [³⁵S]GTPγS varlığında, Gereç ve Yöntemlerde belirtilen koşullarda 32°C'ta 40 dak. inkübe edildi. Örnekler nitrosellüloz filtrelere emdirildi, filtreler yıkandı, kurutuldu. Bağlanan [³⁵S]GTPγS miktarı cpm (dakikada sayım) olarak belirlendi.

3.2.2. Mide ve Kalp Membran Özütlerinde Derişim Eğrisi :

Mide ve kalp membran özütlerinde artan protein miktarlarının guanin nükleotit etkinliklerinin etkisi incelendi. Her iki dokuda GTPyS bağlama etkinliğinin artan protein miktarına bağımlı olduğu gözlenirken, mide membran özütlerindeki guanin nükleotit bağlama etkinliğinin kalp özütlerindeki kıyasla yaklaşık iki kat yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 3). 100 µg protein içeren membran özütlerinde bağlanan [³⁵S]GTPyS miktarının mide örneğinde 3.4×10^{-3} pmol, kalp örneğinde ise 1.8×10^{-3} pmol olduğu belirlendi.

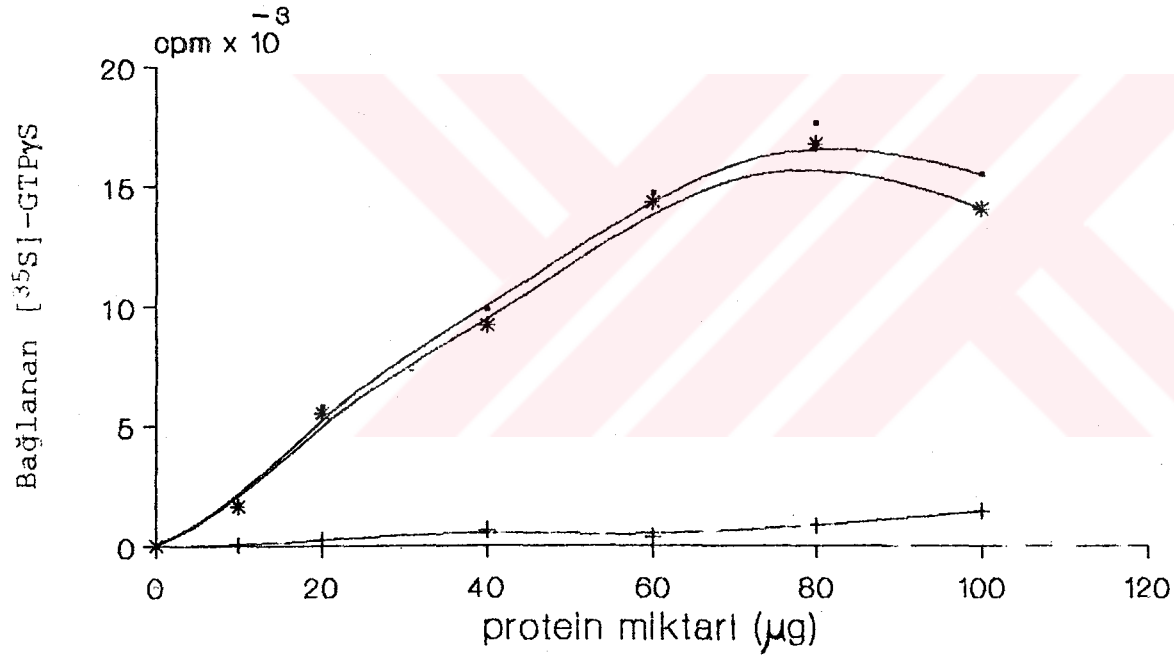


Şekil 3 : Kalp ve mide özütlerinde GTPyS bağlama etkinliği derişim eğrisi.

0-100 µg protein içeren kalp (+ - +) ve mide (o-o) membran özütleri 300.000 cpm [³⁵S]GTPyS içeren 60 µl'lik tepkime karışımı içinde Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtilen koşullarda 32°C'ta 40dak.inkübe edildi. Örnekler nitrosellüloz filtre-lere emdirildi, filtreler yıkandı, kurutuldu, bağlanan [³⁵S]GTPyS miktarı cpm olarak belirlendi.

3.2.3. Beyin Membran Özütlerinde Özgün Bağlanma Etkinliğinin Saptanması :

GTPyS bağlanma tepkimesinde özgün bağlanma miktarını saptamak amacıyla, beyin membran özütlerindeki [³⁵S]GTPyS bağlanma tepkimesi 1mM GTP varlığında ve yokluğunda incelendi. Beyin özütlerinde özgün olmayan bağlanma miktarının toplam bağlanma miktarının çok küçük bir bölümünü oluşturduğu belirlendi (Şekil 4).

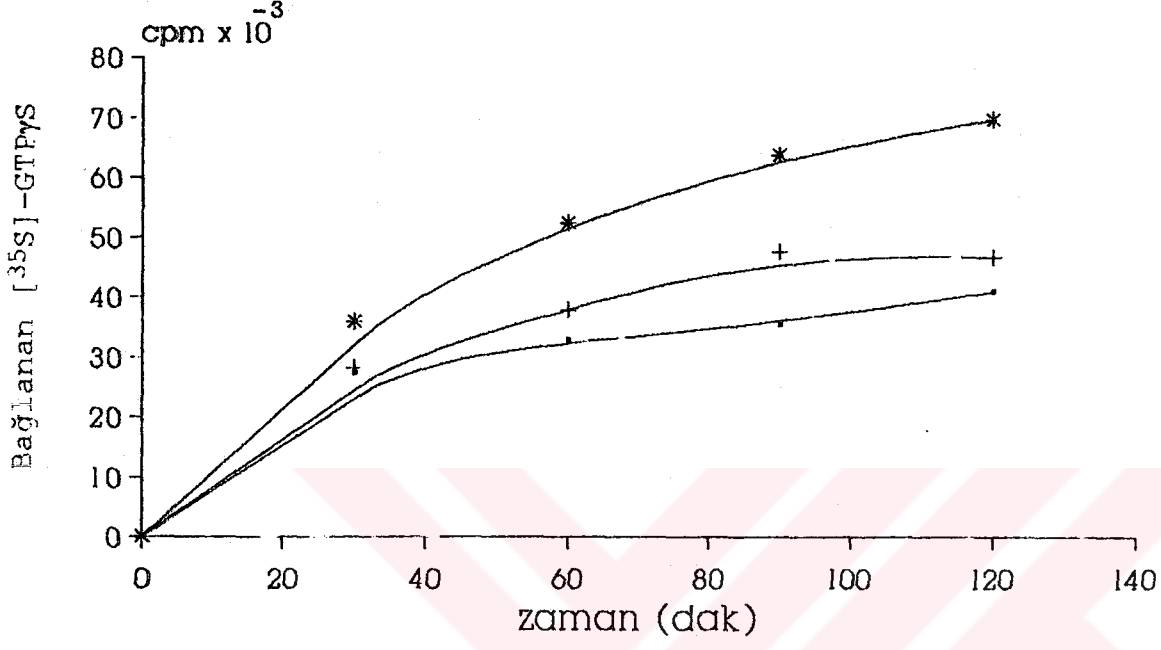


Şekil 4 : Beyin Membran özütlerinde özgün bağlanma miktarının belirlenmesi :

Beyin membran özütleri (S-142) Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde hazırlandı. 0 ile 100 µg protein içeren örneklerde GTPyS bağlama tepkimesi 1mM GTP varlığında (+) ve yokluğunda (o), Şekil 2'de belirtilen koşullarda yürütüldü ve özgün bağlanma (*-*) miktarı belirlendi.

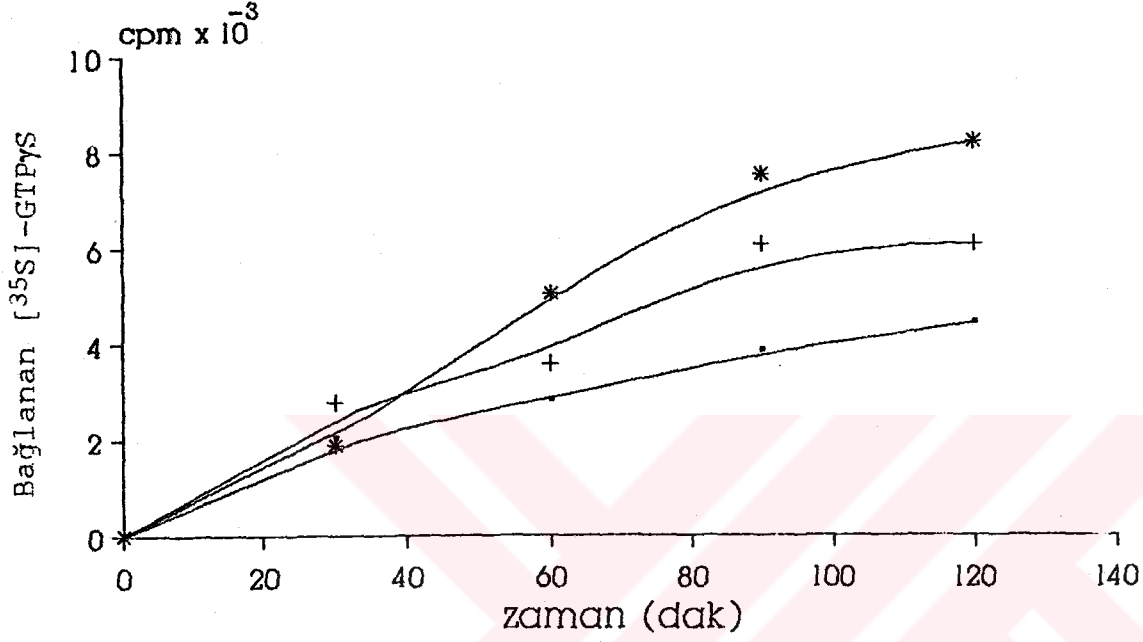
3.2.4. Sıcaklığın GTPyS Bağlama Etkinliğine Etkisi :

Beyin, mide ve kalp membran özütlerine GTPyS bağlama etkinlikleri 25°C, 30°C ve 36°C'ta incelendi. Beyin ve kalp özütlerinde en yüksek bağlama etkinliğinin 36°C'ta, en düşük bağlama etkinliğinin ise 25°C'ta gerçekleştiği belirlendi (Şekil 5-6). Mide özütlerinde 25°C'ta ve 30°C'ta elde edilen bağlama etkinliği aynı iken en yüksek bağlanma 36°C'ta gözlemlendi (Şekil 7). Her üç sıcaklık için artan tepkime süresinin bağlanma miktarını artırdığı ancak 90 dak.dan sonra artışın lineer olmadığı görüldü. Tepkime için 60 dak.lık sürenin uygun olduğu belirlendi.



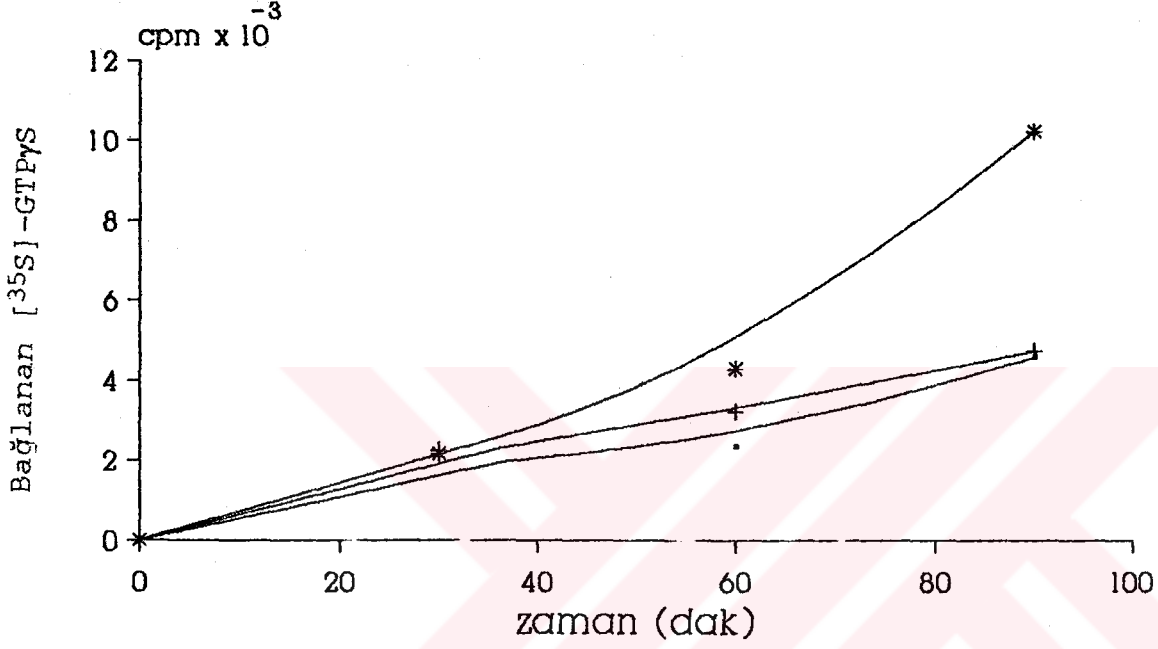
Şekil 5 : Beyin membran özütlerinde sıcaklığın GTP γ S bağlama etkinliğine etkisi.

50 μ g protein içeren beyin membran özütlerinde GTP γ S bağlama tepkimesi Gereç ve Yöntemler ve Şekil 2'de belirtildiği gibi 25°C (o-o), 30°C (+-+) ve 36°C (*-*)'ta gerçekleştirildi.



Şekil 6 : Kalp membran özütlerinde sıcaklığın GTPγS bağlama etkinliğine etkisi.

60 µg içeren kalp membran özütlerinde GTPγS bağlama tepkimesi Gereç ve Yöntemler ve Şekil 2'de belirtildiği gibi 25°C (o-o), 30°C (+-+) ve 36°C (*-*)'ta gerçekleştirildi.

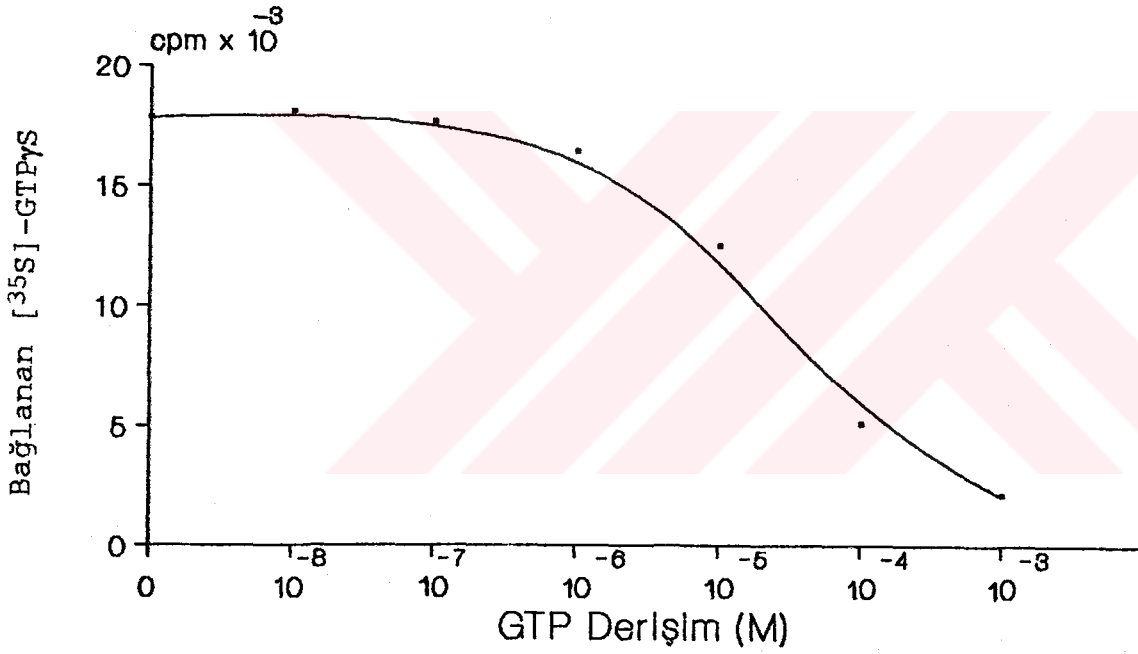


Şekil 7 : Mide membran özütlerinde sıcaklığın GTPγS bağlama etkinliğine etkisi.

50 µg içeren mide membran özütlerinde GTPγS bağlama tepkimesi Gereç ve Yöntemler ve Şekil 2'de belirtildiği gibi 25°C (o-o), 30°C (+-+) ve 36°C (*-*)'ta gerçekleştirildi.

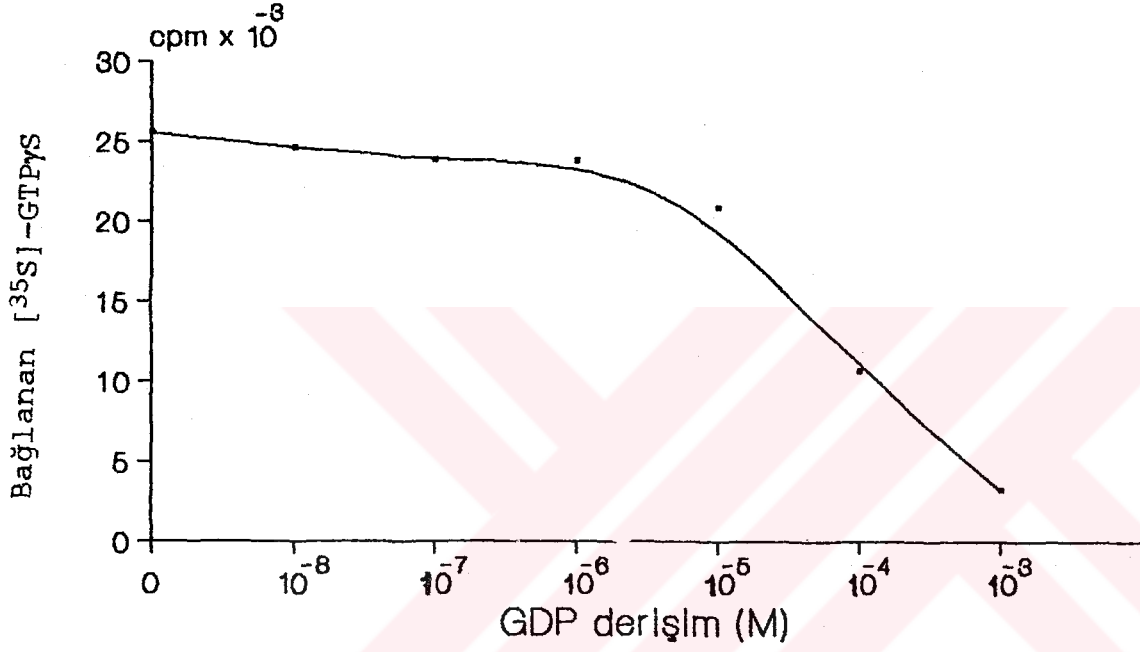
3.2.5. Nükleotitlerin [³⁵S]GTPyS Bağlama Tepkimesine Etkisi :

GTP ve GDP'nin [³⁵S]GTPyS bağlama tepkimesine etkisi incelendi. GTPyS bağlama etkinliğinin guanin nükleotitleriyle özgün olarak inhibe olduğu belirlendi (Şekil 8-9).



Şekil 8 : GTP'nin GTPyS bağlama tepkimesine etkisi.

40 µg protein içeren beyin membran özütlerinde GTPyS bağlama tepkimesi Şekil 2'de ve Gereç ve Yöntemler'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Örneklerle artan derişimlerde GTP eklendikten sonra inkübasyon 36°C'ta 1 saat süreyle yürütüldü.

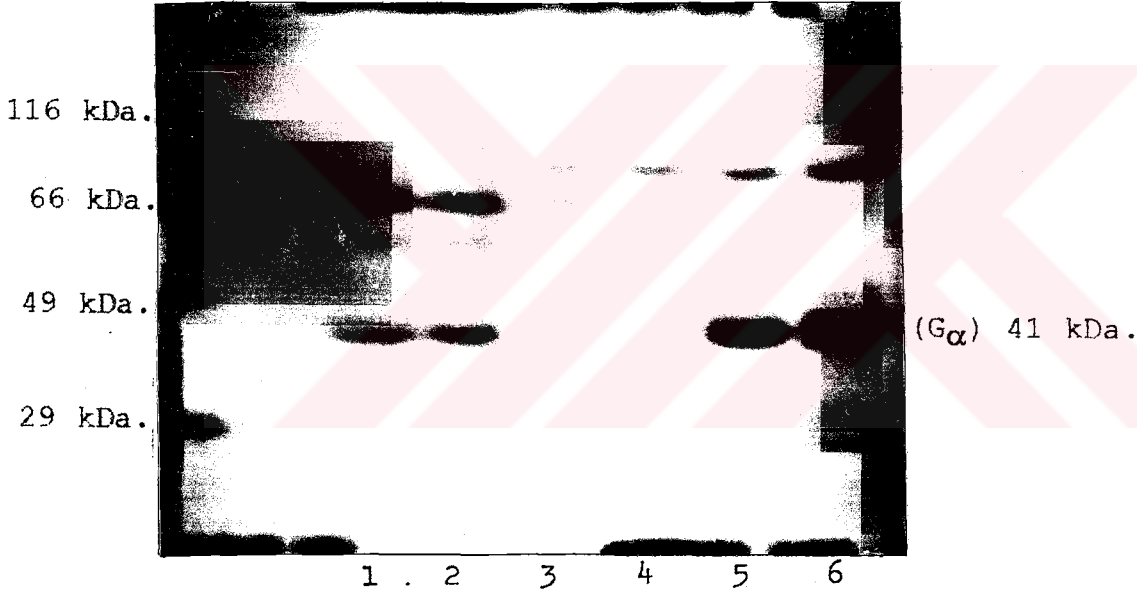


Şekil 9 : GDP'nin GTPγS Bağlama Tepkimesine Etkisi :

40 µg protein içeren beyin membran özütlerinde GTPγS bağlama tepkimesi Şekil 2'de ve Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi yürütüldü. Örneklere artan derişimlerde GDP eklendikten sonra inkübasyon 36°C'ta 1 saat süreyle gerçekleştirildi.

3.3. Farklı Dokuların Membranlarında G Protein Miktarlarının İmmünolojik Belirleme Yöntemiyle Saptanması:

Beyin, kalp ve mide membran özütlerindeki G protein miktarları G proteinlerinin α altbirimleriyle etkileşen antikor (P960) kullanılarak belirlendi. G proteinleri açısından en zengin dokunun beyin olduğu gözlemlendi. Kalp dokusunda ise G protein miktarının diğer dokulara kıyasla çok düşük olduğu belirlendi.



Şekil 10 : Beyin, kalp ve mide membranlarında G protein miktarlarının immünblot yöntemiyle incelenmesi

50 μ g (1, 3, 5) ve 75 μ g (2, 4, 6) protein içeren mide (1, 2), Kalp (3, 4) ve beyin (5, 6) membran özütleri (S-142) 20 μ l hacim içinde % 10 SDS-poliakrilamid gellerine uygulandı. Elektroforez işleminden sonra proteinler nitrosellüloz filtreye aktarıldı. İmmünolojik belirleme Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

4. TARTIŞMA

G proteinleri hücre dışından uyarılmış membran reseptörlerini hücre içi ikincil ulak sistemlerini denetleyen heterotrimerik yapıda proteinlerdir (1). Görsel, hormonal ve ve nörotransmitter sinyal ileti sistemlerinde aracı olan bu proteinlerin hücre içi taşınım ve salgılama gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Aynı zamanda, G proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların, G protein altbirimlerine ait mRNA'ya da proteinlerin ekspresyonundaki değişmelerin bazı hastalıklara yol açtığı düşünülmektedir (44). Örneğin tiroid ve endokrin tümörlerinde $G_{\alpha s}$ altbirim geninde tek bir baz değişikliğine rastlanmıştır.

Kolera ve boğmaca sırasıyla G_s ve G_i/G_0 proteinlerinin α -altbirimlerinin ADP ribozillenmesi ile ortaya çıkar (47). G proteinlerinin işlevlerinde meydana gelen değişikliklerin rol oynadığı hastalıklar arasında, pseudo-paratiroidizm, şeker hastalığı, kardiovasküler hastalıklar, tümör metastazı, bağışıklık yetersizliği ve nöropsikiyatrik düzensizlikler sayılabilir (1-44) .

G proteinlerinin hücre gelişme ve farklılaşmasında da rol oynadığı ileri sürülmektedir. Jordan ve ark. sıçan kortikal dokusunda G_i/G_0 protein düzeylerinin fetal dönemden neonatal ve erişkin döneme doğru arttığını gözlemişlerdir (48). Bu araştırmacılar G proteinlerinin

sinir sisteminin gelişmesinde ve nöronal etkinliğin düzenlenmesinde işlevi olduğunu ileri sürmektedir. G protein düzeylerinin nöroblastoma X glioma hibrit hücrelerinde (49), HL60 ve 4392 monositlerinde (50) ve 3T3-L1 fibroblast hücrelerinde (51) farklılaşmaya koşt olarak değiştiği gözlenmiştir.

Son yıllarda yürütülen çalışmalarda G_{α} gen ekspresyonunun farklı dokularda ve gelişme aşamalarında düzenlenmeye tabi olduğu ileri sürülmektedir. G proteinlerinin farklı dokulardaki dağılımının belirlenmesi işlevsel rollerinin açıklığa kavuşması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada sıçan beyin, mide ve kalp doku membranlarında toplam G protein miktarları G proteinlerinin α -altbirimlerine özgün antikorun kullanıldığı immünblot yöntemiyle karşılaştırılmıştır. G proteinleri açısından en zengin dokunun beyin olduğu, kalp dokusunda ise toplam G protein miktarının diğer dokulara kıyasla çok düşük olduğu belirlenmiştir. G_{α} genlerinin ekspresyonu birçok araştırmaya konu olmuştur. Ancak, bu genlerin farklı dokularda ekspresyonunu karşılaştırmalı olarak inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda $G_{s\alpha}$, $G_{0\alpha}$, $G_{\alpha 1}$, $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 3}$ ve $G_{x\alpha}$ mRNA ve protein miktarları ayrı ayrı belirlenmiş, toplam G protein miktarları saptanmamıştır. Bu çalışmalara göre (40-43) beyin dokusunda $G_{0\alpha}$, $G_{\alpha 1}$, $G_{x\alpha}$ ve $G_{s\alpha}$ bulunmakta, $G_{\alpha 3}$ 'ya rastlanmamaktadır. Kalp dokusunda en çok $G_{s\alpha}$, az miktarda da $G_{\alpha 1}$ mRNA'sı saptanmıştır. Bağırsak dokusunda $G_{\alpha i}$, $G_{0\alpha}$ ve $G_{s\alpha}$ belirlenmiştir.

G proteinlerinin guanin nükleotitlerini bağladıkları bilinmektedir. Çalışmanın ikinci bölümünde beyin, kalp ve mide membran özütlerinde guanin nükleotit bağlama etkinlikleri GTP'lerin hidrolizlenmeyen analogu olan GTP γ S kullanılarak saptanmıştır. Her üç doku membranında guanin nükleotit bağlama etkinliğinin toplam protein miktarına bağımlı olduğu gözlenmiştir. 100 μ g protein varlığında beyin, mide ve kalp membran özütlerine bağlanan [35 S]-GTP γ S miktarının sırasıyla 23.3×10^{-3} pmol, 3.4×10^{-3} pmol ve 1.8×10^{-3} pmol olduğu belirlenmiştir. GTP bağlama etkinliklerinde gözlenen farkların immünblot yönteminde miktar açısından gözlenen farklarla uyum gösterdiği dikkati çekmiştir.

Beyin, mide ve kalp membran özütlerinde sıcaklığın GTP γ S bağlama etkinliğine etkisi incelenmiş, her üç dokuda en yüksek bağlanma 36°C 'ta ve 60 dak.da elde edilmiştir. En yüksek bağlama etkinliğinin gözlendiği beyin membran özütlerinde 1 mM'lık GTP varlığında özgün bağlanma miktarına bakılmış, özgün olmayan bağlanmanın toplam bağlanma miktarının çok küçük bir bölümünü oluşturduğu belirlenmiştir. GTP ve GDP gibi diğer guanin nükleotitlerin [35 S]-GTP γ S bağlama tepkimesine etkisi incelenmiş, GTP ve GDP'nin bu tepkimeyi özgün olarak inhibe ettiği, 10^{-6} M [35 S]-GTP γ S ile gözlenen bağlanma miktarının 10^{-3} M GTP ve GDP ile tamamen engellendiği gözlenmiştir.

5. ÖZET

Sıçan beyin, kalp ve mide dokularından membran özütleri hazırlandı. G proteinlerinin α -altbirimlerine ortak sentetik peptitlere karşı geliştirilmiş antikörlerin kullanıldığı immünolojik çalışmalar G proteinlerinin farklı dokularda farklı miktarlarda bulunduğunu gösterdi.

Western Blot analizi ile G protein miktarlarının karşılaştırılması G proteinlerinin beyinde en yüksek, midede beyine kıyasla daha az, kalpte ise çok düşük miktarda bulunduğunu ortaya koydu.

GTP γ S ile yürütülen guanin nükleotit bağlama deneylerinde en yüksek ve en düşük bağlama etkinliklerinin sırasıyla beyin ve kalp membran özütlerinde gerçekleştiği görüldü.

Guanin nükleotit bağlama tepkimesi için en uygun sıcaklığın 36°C olduğu, GTP ve GDP'nin GTP γ S bağlanmasını inhibe ettiği belirlendi.

6. SUMMARY

Membrane extracts were prepared from three rat tissues : brain, heart and stomach. Immunological studies carried out with an antibody raised against synthetic peptide common to α subunits indicated that G proteins were present in different tissues in different amounts. Comparison of the amounts by Western Blot analysis showed that G proteins were found at highest level in brain, abundantly expressed in stomach and at low levels in heart.

Guanine nucleotide binding assays carried out with GTP γ S revealed that the highest and lowest binding activities were obtained in brain and heart membrane extracts respectively. The optimum temperature for the guanine nucleotide binding assay was determined as 36°C. GTP and GDP inhibited GTP γ S binding.

7. KISALTMALAR

APS	:	Amonyumpersulfat
BCIP	:	Bromokloroindolilfosfat
BSA	:	Bovin serum albümin
cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
cpm	:	dakikadaki sayım
DTT	:	Ditiotiretiol
Dak.	:	Dakika
EDTA	:	Etilendiamintetraasetikasit
GDP	:	Guanozin 5'-difosfat
GTP	:	Guanozin 5'-trifosfat
GTPyS	:	Guanozin 5'-0-(2-tiyodifosfat)
G _i	:	Baskılayıcı G proteini
G _s	:	Uyarıcı G proteini
G _t	:	Transdüsin
G ₀	:	K ⁺ ve Ca ⁺⁺ kanallarını düzenleyici G proteini
G _α	:	G proteininin α altbirimi
G _{βγ}	:	G proteininin β ve γ altbirimi
g	:	Yerçekimi sabiti
H	:	hormon
H.R.	:	Hormon-reseptör
MET	:	β-merkaptoetanol
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NP-40	:	Nonidet-P40
NBT	:	Nitrobluetetrazolyum
P -30	:	Hücre özütü
PAGE	:	Poliakrilamid gel elektroforezi
PMSF	:	Fenilmetilsülfonilfloril
PPO	:	2, 5-difenilokzasol
pmol	:	Pikomol
S-142	:	membran ekstraktı
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	:	N,N,N',N'-Tetrametiletetilendiamin
Tris	:	Hidroksimetilaminometan

8. KAYNAKLAR

1. Gilman, A.G. : Proteins : Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 615-649 (1987).
2. Hildebrandt, J.D., Hanoune, J., Birnbaumer, L. : Guanine nucleotide inhibition of cys-s49 mouse Lymphoma cell membrane Adenylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* 257 : 14723-14725, (1982).
3. Pfaffinger, P.J., Martin, J.M., Hunter, D.D., Nathanson, N.M., Hille, B. : GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K^+ channel. *Nature* 317 : 536-538, (1985).
4. Wheeler, G.L. and Bitensky, M.W. : A light activated GTPase invertebrate photoreceptors : regulation of light activated cyclic GMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 4238-4242, (1977).
5. Yi, F., Denker, B.M., Neer, E.J. : Structural and functional studies of cross-linked G_0 protein subunits. *J. Biol. Chem.* 266 : 3900 (1991).
6. Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. : GTPase super-family : A conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* 348 : 125 (1990).
7. Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, A. : Structure and function of signal transducing GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 60 : 349-400 (1991).
8. Johnson, G.L., Dhanasekaran, N. : The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr. Rev.* 10 : 317 (1989).
9. Wu, D.Lee C.H., Rhee, S.G., Simon, M.I. : Activation of phospholipase C by the α subunits of the G_q and G_{i1} proteins in transfected cos-7 cells. *J. Biol. Chem.* 267 : 1811, (1992).

10. Masters, S.B., Stroud, R.M., Bourne, H.M. : Family of G-protein α chains : amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Protein Eng.* 1 : 47 (1986).
11. Simon M.I. , Strathmann M.P , Gautam, N. : Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252 : 802 (1991).
12. Spiegel, A.M., Backlund, Jr.P.S., Butrynski, J.E., Jones, T.L.Z., Simonds, W.F. : The G protein connection : molecular basis of membrane association. *Trends. Biochem. Sci.* 16 : 338 (1991).
13. Johnson, G.L., Dhanasekaran, N., Gupta, S.K., Lowndes, J.M., Vaillancourt. R.R., Ruoho, A.E. : Genetic and structural analysis of G protein α subunit regulatory domains. *J. Cell Biochem.* 47 : 136 (1991).
14. Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T., Shimonishi, Y. : Farnesylated γ subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature.* 346 : 658 (1990).
15. Ohguro, H., Fukada, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Yoshizawa, T., Akino, T. : Carboxyl methylation and farnesylation of transducin γ subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin. *Embo J.* 10 : 3669 (1991).
16. Stryer, L. : *Biochemistry.* 978-981. Third Edition : W.H. Freeman and Company. San Francisco. (199).
17. Freismuth, M., Gilman, A.G. : G proteins and regulation of second messenger systems. *Clin. Pharm.* (1991).
18. Ross, E.M., Gilman, A.G. : Biochemical properties of hormone sensitive adenylate cyclase. *Ann. Rev. Biochem.* (1980).

19. Levitzki, A. : Regulation of adenylate cyclase by hormones and G proteins. FEBS Lett. 211 : 113-118 (1987).

20. Evangelopoulos, A.E., Changeux, J.P., Packer, L., Sotiroudis, T.G., Wirtz, K.W.A. : Regulation of adenylate cyclase in mammalian cells and *saccharomyces cerevisiae*. NATO ASI Series. Series H. Cell Biology, Vol. 29 : 26-27 (1991).

21. Herskowitz, I. and Marsh, L. : Conservation of a receptor / signal transduction system. Cell 50 : 995-996 (1987).

22. Vallar, L., Muca, C., Magni, M., Albert, P., Bunzow, J., Meldolesi, J., Civelli, O. : Differential coupling of dopaminergic D₂ receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LTK-fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH₄Cl cells. J. Biol. Chem. 265 : 10320 (1990).

23. Haraguchi, K., Rodbell, M. : Isoproterenol stimulates shift of G-proteins from plasma membrane to pinocytotic vesicle in rat adipocytes : a possible means of signal dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1208 (1990).

24. Nakamura, S., Rodbell, M. : Glucagon induces disaggregation of polymer-like structures of the α subunit of the stimulatory G protein in liver membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 7150 (1991).

25. Gudermann, T., Birnbaumer, M., Birnbaumer, L. : Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. J. Biol. Chem. 267 : 4479 (1992).

26. McKenzie, F.R., Milligan, G. : Opioid receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine nucleotide-binding protein G : *Biochem. J.* 267 : 391 (1990).

27. Matesic, D.F., Manning, D.R., Luthin, G.R. : Tissue-dependent association of muscarinic acetylcholine receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Mol. Pharmacol.* 40 : 347 (1991).

28. Housley, M.D. and Milligan, G. : G proteins and the regulation of ion channels. *Mol. Pharm. of Cell Regulation Vol 1* : 132-136 (1990).

29. Yatani, A., Okabe, K., Polakis, P., Halenbeck, R., McCormick, F., Brown, A.M. : Ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptors to atrial K^+ channels *Cell* 61 : 769 (1990).

30. Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., Clapham, D.E. : The β subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ -channel in hearts. *Nature.* 325 : 321 (1987).

31. Cockcroft, S., Gomberts, B.D. : Role of guanine nucleotide binding proteins in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 314 : 534-536, (1985).

32. Cockcroft, S., Stuchfield, J. : G proteins the inositol lipid pathway and secretion. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 320 : 247-265 (1985).

33. Blank, J.L., Ross, A.H., Exton, J.H. : Purification and characterization of two G proteins that activate the β 1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C : identification as members of the G_q class. *J. Biol. Chem.* 266 : 18206 (1991).

34. Fargin, A., Yamamoto, K., Cotecchia S., Goldsmith, P.K., Spiegel, A.M., Lapetina, E.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. : Dual coupling of the cloned 5-HT_{1A} receptor to both adenylyl cyclase and phospholipase C is mediated via the same G protein. *Cell Signal* 3 : 547 (1991).

35. Codina, J., Hildebrandt, J., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R.D., Manclarck, C.R. : Pertussis toxin substrate, the putative N_1 component of adenylyl cyclase, is an $\alpha\beta$ heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50 : 1276 (1988).
36. Taroh, Y.O., Michio, U.I. and Toshiaki, K. : Functional modification by cholera toxin catalyzed ADP-ribozoylation of a guanine nucleotide binding regulatory protein serving as the substrate of pertussis toxin. J. Biol. Chem. 202 : 635-641, (1991).
37. Lini, T., Ui, M., Katada, T. : Modification of the function of pertussis toxin substrate GTP binding protein by cholera toxin catalyzed ADP-ribozoylation. J. Biol. Chem. 267 : 1020 (1992).
38. Boss, J.L. : Ras oncogenes in human cancer. Cancer. Res. 49 : 4682 (1989).
39. Hall, A. : Ras and Ras-related guanine nucleotide binding proteins " Housley, M.D., Milligan, G. eds" Wiley, West Sussex, pp : 173-191 (1990).
40. Katada, T., Bokoch, G.M., Smigel, M.D., Ui, M., Gilman, A.G. : The inhibitory guanine nucleotide binding regulatory component of adenylate cyclase subunit dissociation and inhibitory of adenylate cyclase in s49 Lymphoma cyc^- and wild type membranes. J. Biol. Chem. 259 3589-3595 (1984).
41. Jones, D.T., Reed, R.R. : Molecular cloning of five GTP binding protein cDNA specific from rat liver olfactory neuroepithelium. J. Biol. Chem. 262 : 14241-14249 (1987).
42. Garibay, J.L.R., Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T., Matsuda, M., Kaziro, Y. : Analysis by mRNA levels of the expression of six G protein α -subunit genes in mammalian cells and tissues. Biochem. Biophys. Acta. 1094 : 193-199 (1991).

43. Homburger, V., Brabet, P., Audiger, Y., Pentaloni, C., Bockaert, J., Rouot, B. : Immunological localization of the GTP-binding protein G_0 in different tissues of vertebrates and invertebrates. *Molec. Pharm.* 31 : 313-319 (1987).
44. Spiegel, A.M., Shenker, A. and Lee, Weinstein, L.S. : Receptor-effector coupling by G proteins : Implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Rev.* Vol 13. No.3 : 536-565 (1992).
45. Lowry, O., Rosebrough, H., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193 : 265-275 (1951).
46. Laemmli, U.K. : Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685 (1970).
47. Spiegel, A.M. : G proteins in clinical medicine hospital practise. 93-112 (1988).
48. Jordan, F.L. : Distribution and expression of G protein in rat cerebral cortical cells. I. Intact tissue. *Dev. Brain Res.* 67 : 1-10 (1992).
49. Mullaney, I., Milligan, G. : Elevated levels of the guanine nucleotide binding protein, G_0 , are associated with differentiation of neuroblastoma x glioma hybrid cells. *FEBS. Lett.* 244 : 113-118 (1989).
50. Offermans, S., Schafer, F., Hoffman, B., Bobbien, E., Spicher, K., Hinsch, D., Scultz, G., Rosenthal, W. : Agonist-sensitive binding of photoreactive GTP analog to a G protein-subunit in membranes of HL60 cells. *FEBS. Lett.* 260 : 14-18 (1990).
51. Gierschik, P., Morrow, B., Milligan, G., Rubin, C., Spiegel, A. : Changes in the guanine nucleotide-binding proteins, G_1 and G_0 , during differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS. Lett.* 99 : 103-106 (1986).