

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**K562 VE MEL HÜCRE MODELİNDE
G PROTEİNLERİNİN FARKLILAŞMA
ÜZERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BAHİRE KÜÇÜKKAYA

Danışman: Doç.Dr. BEKİ KAN

İstanbul 1992

Lisansüstü tez çalışmamda değerli bilgi ve görüşlerinden yararlandığım 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 Marmara Üniversitesi Hastahanesi İmmünoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr. Tefik Akoğlu ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Engin Bermek'e ayrıca bu çalışmamda bana yardımcı olan herkese teşekkür ederim. Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Eczacıbaşı Bilimsel Araştırma ve Ödül Fonu'na ve Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Guanin nükleotidlerini bağlayan proteinler (G proteinleri)	1
1.2. G proteinleri aracılığı ile gerçekleşen olaylar	2
1.3. G proteinleri arasındaki ortak özellikler	4
1.4. ADP-ribozillenme	4
1.5. Yapı ve İşlev	5
1.6. Farklı türdeki memelilerde G protein α altbirim dizilimlerinde benzer bölgeler; Evrimsel korunum	8
1.7. GTP az siklusu	8
1.8. Düşük molekül ağırlıklı GTP bağlayan proteinler	9
1.9. G protein-reseptör etkileşimi	10
1.10. G proteinlerinin izolasyonu ve tanımlanması	14
1.11. G protein araştırmalarında immünolojik problemler	16
1.12. Normal eritropoiesis	18
1.13. MEL ve K562 hücrelerinde eritroid farklılaşma	19
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
2.1. Kimyasal maddeler	21
2.2. Radyoaktif maddeler	22
2.3. İmmünolojik problemler	22
2.4. Elektroforetik gereçler	22
2.5. Çalışmada kullanılan aletler	22
2.6. Tampon ve çözeltilerin bileşimi	23
2.7. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu	29
2.8. K562 ve MEL Eritrolösemi Hücrelerinin Çoğaltılması	29
2.9. K562 ve MEL Eritrolösemi Hücrelerinin Farklılaşmaya İndüklenmesi	31

2.9.	Benzidin Boya Yöntemi	31
2.10.	Membran Kesimlerinin Hazırlanması	31
2.11.	Protein İçeriklerinin Belirlenmesi	32
2.12.	Hücre Kesimlerinden Elde Edilen Protein Örneklerinin Denatüre Edilmesi	32
2.13.	(³⁵ S) GTP γ S Bağlama Testi	32
2.14.	(³ H) GTP Bağlama Testi	33
2.15.	Radyoaktivitenin Ölçülmesi	33
2.16.	Hücre Özütü, S-30 ve P-30 Kesimlerinin Elektroforetik Analizi	33
2.17.	Elektroforetik Transfer	33
2.18.	İmmünolojik Belirleme-Western Blot (Alkolen Fosfotaz Sistemi)	35
2.19.	Molekül Ağırlığı Tayini	37
3.	BULGULAR	38
3.1.	K562 ve MEL Hücrelerinin Üretilmesi ve Hücre Alt Kesimlerinin Hazırlanması	38
3.2.	Kontrol ve Farklılaşmış K562 ve MEL Hücre Alt Kesimlerinde Guanin Nükleotid Bağlama Etkinliği Üzerinde Çalışmalar	40
3.2.1.	Hücre Alt Kesimlerinde (³ H) GTP Bağlama Etkinliği	40
3.2.2.	Hücre Alt Kesimlerinde (³⁵ S) GTP γ S Bağlama Etkinliği	41
3.2.3.	K562 Membran Kesimlerinde (³⁵ S) GTP γ S Bağlama Koşullarının Belirlenmesi	42
3.2.3.1.	Zaman Kinetiği	42
3.2.3.2.	Derişim Eğrisi	44

3.3.	Kontrol ve Farklılaşmış Hücre Kesimlerinde G protein Miktarlarının İmmünolojik Problar Kullanılarak Karşılaştırılması	45
4.	TARTIŞMA	49
5.	ÖZET	53
6.	SUMMARY	54
7.	KAYNAKLAR	55



1. GİRİŞ

Hücre içi sinyal ileti sistemlerinde, guanin nükleotidlerini bağlayan proteinler olarak bilinen G proteinleri, hücre zarı tarafından alınan sinyallerin hücre içi sinyallere dönüştürülmesinde görev alan aracı moleküllerdir. Ayrıca hücre içi taşınım ve salgılama olaylarını düzenledikleri düşünülmektedir.

Yakın zamanlarda yürütülen çalışmalar G proteinlerinin hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Biz bu çalışmada, G proteinlerinin hücre farklılaşmasında da rol oynayabileceğini düşündüren çalışmalar ışığında eritroid hücre farklılaşmasında G proteinlerinin olası rolünü incelemeyi amaçladık.

Normal eritroid öncü hücrelerin uzun süre kültürde tutulması ve farklılaşmanın kritik aşamalarında senkronize olmuş hücre topluluğunu elde etmek oldukça zordur. Bu nedenle hücre kültürlerinde çoğaltılabilen Friend virüs kompleksi ile enfekte olmuş fare dalaklarından elde edilen fare eritrolösemi hücreleri (MEL) ile insan eritrolösemi hücrelerini (K562) model olarak seçtik.

1.1. Guanin Nükleotidlerini Bağlayan Proteinler (G Proteinleri)

Hücreler birbirleriyle nörotransmitterler, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi çeşitli sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu moleküllere yanıt veren hücrelerin plazma zarlarında o moleküle özgü reseptörler mevcuttur. Reseptörün bir agonist tarafından uyarılmasıyla hücre içerisinde sinyale yol açan reaksiyonlar dizisi başlar. Bunun sonucu olarak hücrenin davranışında değişiklik gözlenir. Örneğin; bir enzimin salgılanması, kas kasılması yada hücre bölünmesinin başlaması bu olayların arasında yer alır. Aralarında rodopsin, muskarinik asetilkolin reseptörü, adrenerjik reseptör gibi moleküller bulunan bir reseptör sınıfı G proteini olarak adlandırılan ve hücre zarına bağlı bir çevireç (transducer) proteini uyararak etkisini gösterir (1).

Günümüze değin farklı hücre içi olaylarını düzenleyen birçok G proteini bulunmuştur. G proteinleri aracılığıyla düzenlenen sinyal ileti sistemlerinde üç farklı bileşen mevcuttur: (a) reseptör molekülü, (b) bir efektör bileşeni (bir yada birden fazla molekül) ve (c) reseptör ile efektör arasında köprü görevini üstlenen bir G proteini G protein reseptörlerinin birçoğu membranı yedi kez kat eden ve membran dış yüzeyi boyunca uzanan glikoproteinlerdir (2). Bu reseptörler G proteinini etkinleştirerek sinyalin efektöre ulaşmasını sağlarlar. Efektör genellikle adenilat siklaz, fosfolipaz C yada fosfodiesteraz gibi ikinci haberci metabolizmasının bir enzimidir; bazı durumlarda ise kalsiyum yada potasyum iyonlarının geçişini düzenleyen bir iyon kanalı olabilir.

1.2. G Proteinleri Aracılığı ile Gerçekleşen Olaylar

İlk tanımlanan G proteini, siklik AMP'nin yapımını uyardığı için "**Stimulatory**" (uyarıcı) olarak adlandırılan G_S 'dir. Çifte kontrole tabi olan adenilat siklaz sistemindeki bir diğer G proteini siklik AMP'nin oluşumunu baskılayan "**inhibitory**" G_i ' dir. G_S ve G_i proteinleri, efektör olarak adenilat siklazı kullanırlar. G_i proteinlerinin adenilat siklaz, fosfolipaz C ve K kanallarını hangi mekanizmayla uyardıkları henüz ayrıntılarıyla bilinmemektedir. Ancak G_S ve transdusin (G_T)' in etki mekanizmaları açıklığa kavuşmuştur. G proteinlerinin koku alma duyusu açısından önemi çok yakınlarda ortaya çıkmıştır. Henüz kimliği belirlenememiş bir koku reseptörüne bağlanan ve G_S ' e benzeyen bir proteinin adenilat siklazı ve Na/K antiport sistemini uyardığı düşünülmektedir (3-4). Bugünkü bilgilerimizin ışığında, G proteinleri aracılığı ile gerçekleşen olaylar; Tablo 1.' de gösterilmiştir.

<u>Uyaran</u>	<u>Etkilediği Hücre tipi</u>	<u>G Protein</u>	<u>Efektör</u>	<u>Etki</u>
Epinefrin Glukagon	Karaciğer Hücreleri	G _s	Adenilat Siklaz	Glikojen yıkımı
Epinefrin Glukagon	Yağ Hücreleri	G _s	Adenilat Siklaz	Yağ yıkımı
Luteinleştirici Hormon	Over Folikülleri	G _s	Adenilat Siklaz	Östrojen ve progesteron sentezinde artma
Antidiüretik hormon	Böbrek Hücreleri	G _s	Adenilat Siklaz	Böbreklerde suyun tutulması
Asetilkolin	Kalp kası Hücreleri	G _s	K ⁺ Kanalı	Kalp atışı yavaşlaması ve pompalama gücünde azalma
Enkefalinler Endorfinler, Opioidler	Beyin Nöronları	G _i /G _o	Ca ⁺⁺ ve K ⁺ kanalları Adenilat Siklaz	Nöronların elektriksel aktivitesinde değişiklik
Angiotensin	Kan damar- larında, düz kas hücreleri	G _q	Fosfolipaz C	Kas kasılması, kan basıncı artışı
Odorantlar	Burundaki nöroepitel- yum hücresi	G _{olf}	Adenilat Siklaz	Odorantların belirlenmesi
Işık	Retinadaki koni ve çubuk hücreleri	G _t	cGMP Fosfodi- esteraz	Görsel sinyallerin belirlenmesi
Feromon	Ekmek Mayası	G _{PA1}	Bilinmi- yor	Çiftleşme hücreleri

Tablo 1. G proteinleri aracılığıyla gerçekleşen fizyolojik olaylar.

1.3. G Proteinleri Arasındaki Ortak Özellikler

G proteinleri arasında farklılıklar olduğu gibi onları birleştiren ortak özellikler de vardır.

-Hücre zarının sitoplazmik yüzünde membrana gömülü olarak bulunan G proteinleri α , β ve γ altbirimlerinden oluşan heterotrimerik proteinlerdir.

-G proteinleri, sinyal ileti sistemlerinde reseptör ile efektör arasında çevireç (transducer) görevini üstlenen aracı protein molekülleridir.

-G proteinlerinin α altbirimleri aynı zamanda artı iki değerlikli Mg iyonları için en azından bir tane yüksek afiniteli (ilgili) bağlanma bölgesi içerir. (Mg^{++} , GTP' nin aktivasyonunda fizyolojik ligand olarak gereklidir).

-G proteinleri inaktif (bazal) durumdayken α altbirimine GDP bağlanırken, etkin hale geçtiklerinde GTP bağlanır.

-G proteinlerinin hemen hemen hepsi Vibrio kolera (difteri) ve Pertussis (boğmaca) gibi bakteriyal toksinlerle ADP-ribozillenir.

1.4. ADP-Ribozillenme

Bakteri toksinlerinin birçoğu NAD'nin ADP-riboz grubunu GTP bağlayan proteinlere özgün olarak aktarılmasını katalizleyen etkinliklere sahiptir. Örneğin; difteri (Vibrio kolera) toksini, elongasyon faktörü 2 (EF-2)' yi ADP-ribozillereyerek protein sentezini durdurur. Vibrio kolera toksini, Gs' in ADP-ribozillenmesini katalizleyerek GTP hidrolizini engeller, böylelikle adenilat siklazı geriye dönüşümsüz olarak uyandırır. Pertussis (boğmaca) toksini ise GDP bağlı konformasyonda G_i ve G_o ailesini ADP-ribozillereyerek reseptörle etkileşimini ve GTP bağlama etkinliklerini engeller (5). Pertussis (boğmaca) toksininin, G proteinleri üzerinde ADP-ribozillediği grup α altbiriminin karboksil ucundan dört amino asit uzaklıkdaki sistein'dir (6). (sistein grubu G proteinin reseptörle etkileşiminden sorumludur.) ADP-ribozillenme sonucu olarak

G proteinleri ile reseptörleri kenetlenemez (6). GDP/GTP değiş tokuşu, GTP az etkinlikleri ve adenilat siklazın baskılanması gibi fiziksel özellikler G proteinlerinin ADP-ribozillenmesiyle değişmemektedir (7). Böylelikle yalnızca reseptör aracılı sinyallerin iletilmesi engellenmektedir.

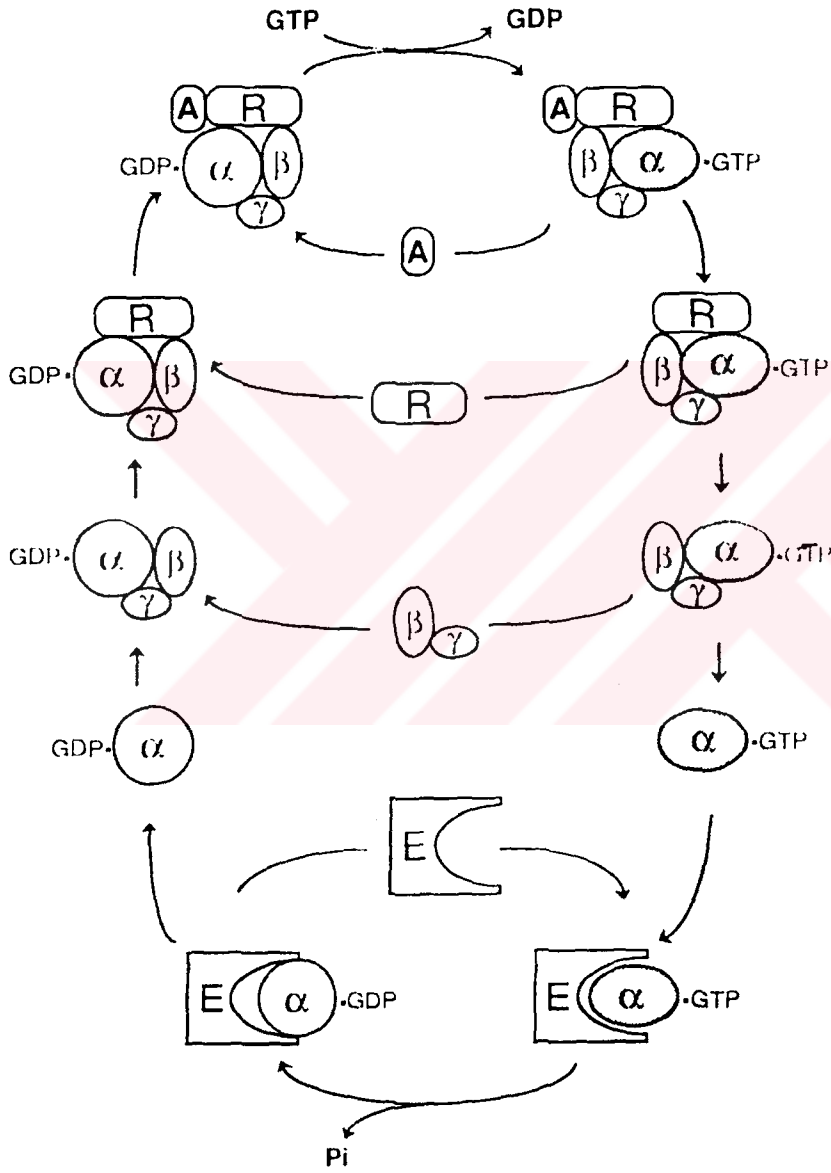
Öte yandan G_s (Stimulatory G protein) ve G_t (transdusin) de kolera toksiniyle ADP-ribozilenme α altbiriminin ortasına yakın arginin grubunda olur. (45 kDa'lık G_s 'de Arg 187'de olur.) G proteinlerindeki bu bölgenin GTP'nin γ -fosfat grubuyla etkileşiminden sorumlu bölgeye yakın olması nedeniyle ADP-ribozillenme G proteinlerinin intrinsik GTPaz etkinliğinde azalmaya neden olmaktadır (8-10). α altbirimlerine göre çeşitlendirilen G proteinlerinin toksin duyarlılıkları Tablo 2.'de gösterilmiştir.

Altbirim	Alt Tip Sayısı	Molekül Ağırlığı (kDa)	Toksin Duyarlılığı
α_s	4	45-52	Kolera Toksini
α_i	3	40-41	Pertussis Toksini
α_o	1	39	Pertussis Toksini
α_t	2 (çubuk Koni)	40	Petrussis ve Kolera Toksini
$\alpha_z(x)$	1	Bilinmiyor	Bilinmiyor
p21ras	bir kaç	21	Bilinmiyor

Tablo 2. α altbirimlerine göre çeşitlendirilen G proteinlerinin toksin duyarlılıkları.

1.5. Yapı ve İşlev

α , β , γ altbirimlerinden oluşan G proteinleri elde edildikleri tür ve dokuya göre veya translasyon sonrası kovalent modifikasyonlara bağlı olarak çeşitli farklılıklar gösterirler ve α altbirimlerindeki farklılıklara göre sınıflandırılırlar. α altbirimlerini kodlayan 9 gen ve bunların ürünü olan 12 polipeptit belirlenmiştir. Herbir α altbirimi guanin nükleotidlerine yüksek ilgisi olan bir bağlanma bölgesine ve GTPaz etkinliğine sahiptir.



Şekil 1. Sinyal transdüksiyonunda G proteinlerinin rolü

Reseptörlerle düzenlenen adenilat siklaz sistemi ve ışık uyarısıyla etkinleşen cGMP fosfodiesteraz kompleksi üzerinde yapılan çalışmalar G proteinlerinin etki mekanizmasıyla, ilgili bir modelin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (11).

G proteinleri inaktif (sessiz) durumdayken GDP'yi sıkıca bağlarlar. Bu konumdaki G proteinin spontan olarak uyarısı yavaştır. Reseptörün kendine özgü birinci haberci molekülü (agonist; sinyal molekülü) ile uyarılması, G protein ile reseptörün etkileşimini başlatır. Üç boyutlu yapıdaki olası bir değişiklik sonucunda GDP serbestlenerek GTP bağlanır. Birinci haberci molekülünün varlığında G proteinin GDP'ye ilgisi azalırken, GTP'ye ilgisi artmaktadır. GTP'nin bağlanması üzerine reseptör molekülü G proteininden ayrılır ve etkinleşen G proteini, efektör molekülünü etkinleştirerek hücre içi sinyalin oluşmasına neden olur.

Efektör aktivasyonunun kalıcı olması istenmediğinden sistemin kapatılıp sinyal taşınımının sonlanması gerekmektedir. G proteinin GTPaz etkinliği ile kendisine bağlı GTP'nin terminal fosfatı hidrolizlenerek inorganik fosfat ortama verilir. G proteini GDP kompleksi ilgisini yitirerek hedef enzim sisteminden ayrışır ve heterotrimerik inaktif yapıya dönen G proteini etkinliğini yitirir. α altbiriminin geniş heterojenliğine rağmen birinci habercinin hücre zarına bağlanmasıyla α altbiriminin reseptörle etkileşimini kolaylaştırdığı düşünülen $\beta\gamma$ kompleksi, sınırlı bir heterojenlik göstermektedir. $\beta\gamma$ altbirimleri birbirleriyle sıkı sıkıya ilişkilidirler ve ikisi birlikte etkili formu olan $\beta\gamma$ kompleksini oluştururlar.

$\beta\gamma$ alt birimlerinden; β alt birimi iki gen tarafından kodlanır. Bu iki gen tarafından kodlanan β_1 yada β_{36} ve β_2 yada β_{35} olarak adlandırılan bu iki polipeptidin amino asit dizileri % 10 farklılık göstermektedir. β ve γ alt birimlerinin moleküler yapısı tümü ile bilinmemektedir. $\beta\gamma$ altbirimlerinin adenilat siklaz ve fosfolipaz A2 gibi efektörleri, direkt olarak düzenleyebileceğini gösteren çalışmalar vardır(12). G proteini etkinleştğinde α altbiriminden ayrılan $\beta\gamma$ kompleksinin aynı zamanda α altbiriminin efektörle etkileşimini baskılayan bileşen olduğu düşünülmektedir. Eğer gerçekten böyle ise G proteinin aç-kapa anahtarı, altbirimlerin ayrışması ve tekrar birleşmesinden oluşmaktadır.

1.6. Farklı Türdeki Memelerde G Protein α Altbirim Dizilimlerinde Benzer Bölgeler; Evrimsel Korunum

Tablo 3' de görüldüğü gibi her bir G protein α altbiriminin genel yapısındaki benzerliklerin yanısıra amino asit dizileri farklı memeli türlerinde korunmuştur (13). $G_{s\alpha}$ ' nin amino asit dizilimi insan ve sıçanda oldukça korunmuştur: 394 amino asitten sadece bir tanesi farklıdır. $G_{i1\alpha}$ ' nin dizisi sığır ve insanda tamamen aynıdır. $G_{i2\alpha}$, $G_{i3\alpha}$, $G_{o\alpha}$ ve $G_{x\alpha}$ ' nin amino asit dizileri ise farklı memeli türlerinde % 98 oranında benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik her bir G protein gen ürününün özgün fizyolojik işlevinin korunması için evrimsel bir baskı faktörünün varlığını sezdirmektedir.

<u>Türler</u>		<u>Amino asit Dizileri</u>	<u>Nükleotid Dizileri</u>
r $G_{s\alpha}$	h $G_{s\alpha}$	393/394 (% 99.7)	1128/1197 (% 95.4)
b $G_{i1\alpha}$	h $G_{i1\alpha}$	354/354 (% 100)	998/1062 (% 94.0)
r $G_{i2\alpha}$	h $G_{i2\alpha}$	350/355 (% 98.6)	985/1065 (% 92.4)
r $G_{i3\alpha}$	h $G_{i3\alpha}$	349/354 (% 98.6)	981/1062 (% 92.4)
r $G_{o\alpha}$	h $G_{o\alpha}$	348/354 (% 98.3)	992/1062 (% 93.4)
r $G_{x\alpha}$	h $G_{x\alpha}$	349/355 (% 8.3)	977/1065 (% 91.7)

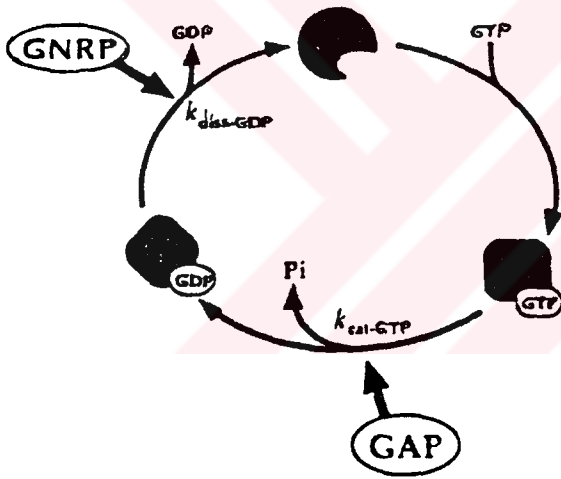
Tablo 3. G protein α altbirim dizilerinin farklı memeli türlerinde korunma düzeyleri; r:rat (sıçan), h:human (insan), b:bovine (sığır)

1.7. GTPaz Siklusu

GTPaz siklusu boyunca G proteini üç farklı konformasyondan geçer (Şekil 2.). G proteinine bağlı GDP' nin serbestlenmesi ile "inaktif" konformasyon yerini geçici "boş" konformasyona bırakır. Sitoplazmadaki koşullar altında boş olan guanin nükleotid bağlanma bölgesine GTP' nin bağlanma olasılığı GDP'ye kıyasla daha yüksektir; GTP' nin bağlanmasıyla G protein "aktif" konformasyona geçer ve ardından GTP'nin hidrolizlenmesi ile tekrar GDP bağlı "inaktif" konumuna döner. GTPaz' ların birçoğunda GDP'nin serbestlenme hızı ve GTP hidroliz tepkimeleri için intrinsik hız sabitleri (k_{disGDP} ve k_{catGTP}) oldukça düşüktür. ($k < 0.03/dak$) Düzenleyici proteinler sınıfına ait iki grup protein varlığında bu hız artar. Bu prote-

inler: (a) G proteinine bağılı GDP' yi serbestleyerek GTP ile yer değiştirmesini sağlayan guanin nükleotidleri serbestleyen proteinler (GNRP-guanine nucleotide release proteins) (b) bu siklusda geriye dönüşümsüz adım olan GTP hidroliz tepkimesini hızlandıran GTPaz' ı uyarıcı proteinler (GAP-GTPase activating proteins)'dir.

G proteinlerinin hücresel işlevleri aktif (GTP bağlı) yada inaktif (GDPbağlı) G protein düzeylerinin göreceli olarak değişmesi suretiyle düzenlenir. GNRP ya da GAP' lardan bir tanesinin düzenlenme mekanizmasından sorumlu olduğu düşünölmektedir. GTP hidrolizinin geriye dönüşümsüz olması bu siklusun tek yönde ilerlemesini sağlar (14). Günümüze değin karakterize edilmiş GTPaz' lar ribozomal protein sentezinin yönlendirilmesinde görev alan EF-TU ve sinyal ileti sistemlerindeki G proteinleridir (15).



şekil 2. G proteinlerinde GTPaz siklusu

GAP:GTPaz' ı aktive edici protein

GNRP: Guanin nükleotidi serbestleyici protein

1.8. Düşük Molekül Ağırlıklı GTP Bağlayan Proteinler

Hras, Kras ve Nras genleri tarafından kodlanan 21 kDa' luk proteinler guanin nükleotidlerini bağlamaları, GTPaz etkinliği içermeleri ve plazma zarının sitoplazmik yüzünde bulunmaları açısından G protein α altbirimleriyle benzerlik gösterirler.

İmmünblot ve cDNA teknikleri sayesinde, guanin nükleotid bağlayan ras proteinlerinin geniş bir ailenin üyeleri olduğu belirlenmiştir. Bu ailenin özgün işlevi henüz tanımlanamamıştır. Ancak amino asit dizilerinin evrim boyunca korunmuş olması, bunların hücre fonksiyonunda kritik rolleri olduğunu düşündürmektedir. Bu ailenin birkaç üyesi direkt amino asit dizilim teknikleriyle saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Bazı üyeleri G protein altbirimlerine özgü antikorlarla plazma membranından saflaştırılmıştır. ARF ve G_p olarak adlandırılan iki düşük molekül ağırlıklı GTP bağlayan protein tavşan karaciğerinden, insan plasentasından ve sığır beyininden saflaştırılmıştır (16, 17). Önceleri ARF, G_s' in kolera toksiniyle ADP-ribozillenmesi için gerekli olan bir kofaktör olarak tanımlanmış sonra yalnızca GTP bağlayan bir protein olduğu belirlenmiştir. İmmünokimyasal çalışmalar G_p' nin ARF'den ve ras proteinlerinden farklı olduğunu göstermiştir (18).

Sığır beyin plazma membranından GTP'yi bağlayan 6 tane düşük molekül ağırlıklı protein saflaştırılmıştır (19). Düşük molekül ağırlıklı GTP bağlayan proteinlerin bazıları rho gen ürünlerini içermektedir. Bunlar bazı botulinum toksinleriyle ADP-ribozilasyonun katalizlenmesinde substratları oluştururlar (20). Botulinum toksin substratları olan 22-24-26kDa'luk diğer düşük molekül ağırlıklı GTP bağlayan proteinler insan nötrofil membranlarından saflaştırılmıştır (21). Düşük molekül ağırlıklı GTP bağlayan proteinlerden bazıları çözünebilir yapıda bulunabilir. ARF beyin sitozolünden de saflaştırılmıştır (22). Bu proteinlerin çözünebilir olanları ile membrana bağlı olanları birbirinden farklıdır. Ras GTP proteinlerinin işlevi hücre tipine göre değişmektedir. Ras GTP fibroblast hücrelerinde proliferasyonu uyarırken, (Pheochromagoma) PC12 hücrelerinin, nörotik hücrelere farklılaşmasını uyarır (23). Maya (*Sacchomyces Cerevisice*)' daki ras proteinleri Ras1 ve Ras2, adenilat siklazı uyarır (15).

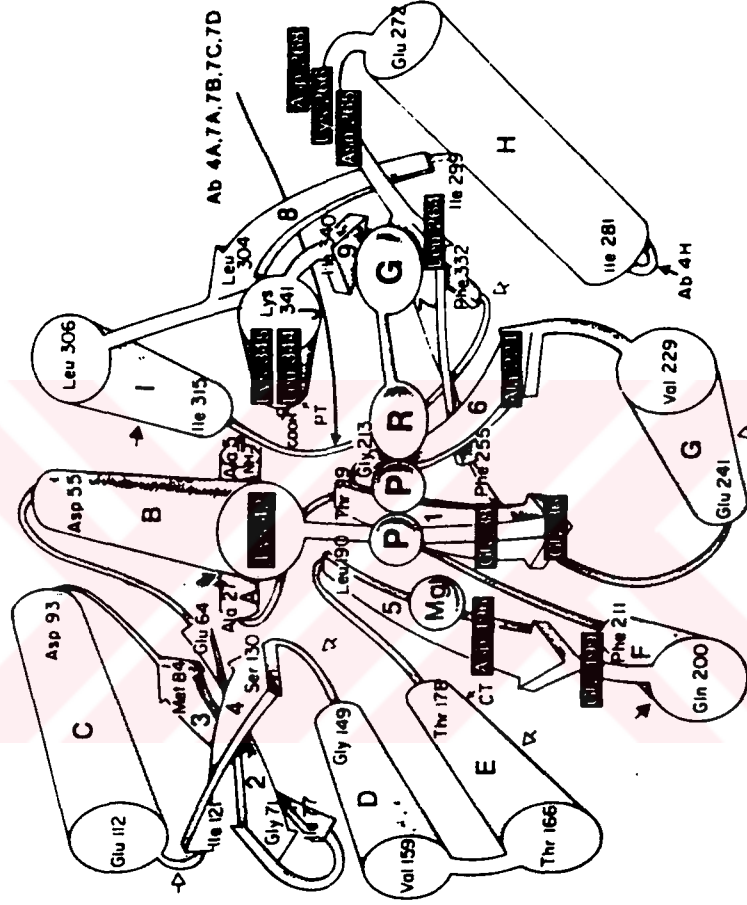
1.9. G Protein - Reseptör Etkileşimi

GTP bağlayan proteinlerin çeşitli duyu ve hormon reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen transdüksiyon (sinyal dönüşümü) olaylarındaki rolü yoğun araştırmaların konusunu oluşturmaktadır. Görsel transdüksiyon sistemi bazı avantajları ile reseptör-G protein etkileşimini moleküler düzeyde incelemek için uygun bir modeldir. Fotoreseptör hücreleri olan çubuk ve konilerde rodopsin' in ışıkla uyarılması cGMP düzeylerini düşüren bir biyokimyasal tepkimeler dizisini etkinleştirerek plaz-

ma membranında hiperpolarizasyona ve iyon kanallarının kapanmasına yol açar. Işıқта uyarılmış rodopsin bu etkisini cGMP fosfodiesterazı etkinleştiren G_t (Transdüsin)'i uyararak oluşturur. Çubuklarla yürütülen çalışmalar etkinleşen her rodopsin molekülü için bir saniye içinde en azından 1000 G protein molekülünün etkinleştiğini göstermektedir. Bu süre içinde etkinleşmiş reseptör bir G proteinine bağlanmakta ve G protein iki farklı konfigürasyondan geçmektedir: guanin nükleotid bağlanma bölgesi (cebi) açılarak GDP serbestlenmekte ikincisinde GTP' ye bağımlı olarak reseptör ve $\beta\gamma$ kompleksine ilgi azalmakta, fosfodiesteraza ilgi artmaktadır.

Retinadaki görsel reseptör kromofor niteliğindeki retinal içerdiği için bu sistemde reseptör-G protein etkileşimi spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Retinalin soğurma spektrumu (tayfı) uyarı süresince rodopsindeki yapı değişikliğine bağlı olarak değişir. G_t özellikle meta rodopsin II konformasyonuna bağlanır ve bu bağlanma uygun durumlarda spektroskopik olarak belirlenebilir (Şekil 3.).

Aşağıda belirtilen çalışmalar α altbiriminin yapı-işlev bağlantısına ışık tutmak ve $\beta\gamma$ kompleksi, rodopsin ve fosfodiesteraz ile etkileşim bölgelerini incelemek amacıyla yürütülmüştür. Bu deneyler aynı zamanda Deretic ve Hamm' ın önerdiği modelin geçerliliğini sorgulamak amacıyla taşımaktadır. $G_{t\alpha}$ proteinin N ucu $\beta\gamma$ kompleksi ile etkileşiminde önemlidir. α_t ' nin N ucu Staphylococcus aureus V8 proteinaz etkisiyle çıkarıldığında, $\alpha\beta\gamma$ ' nın varlığı da proteoliz olayını yavaşlatmaktadır (25). Ancak α altbiriminin N ucu bölgesinin $\beta\gamma$ altbirimiyle direkt etkileşime girdiği kesin olarak gösterilmiş değildir. Bir diğer olasılık bu bölgenin α altbiriminde heterotrimer olan bir konformasyonu gerçekleştirmesidir. Eğer $\beta\gamma$ etkileşimi yalnızca proteinin N ucu bölgesinde gerçekleşiyorsa aynı $\beta\gamma$ altbirimi ile etkileşen çeşitli α altbirimlerin de bu bölgedeki dizilerin korunmuş olması beklenir. Bunun böyle olmaması $\beta\gamma$ etkileşimi için diğer bölgelerinde katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, Hingorani ve arkadaşları G_t altbirimlerinin kimyasal olarak çapraz bağlanma ürünlerini inceleyerek α_t ' nin 5kDa'luk C (karboksil) ucu bölgesinin β_t ile direkt olarak etkileştiğini göstermişlerdir (26). Ayrıca Kahn ve Gilman'da α altbiriminde 196. konumda bulunan Arginin'in kolera toksiniyle ADP-ribozillenmesi $\beta\gamma$ ucu ilgisini değiştirdiğini saptamışlardır; bu bulgu proteinin bu bölgesinin $\beta\gamma$ bağlanma bölgesine katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir (27).



Şekil 3. Gt α altbirimindeki işlevsel bölgelerin bilinen özelliklerini göstermektedir.

C ucu reseptörle etkileşim için önemlidir. G_t ' nin C ucundaki 347. amino asit olan sistein'in pertussis toksiniyle ADP-ribozillenmesi, G_t ' in (ve aynı zamanda diğer pertussis toksin substratlarını) reseptör ile kenetlenmesini engeller (14). G_t ' nin rodopsin'le etkileşimini bloke eden monoklonal antikoların etkileşim bölgeleri G_t ' nin 5 kDa'luk C ucu içindedir (27). S49 lenfoma hücrelerinde 390. amino asit olan Arginin'in prolin'e değişimiyle gerçekleşen unc mutasyonu C-ucunun reseptörle etkileşimdeki önemine ek kanıt sağlamaktadır (28). Ayrıca α_t ' nin C ucunda, iki bölgeye özgün sentetik peptitler rodopsin'e bağlanarak rodopsin- G_t etkileşimini engellemektedirler.

Efektörle etkileşim için bağlanma bölgeleri henüz bilinmemektedir. Ancak mantıklı bir olasılık olarak α altbiriminin GDP bağlı inaktif konformasyondan, GTP bağlı aktif konformasyona geçişi esnasında uzaysal yapısında değişiklik gösteren bölgelerin efektörle etkileşimden sorumlu olduğu düşünülebilir. GTP bağlayan proteinler içinde yapıları bilinen EF-Tu ve p21 ras proteininde, GTP' nin bağlanmasıyla fosfat bağlanma bölgesine yakın enazından iki bölgenin üç boyutlu yapısında değişiklik saptanır (29).

P21' de efektör bağlayan bölgeler olan serin 17 ve tirozin 40 gruplarındaki uzaysal değişiklik sonucu p21'in olası efektör proteini olan GTPaz'ı etkinleştirici protein (GAP) bağlanabilir. Proteinin diğer bölgelerinde de konformasyonel değişiklik belirlenmiştir. Bu bölgesel konformasyonel değişiklikler şüphesiz molekülün birbirinden uzak bölgeleri arasında olabilmektedir.

1.10. G Proteinlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Rodbell ve arkadaşları adenilat siklazın hormonal uyarısında guanin nükleotidlerinin kritik rolünün olduğunu göstermeleri önce G_s ' in ve ardından sinyal iletiliminde aracı olan heterotrimerik G proteinleri ailesinin diğer üyelerinin saflaştırılmasına yol açmıştır. Adenilat siklazın uyarılmasında aracı olan G_s reseptör-adenilat siklaz kompleksinin diğer bileşenlerinden GTP ilgi kromatografisi yöntemiyle uzaklaştırılarak izole edilmiştir (30). Mutant S49 fare lenfoma hattı cyc ile yürütülen araştırmalar reseptör, adenilat siklaz ve G_s ' in farklı bileşenleri olduklarına dair bulguları desteklemiştir (37). G_s etkinliğinden yoksun olan bu mutant hücre hattı aynı zamanda G_s ' in saflaştırılması için gerekli işlev testinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Önceleri, saflaştırılmış G_s ' in 45 kDa ya da 52 kDa' luk α ve 35 kDa' luk β altbirimlerinden oluştuğu gösterilmiştir (31). α altbirimleri daha önceleri guanin nükleotid bağlayıcı birim olarak tanımlanan altbirimlerle aynı olup, aynı zamanda kole- ra toksiniyle katalizlenen ADP-ribozillenme reaksiyonunun substratını oluşturuyordu (32). Sonraları retinal G protein transdusini yada G_t 'de olduğu gibi G_s ve diğer G proteinlerinde de düşük molekül ağırlıklı bir $\alpha\beta$ altbirimlerinin varlığı anlaşılmıştır.

Retinal fotoreseptör çubuk hücrelerinde görsel transdüksiyon (Sinyal dönüşümü) mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için yürütülen araştırmalar foton reseptörü olan rodopsin ile cGMP fosfodiesterazı kenetleyen heterotrimerik yapıda bir G proteinin (G_t) izolasyonu ile sonuçlanmıştır (33). Çubuk dış segment membranının kolaylıkla hazırlanabilmesi, G_t ' nin bu membranda oldukça fazla miktarda bulunması ve G_t ' nin su içerikli tamponlarla özütlenmesi sayesinde bu proteinin ayrıntılı biyokimyasal analizi özgün antiserum eldesi ve her üç altbirimin amino asit diziliminin belirlenmesi çalışmalarına yetecek miktarlarda saflaştırılmıştır (34).

Rodbell grubunun ön çalışmaları guanin nükleotidlerinin adenilat siklaz inhibisyonunda önemi olacağını gösterdi. Ui ve arkadaşları da 41 kDa'luk bir proteinin pertussis toksini ile katalizlenen ADP-ribozillenme tepkimesi sonucunda adenilat siklazın inhibe olduğunu göstermişlerdir. Böylelikle çalışmalar adenilat siklazın inhibisyonunda aracılık eden farklı bir G proteinin (G_i) saflaştırılması yönünde yoğunlaşmıştır. Pertussis toksiniyle katalizlenen ADP-ribozillenme tepkimesi kullanıla-

rak tavşan karaciğeri ve insan eritrositlerinden olası G_i proteinleri saflaştırılmıştır (35, 36). G_S ve G_t ' de olduğu gibi G_i ' nin de heterotrimerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Daha sonra heterotrimer yapıda olan birçok G proteini tanımlanmış ve saflaştırılmıştır. Beyinin GTP bağlayan proteinler için zengin bir kaynak olduğu anlaşılmış, beyin membran proteinlerinin yaklaşık % 1-2'sini oluşturan yeni bir G proteini (G_0) bulunmuştur (37). Olası G protein α altbirimlerini kodlayan cDNA'ların klonlanması ile G protein ailesinin oldukça heterojen olabileceği ortaya çıkmıştır. G proteinleri aracılığıyla gerçekleşen diğer işlevler arasında çeşitli iyon kanallarının ve ikincil ulak metabolizmasının diğer enzimlerinin etkinliklerinden de söz edebiliriz. Birçok durumda belli bir cDNA' ya ait yeni G proteinleri saflaştırılmış özgün peptid antikorlarıyla etkileştirilerek ya da amino asit dizileri belirlenerek tanımlanmış, ancak yapısal tayinleri yapılmamıştır.

H, K ve N-ras genlerinin ürünleri olan ve plazma membranının sitoplazmik yüzüne bağlı 21 kDa' luk proteinler yapıları açısından G proteinlerinin α altbirimlerine benzerlik gösterirler. Son zamanlarda düşük molekül ağırlıklı (20-30 kDa) ve ras bağlantılı geniş bir GTP bağlayan protein ailesinin varlığı kesinleşmiştir.

G proteinlerinin saflaştırılmasında başlangıç materyali olarak ham ya da saf plazma zar kesimleri kullanılmıştır. Çeşitli kriterlere göre sitozol' de G_S , G_i ya da G_0 yok sayılabilir. Ancak adı geçen G proteinlerinin yanısıra diğer G proteinlerinin plazma zarının dışındaki hücre altı kesimlerde bulunma olasılığı tamamen gözardı edilemez. Saflaştırma işlemlerinde ilk adım G proteinini plazma zarından çözmektir. Bu amaçla, önceleri Lubrol-PX gibi iyonik olmayan deterjanlar kullanılmıştır (30). Ancak iyonik bir deterjan olan sodyum kolat' ın G proteinlerini zardan özütlemek ve saflaştırmak için daha verimli olduğu anlaşılmıştır. Proteinleri, özütleme tamponunun iyonik gücünü ayarlamak suretiyle birinci aşamada bile birkaç kez saflaştırmak mümkün olabilir. Membran kesiminin elde edilmesini izleyen saflaştırma basamaklarında genellikle ard arda iyon değişim kromatografisi, (DEAE-Sephacel) gel permeasyon kromatografisi (Ultragel AcA 34) ve aşağıdaki basamaklardan bir yada bir kaç uygulanır.

- (a) Hidrofobik kolon kromatografisi (Heptamil Sepharose)
- (b) Hidroksi apatit kromatografisi
- (c) Bir diğler iyon değiştirici kromatografi işlemi (Mono Q gibi)

Birbirinden ayrılmış α ve $\beta\gamma$ altbirimleri özütlerin AMF ($AlCl_3, MgCl_2$ ve NaF) gibi G protein aktivatörleriyle etkileştirilmesi ve diğler saflaştırma basamaklarından geçirilmesiyle saflaştırılabilir. Bu amaç için izlenebilecek diğler bir yol ayrırmış altbirimleri gel permeasyon kromatografisi ile ayırmaktır. G proteinlerini saflaştırma işlemleri esnasında G proteinleri birçok farklı test sistemleri ile izlenebilir. Örneğin; özğün işlevsel testler G proteinin reseptör ve/veya efektör ile kenetlenmesini yansıtabilir. G_s mutant cyc hücre hattında agonistle uyarılmış adenilat siklaz etkinliğini yeniden oluşturma yeteneğine göre saflaştırılmıştır. Yüksek afiniteli özğün guanin nükleotid bağlama tepkimesi (örneğin; GTP γ S bağlama) daha genel amaçlı bir testtir ve ilk olarak beyin G_o ' ın saflaştırılmasında kullanılmıştır. Pertussis toksin substratı olan G proteinlerinin saflaştırılmasında toksinle katalizlenen ADP-ribozillenme tepkimesi izleyici test olarak kullanılır. Saflaştırılmış G proteinlerinin hangi subtipteye ait olduğunu saptamak için amino asit dizilerinin belirlenmesi ve bu dizilerin klonlanmış cDNA' larına dayanarak tahmin edilen dizilerle kıyaslanması etkili bir yoldur. Özğün sentetik peptitlere karşı geliştirilmış antikorlar da belli bir G proteinini tanımlamak açasından yararlı olabilir (38). GTPaz kinetiği gibi işlevsel testler de G proteinlerinin tanımlanmasında ek bilgi sağlayabilir.

1.11. G Protein Araştırmalarında immünolojik Problemler

Ham membran kesimlerindeki G protein α altbirimlerinin özğün olarak tanımlanmasında uzun bir süre için yalnızca bakteri toksinlerinin α altbirimlerinin ADP-ribozillenmelerini katalizleme yeteneğinden yararlanılmıştır. Ancak bu tepkimenin çok özğün olmaması sınırlayıcı bir etkidir. Örneğin; boğmaca toksini bilinen α altbirimlerinden altı ya da yedi tanesini modifiye edebilmektedir.

G protein altbirimlerine özğün antikorlar G proteini araştırmalarında güçlü bir araç olarak uygulama alanı bulmuştur. Saflaştırılmış G holoproteinleri ve altbirimlerine karşı geliştirilmış antiserumlar G protein ailesinin üyeleri arasındaki ben-

zerlikler (β -altbirimleri) ve farklılıkların (α ve γ altbirimleri) ilk göstergesi olmuştur (Tablo 4.). Boğmaca toksini substratlarını kodlayan cDNA'lar klonlanmış, bu cDNA' lardan öngörülen amino asit dizilerine uygun sentezlenmiş sentetik peptitlere karşı antiserumlar oluşturulmuş ve bunlardan cDNA protein ürünlerini tanımlamakta yararlanılmıştır (Tablo 5). G protein antikoru ayrıca G proteinlerinin işlevleri, dokular arasında ve hücre içindeki dağılımları ve translasyon sonrası modifikasyonları ile ilgili araştırmalarda değerli katkılar sağlamıştır.

<u>Adı</u>	<u>Antijen</u>	<u>Özgüllük</u>
AS/1	Holotransdusin	Transdusin α , β , γ çapraz reaksiyon $G\beta$
CW/6	Holotransdusin	Transdusin α , β , γ çapraz reaksiyon $G_{i1}\alpha$
GI/2	Transdusin α	Transdusin α (Sadece rat)
SP/3	Transdusin β ,	Transdusin β , γ çapraz reaksiyon $G\beta$
RV/3	Beyin G_i/G_o	$G_{o\alpha}$ $G\beta$ çapraz reaksiyon $G_{i\beta}$

Tablo 4. Safılaştırılan G protein altbirimlerine karşı oluşturulan antikolar

<u>Adı</u>	<u>Antijen</u>	<u>Özgüllük</u>
AS/6	Transdusin α (a.a.341-350)	Transdusin $G_{i1}\alpha$, $G_{i2}\alpha$, $G_{i3}\alpha$
GO/1	$G_{o\alpha}$ (a.a 345-344)	$G_{o\alpha}$
IM/1	$G_{o\alpha}$ (a.a 22-35)	$G_{o\alpha}$
GC/1	$G_{o\alpha}$ (a.a.2-16)	$G_{o\alpha}$ (Çapraz reaksiyon) G_{i1} , G_{i2} , G_{i3}
LE/2	$G_{i2}\alpha$ (a.a 160-169)	$G_{i2}\alpha$
LD/1	$G_{i1}\alpha$ (a.a.159-168)	$G_{i1}\alpha$
SQ/2	$G_{i3}\alpha$ (a.a 159-168)	$G_{i3}\alpha$

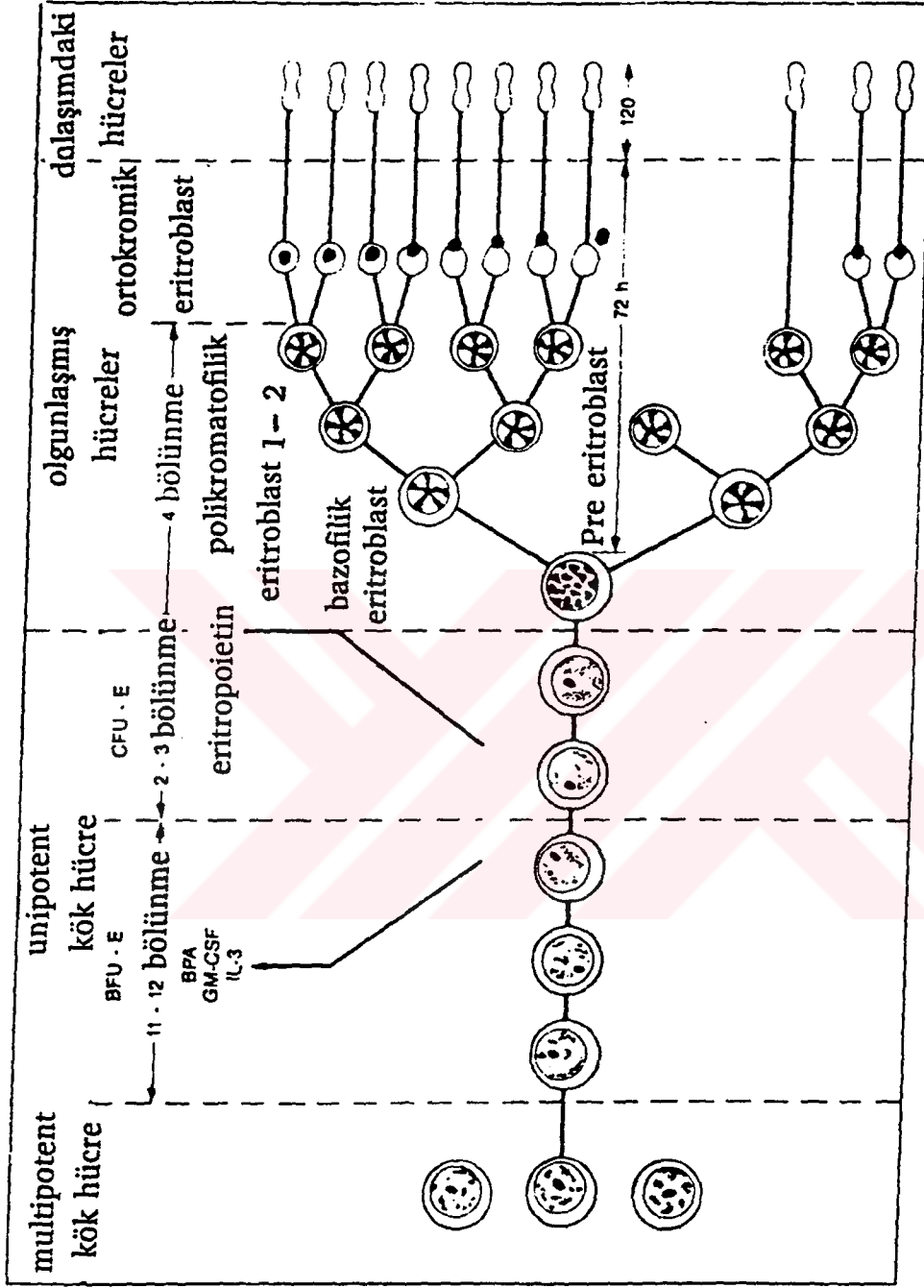
Tablo 5. Sentetik peptitlere karşı geliştirilmiş antikolar.

1.12. Normal Eritropoesis

Eritropoesis ya da eritrosit yapımı kandaki şekilli elementlerin en az üçünün (granülositler, megakaryositler ve eritrositler) üretilmesinden sorumlu olan bir hemopoietik yenileme yollarından biridir (39). Şekil 4'de genel bir hemopoietik kök hücrenin multipotent potansiyeli gösterilmiştir. Multipotent kök hücrenin eritroid farklılaşmaya yönlendirilmesi için eritroid öncü hücrede bir dizi gelişimsel aşamanın başlangıcına ihtiyaç duyulur. İn-vitro şartlarda gösterildiği gibi eritroid öncülerin bu farklı aşamaları proliferasyon yeteneği ve çeşitli büyüme faktörleri ve eritropoietin hormonuna yanıtlarıyla ayırt edilmektedir. Eritroid seriye yönelen en erken öncü hücre "burst forming uniterythroid" "(BFU-E)" dir. İnterlökin-3 (IL-3) ve "granulocyte macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF), (BFU-E)'yi stimüle eden ve büyümeyi başlatan iki önemli faktördür. Bu iki faktörün, BFU-E'nin in vitro yaşamı ve proliferasyonu için gerekli olduğu ortaya çıkmıştır (40).

Eritroid hücre kültürlerinin hemoglobin sentez hızını artırmak suretiyle eritropoietine cevap verdikleri görülmüştür. Hemoglobin sentezindeki bu artış eritroblastlardaki hemoglobin sentez hızındaki artmaya bağlı değil farklılaşan eritroid hücrelerin sayısındaki bir artışa bağlıdır. İn-vitro ve in-vivo' da son olgunlaşma için zorunlu olduğu ortaya çıkan eritropoietin hem mitojenik hem de farklılaştırma işlevleri taşır.

Pre eritroblast dört farklı aşamadan sonra çekirdeğinden sıyrılarak bir retikülosit haline olgunlaşır. Bu dört farklı aşama bazofilik eritroblast, polikromatofilik eritroblast, polikromatofilik eritroblast 1 ile 2 ve ortokromik eritroblast'dır. Polikromatik eritroblastların çapları çok küçülmüş ve sitoplazma içerisindeki hücre organelleri çok azalmıştır (41). Az sayıda mitokondri olup, sentezlenen hemoglobin tamamen sitoplazmayı doldurduğundan, sitoplazmanın elektron yoğunluğu eritrositine uyar. Nukleus piknotik olduğundan mitotik aktivite kaybolmuştur, ancak protein sentezi devam eder. Dört mitotik bölünme meydana gelir ve böylece her pre eritroblast 16 retikülosit üretecektir. Bu olgunlaşma işlemleri yaklaşık 72 saatlik bir sürece ihtiyaç gösterir. 48 saatlik bir süreden sonra dolaşımdaki retikülosit eritrosit şekline olgunlaşır.



Şekil: 4. Eritroid hücre serisine farklılaşma aşamaları

1.13. MEL ve K562 Hücrelerinde Eritroid Farklılaşma

Friend eritrolösemi hücreleri murin kökenli eritroblastik hücrelerdir. Bunlar Friend virüs kompleksi ile enfekte olmuş duyarlı fare dalağında elde edilmişlerdir. Transforme edici Friend virüs kompleksi enazından iki virüsten oluşur. (Spleen focus forming virüs (SFFV) ve murine leukemia helper virüs (MuLV)) Murine eritrolösemi hücre soyları düşük molekül ağırlıklı (<300) çeşitli kimyasal maddelerde in vitro olarak eritroid hücre farklılaşmasına indüklenebilir (42).

Bunun yanısıra insan eritrolösemi soyları da geliştirilmiştir. İlk geliştirilen soy olan K562 hücre soyları Lozzio ve Lozzio tarafından bir kronik miyeloid lösemik hastanın terminal blastik kriz döneminde elde edilen hücrelerden geliştirilmiştir(43). K562 hücreleri farklılaşmaya murin eritrolösemik hücrelerde olduğu gibi dimetilsül-foksit ile değil sodyum biturat veya hemin ile indüklenebilirler (44). Normal eritroid öncü hücrelerin uzun süre kültürde tutulması ve farklılaşmanın kritik aşamalarında senkronize olmuş hücre topluluğunun elde edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle hücre kültürlerinde çoğaltılabilen K562 ve MEL hücreleri eritroid hücre farklılaşmasında uygun modelleri oluştururlar. MEL ve K562 hücre soyları kültürde spontan olarak % 1 gibi düşük bir seviyede farklılaşırlar. Bu nedenle bu hücreleri farklılaşmaya yönlendirilen kimyasal maddeler geliştirilmiştir. Bu kimyasallar genel olarak düşük molekül ağırlıklı polar hidrofilik grupları ve hidrofobik kısım içeren düzlemsel (planar) bileşiklerdir. MEL hücrelerinde gözlemlenen farklılaşma ile normal olarak eritropoietin ile düzenlenen eritropoesiste birçok morfolojik ve biyokimyasal benzerlikler vardır. Bu benzerlikler: kromatin yoğunlaşması ile diğer morfolojik değişiklikler, son hücre bölünmesi, globin haberci RNA'nın birikimi, α ve β globin sentezi, hemin sentezindeki artış, katalaz gibi karakteristik eritrosit enzimlerinin sentezi, pürin metabolizmasındaki değişiklikler, eritrosite özgün membran antijenleri ve spekt-rin gibi diğer proteinlerin ortaya çıkışıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Kimyasal Maddeler

Akrilamit (Merck)
Bisakrilamit (Sigma)
"Coomasie" Parlak mavisi (Merck)
Ditiyotiretiol (Anachemia)
Guanozin 5 Trifosfat (Sigma)
Guanozin 5-0-(3-0-thiotrifosfat); (GTP)_S (Sigma)
Etilen Glikol (Sigma)
2 Merkaptoetanol (Merck)
RPMI Ortam 1640 (Sigma)
Sodyum Bikarbonat (Sigma)
L-Glutamin (Sigma)
Hepes (Mallinckredt GenAR)
Fetal Dana Serumu (Gibco)
Hidrojen Peroksit (Riedel-de Haen)
Dimetilsülfoksit (Sigma)
Hemin (sigma)
Penilmetilsülfonilfloril (PMSF) (Sigma)
N,N,N',N' Tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma)
Folin (Harleco)
Penisilin Streptomisin (Sigma)
Bovin Serum Albumin (Promega)
Ponso-S (Sigma)
Toluol (Merck)
Tween 20 (Promega)
Amphoterasin B (Sigma)
Bromokloroindolyl Fosfat (BCIP) (Promega)
Nitrobluetetrazolium (NBT) (Promega)
Benzidindihidroklorid (Sigma)

2.2. Radyoaktif Maddeler

- (³⁵S) GTP γ S, özgün etkinliği (spesifik aktivitesi), 1146Ci/mmol, Dupont-NEN Products Boston
- (³H) GTP, özgün etkinliği 9 Ci/mmol, Amersham.

2.3. İmmünolojik Problar

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

<u>Antikor</u>	<u>Antijen</u>	<u>Amino asit dizisi</u>	<u>Etkileştiği Protein</u>
P960	sentetik peptit	GTSNSGKSTIVKQMK	G α ortak
S217	sığır proteini		G $\beta\gamma$

2.4. Elektroforetik Gereçler

Bio-Rad mini gel aleti ve elektroforetik transfer aleti kullanıldı.

2.5. Çalışmada Kullanılan Aletler

- PH Metre (Hanna)
- Manyetik Karıştırıcı (Hanna)
- Su Banyosu (Kotterman Laborotechnik)
- Güç Kaynağı (Dan-Kar Corp. Reading)
- Mikro Santrifüj (Heraeus Christ BiofugeB)
- Vorteks (Thermodyne)

- Derin Dondurucu (So-Low)
- Laminer Flov (Özge Çelik)
- Karbondioksit İnkübatörü (Form Scientific)
- Sıvı Sintilasyon Sayacı (Packard Tri-Carb 1500)
- Santrifüj (Heraeus Digifuge GL)
- Spektrofotometre (LKB Biochrom)
- Terazi (Oertling NA 114)

2.6. Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi

PBS. Hücre Yıkama Tamponu

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

1 mM Hemin Çözeltisi, pH = 8

6.5 mg Hemin
0.25 ml KOH (1N)
0.1 ml Tris-HCl, pH 7.8
8.89 ml Etilen Glikol
0.1 ml 1N HCl
0.4 ml distile H₂O

RPMI Ortam 1640

% 10 Fetal Dana serumu
20 mM Hapes
2 mM L-Gulitamin
% 0.1 Sodyum Bikarbonat
100 Ü/ml Penisilin
100 µg/ml Streptomisin

Elektroforez Tamponu (2x)

Tris-HCl	59g
Glisin	270g
Sodyum Dodesilsülfat	18g

Distile su ile 18 litreye tamamlanır.

PAGE Ayrışım Geli (% 10)

1.5 M Tris-HCl, PH 8.8	2.5 ml
% 10 Sodyum Dodosilsülfat	0.1 ml
Akrilamit/Bisakrilamit (30: 0,8)	3.35 ml
% 10 Amonyum Persülfat (APS)	80 µl
Temed	6 µl
Distile su	4 ml

PAGE Derişim Geli (% 4)

1M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
% 10 Sodyum dodesilsülfat	0.1 ml
Akrilamit/Bisakrilamit (30 : 0,8)	1.3 ml
% 10 Amonyum Persülfat	80 µl
Temed	12 µl
Distile su	7.35 ml

Örnek Tamponu (x 4)

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

Gel Boyama Çözeltisi

% 0.2 "Coomassie" Mavisi
% 50 Metanol (Ya da % 25 izopropil alkol)
% 10 Asetik asit

Gel'den Boya Çıkarma Çözeltisi

% 25 İzopropil alkol
% 10 Asetik Asit

Transfer Tamponu (TB), pH 8.3

25 mM Tris
192 mM Glisin
% 20 Metanol

Tris-Tuz Tamponu (TBS)

37 mM NaCl
3 mM KCl
25 mM Tris

Birincil Antikor Çözeltisi

% 3 BSA
% 0.2 NP40
% 0.2 Sodyum Azide
2 ml CaCl₂ (1M)
60 mM NaCl
Anti tavşan G α 10 μ l
14 ml TBS içerisinde hazırlandı.

Blok Tamponu

% 0.05 Tween 20

% 1 BSA

TBS tamponunda hazırlandı

İkincil Antikor Çözeltisi

Anti-tavşan IgG-Fc Alkalen fosfotaz konjugat TBS içerisinde 7500 kez seyreltilerek hazırlandı.

Geliştirici "Developer" Tampon

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

Nitroselüloz Filtreleri Yıkama Tamponu

20 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM NaCl

25 mM MgCl₂

(³⁵S) GTPγS Seyreltme Tamponu

10 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM DTT

Örnekleri Seyreltme Tamponu

20 mM HEPES, pH 8

1 mM EDTA

1 mM DTT

Hücreleri Patlatma Tamponu

10 mM Tris-HCl, pH 7,6

10 mM KCl

1 mM EDTA

0.2 mM PMSF

7 mM MET

TED Tamponu

1 mM EDTA

10 mM Tris-HCl, pH 7,6

3 mM MgCl₂

100 mM NaCl

7 mM MET

0.2 mM PMSF

% 10 Sukroz

HDT Tamponu

20 mM HEPES, pH 8

1 mM EDTA

1 mM DTT

Ponso-S Boyama Çözeltisi

Glasiyel Asetik asit 2,5 ml

Ponso-S 0,05 g

Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Benzidin Boya Stok Çözeltisi

0.5 M Glasiyel asetik asit

% 0.2 Benzidin dihidroklorit

Kullanılan RPMI 1640 Ortamının İeriği

Bileşenler	mg/lt
L-Arginin	0.200
L-Asparagin	0.050
L-Aspartik asit	0.020
L-Sistein 2HCl	0.652
L-Glutamik asit	0.020
L-Glutamin	0.300
Glisin	0.010
L-Histidin	0.015
L-Hidroksiprolin	0.020
L-İzolösin	0.050
L-Lösin	0.050
L-Lisin HCl	0.040
L-Methionin	0.015
L-Penilalanin	0.015
L-Prolin	0.020
L-Serin	0.030
L-Treonin	0.020
L-Triptofan	0.005
L-Trozin 2Na	0.02883
L-Valin	0.020
Biotin	0.0002
Pantotonik Glutalyon	0.00025
Kolin Klorid	0.003
Folik asit	0.001
Mio inositol	0.035
Nikotinamid	0.001
Paba	0.001
Piridoksin HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Tiamin HCl	0.001

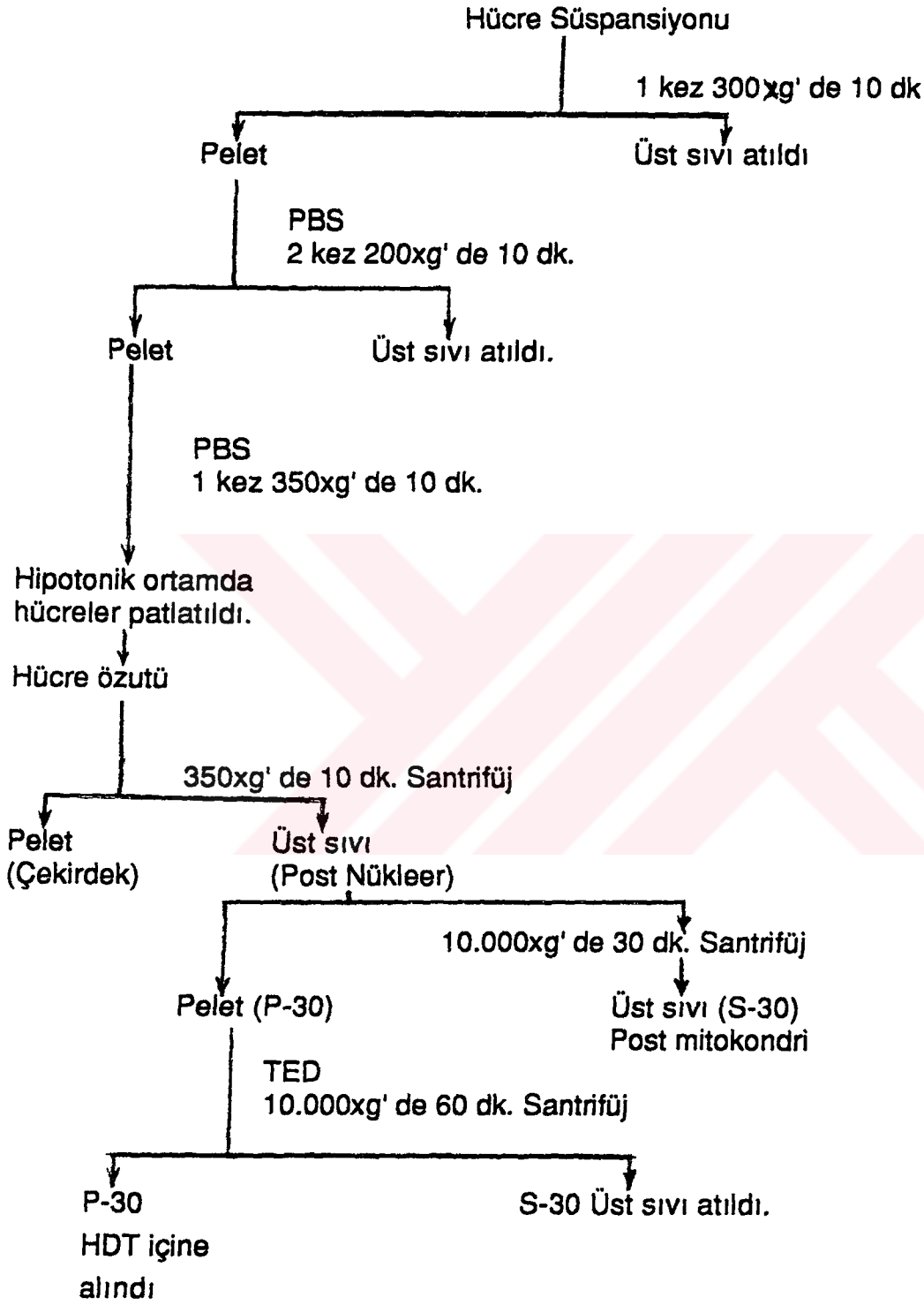
Vitamin B12	0.000005
Kalsiyum nitrat 4H ₂ O	0.100
Potasyum klorid	0.400
Magnezyum sülfat	0.04884
Sodyum klorit	6.000
Sodyum fosfat, dibazik	0.800
D-Glüköz	2.000
Glutalyon	0.001
Fenol kırmızısı, Na	0.0053

2.7. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Kimyasal çözeltiler ve medyum, (Millipore Type GS, gözenek büyüklüğü 0.22 µm) filtrelerden geçirilerek sterilize edildi. Deiyonize su ve cam malzemeler otoklav' da 120°C' da 1 atm basınçta 45 dakika bekletilerek sterilize edildi. Pipetler ise etüvde 170°C' da, 1.5 saat bekletilerek sterilize edildi.

2.8. K562 ve MEL Eritrolösemi Hücrelerinin Çoğaltılması

Sıvı azotta, -170°C' da dondurularak saklanan, Murine eritrolösemi hücreleri (MEL-BB 88) ve insan eritrolösemi (K562) hücreleri 37°C' daki su banyosunda çözüldü. Hemen RPMI medyum 1640 içerisine alınarak santrifüj edildi. Dondurma işlemi sırasında kullanılan dimetilsülfoksit'in ortamdan uzaklaşmasını sağlamak için RPMI 1640 medyumla bu işlem iki kez tekrarlanarak hücreler yıkandı. Pelete 5 ml medyum eklenerek kültür şişelerine pasaj yapıldı. Kültür şişelerinin kapakları hafifçe aralık bırakılarak % 95 O₂ ve % 5 CO₂ içeren karbondioksit etüvünde, 37°C' da inkübe edildi. Çoğalmaya bırakılan hücreler, haftada iki kez olmak üzere medyumları değiştirilerek pasaj işlemi ile çoğaltıldı. Bu şekilde çoğalan hücreler konik santrifüj tüplerine alındıktan sonra 10 dakika 200xg' de santrifüj yapıldı. Hücreler istenen sayıya ulaşıldıktan sonra farklılaşmaya indüklendi.



Şekil 5. Membran kesimlerinin eldesi.

2.9. K562 ve MEL Eritrolösemi Hücrelerinin Farklılaşmaya İndüklenmesi

Yoğunlukları başlangıçta 100.000 hücre/ml olacak şekilde, ayarlanan K562 ve MEL hücreleri kontrol (K) ve farklılaşma (F) grupları olarak ikiye ayrıldı. F grubundaki K562 hücreleri 20 µM hemin çözeltisi ile MEL hücrelerinde % 2 dimetilsülfoksit (DMSO) ile farklılaşmaya indüklendi.

2.10. Benzidin Boya Yöntemi

Benzidin boyası, benzidin boya stok çözeltisinden 2,5 ml, % 35'lik H₂O₂'den 10 µl alınarak taze olarak hazırlandı. 1 ml hücre süspansiyonuna 0,1 ml boya ilave edildi. Beş dakika bekletilerek 100xg' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlem sonrasında mavi renk alanlar hemoglobinin sentezinin arttığı farklılaşmış (benzidin pozitif) hücreler olarak belirlendi (45). Bundan sonra, pelet hemositometreye yayılarak ışık mikroskopunda sayım yapıldı.

2.11. Membran Kesimlerinin Hazırlanması

K562 ve MEL eritrolösemik hücrelerinde membran kesimleri Şekil 5' deki santrifüj basamakları izlenerek hazırlandı. Tüm işlemler 0-4°C' da proteaz inhibitörü PMSF varlığında yürütüldü. Hücre süspansiyonları, konik santrifüj tüplerinde toplanıp 300xg' de 10 dakika santrifüjlendikten sonra, pelet mikrosantrifüj de iki kez 200xg' de 10 dakika ve bir kez de 350xg' de hücre yıkama tamponu ile yıkandı. Hücreler düşük tuz konsantrasyonlu hücre patlatma tamponu içerisine alınarak 10 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra, mini dounce hemojenizatörüyle patlatıldı. Elde edilen hücre özütleri; 100 mM NaCl, 3mM MgCl₂ ve % 10 sukroz içine alınarak 350xg'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı (süpernatant-S30) 10.000g' de santrifüjlendikten sonra pelet TED tamponu içerisine alınarak 10.000xg' de 1 saat santrifüj yapıldı. Peletler (P-30) HDT tamponu içerisine alınarak, S-30 ve özüt kesimleriyle birlikte -70°C'da saklandı (46).

2.12. Protein İçeriklerinin Belirlenmesi

Protein miktarları standart olarak siğır serum albuminin kullanıldığı Lowry yöntemine göre belirlendi. Bilinen miktarlarda siğır serum albumin ve protein miktarları bilinmeyen örnekler reaksiyon hacmi 150 µl olacak Şekilde tüplere alındı. Daha sonra bu tüplerin üzerine 50 ml Sol 1, 0,5 ml Sol 2 ve 0,5 ml Sol 3'den oluşan karıŐımdan 3'er ml ilave edilerek vorteks yapıldı. (Sol1: % 2 Na₂Co₃+0,1 N NaOH, Sol2: % 2 NaK Tartarat, Sol3: %1 CuSO₄.5H₂O) Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 0,3'er ml % 50 folin ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede (750 nm) absorbans değerleri okundu. Bilinen protein miktarlarına karşı çizilen standart doğrudan bilinmeyen protein miktarları belirlendi (59).

2.13. Hücre Kesimlerinden Elde Edilen Protein rneklerinin Denatüre Edilmesi

Örneklerin denatüre edilmesi için kullanılan (4x) rnek tamponuna % 5 olacak Şekilde 2-Merkaptoetanol ilave edildi. Protein rnekleri bu tampona alınarak 90°C' ta 5 dakika denatüre edildi.

2.14. (³⁵S) GTPγS Bağlama Testi

10-100 µg protein içeren K562 ve MEL ham hücre zt, S-30 (post mitokondri) ve P-30 (membran) kesimleri (³⁵S) GTPγS bağlama etkinliği 60µl hacminde 25 mM Hepes, 30 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 µM (³⁵S) GTPγS (300.000 cpm) varlığında 32°C'ta 40 dakika inkübe edildi. Örnekler nitroselüloz filtrelerden (Millipore Type HA 0.45 µm) geçirildi ve nitroselüloz filtreler yıkama tamponu ile yıkandı. Filtreler kurutulduktan sonra bağlanan (³⁵S) GTPγS miktarı sıvı sintilasyon sayacında belirlendi.

2.15. (³H) GTP Bağlama Testi

Eritrolösemik hücrelerin, ham hücre özütü, S-30 ve P-30 kesimleri 60 µl reaksiyon hacminde 25 mM HEPES, 30 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT ve 1µM(³H) GTP (0,5 µCi) varlığında 37°C' ta 5 dakika inkübe edildi. Örnekler nitroselüloz filtreler emdirildi, filtreler yıkama tamponu ile yıkandı ve kurutuldu. Bağlanan (³H) GTP miktarı sıvı sintilasyon sayacında belirlendi.

2.16. Radyoaktivitenin Ölçülmesi

Radyoaktif örnekleri taşıyan kurutulmuş filtreler % 0,4 2,5 difeniloksazol (PPO) içeren toluol içinde cam şişelere yerleştirildi. Radyoaktivite miktarı Packard sıvı sintilasyon sayacında saptandı. Sayacın verimi ³H için % 60, ³⁵S için % 95 olarak belirlendi. Aşağıdaki formül kullanılarak 1 dakikalık sayım (cpm) pmol boyutlarına çevrildi.

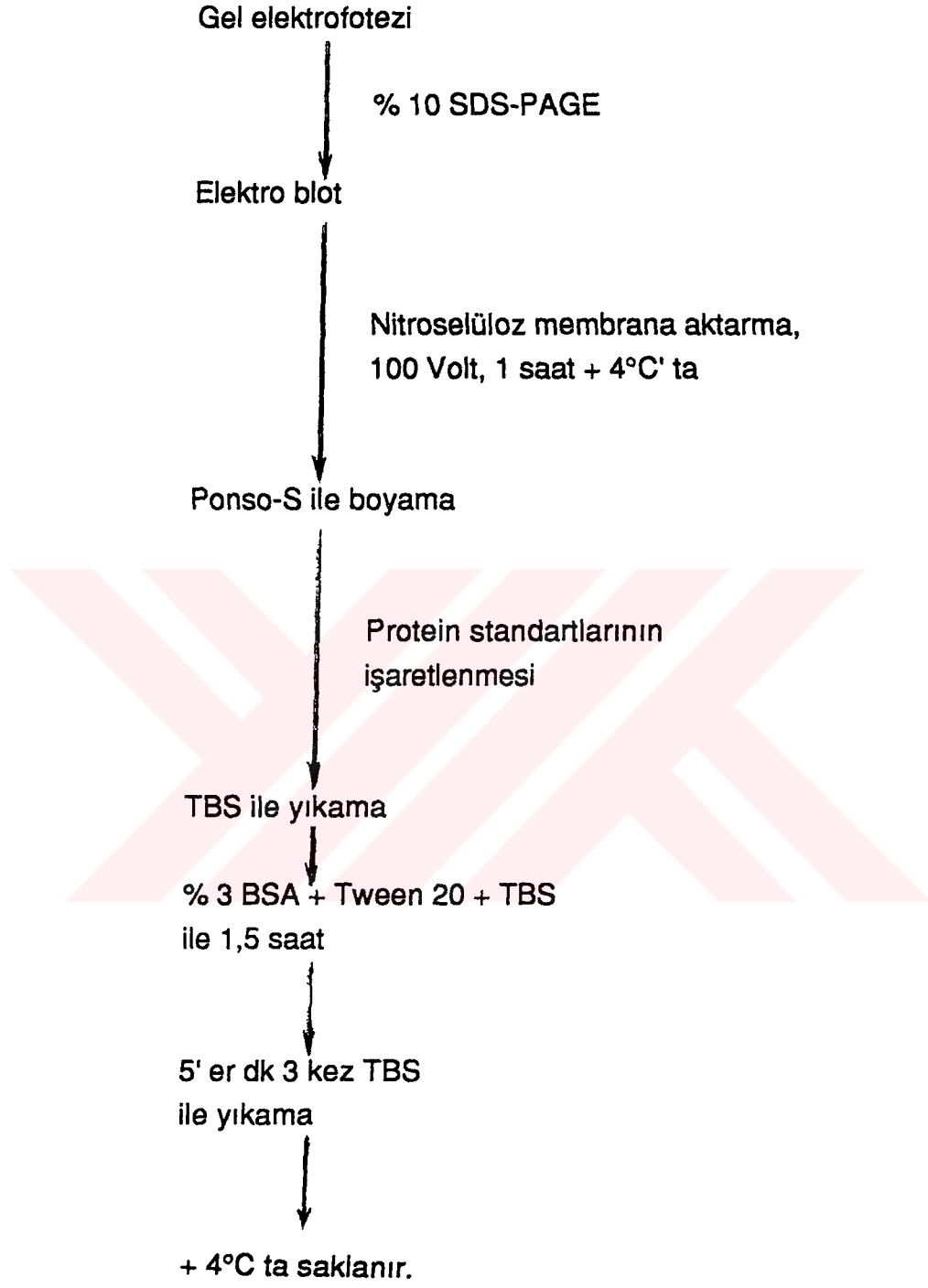
$$\text{pmol} = \frac{\text{cpm} \times 100}{2.22 \times \text{Sayım verimi (\%)} \times \text{Spesifik aktivite (Ci/mol)}}$$

2.17. Hücre özütü, S-30 ve P-30 Kesimlerinin Elektroforetik Analizi

20 µl hacim içindeki denatüre edilen örnekler Hamilton enjektörü ile SDS-PAGE gel kuyularına uygulandı. Elektroforez işlemi 100 Volt' ta sürdürüldü. Yaklaşık 1 saat sonra akım kesilerek, iki cam arasındaki geller çıkartıldı. Geller sırasıyla boyama çözeltisi, boya çıkarma çözeltisi ve % 5 asetik asitde yıkandı. Gelde proteinlerin olduğu bölgeler koyu mavi bantlar olarak gözlendi (47).

2.18. Elektroforetik Transfer

Proteinler elektroforetik olarak gel' de ayrıldıktan sonra, geller çıkartıldı ve gel transfer tamponu içerisine alınarak, 15 dakika bekletildi. 9.5 cm x 5.5 cm bo-

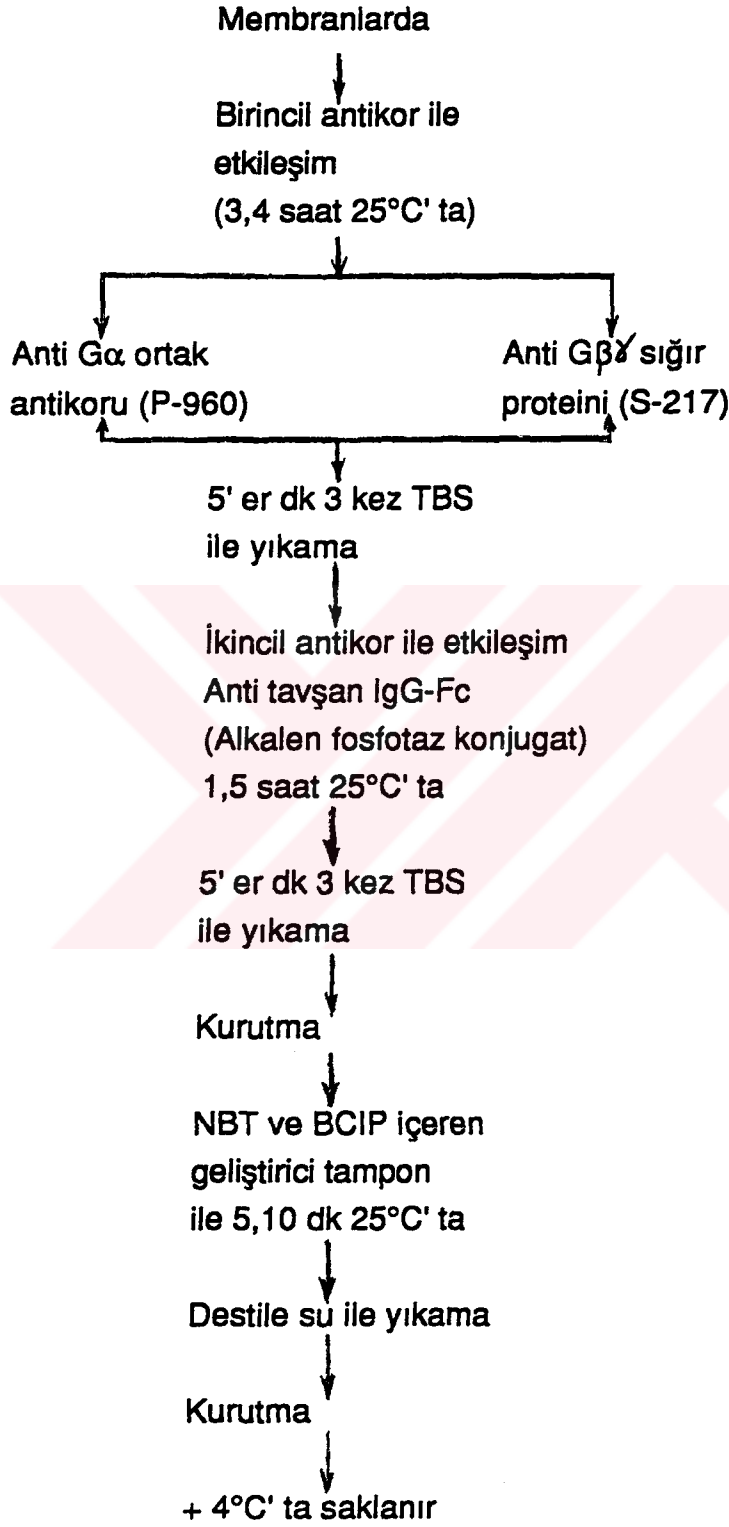


Şekil 6. Protein örneklerinin nitroselüloz membrana aktarımı.

yutlarında iki tane nitroselüloz membran ve 11 cm x 8 cm boyutlarında dört tane filtre kağıdı kesildi. Membranlar ve filtre kağıtları 45°C' lik açı ile kaydırılarak transfer tamponu içerisinde 15-20 dakika bekletildi. Gel kasetindeki gri panelin üzerine sırasıyla sünger, filtre kağıdı, gel, nitroselüloz membran, filtre kağıdı ve sünger konduktan sonra kaset dikkatlice kapatıldı. İki kaset tanka yerleştirildi ve tank transfer tamponuyla dolduruldu. Transfer tankı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilip güç kaynağına bağlandıktan sonra transfer işlemi 100 Volt' ta 1 saat içerisinde gerçekleştirildi. Transferin gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemek için membranlar Ponso-S boyama tamponuna alındı, 5-10 dakika bekletilerek protein bantları gözlendikten sonra, protein standartları işaretlendi. Membranlar distile su ile yıkandı ve filtre kağıdında emdirilerek kurutuldu. Bu aşamadan sonra membranlar +4°C' ta saklandı (Şekil 6.).

2.18. İmmünojenik Belirleme-Western Blot (Alkalen Fosfotaz Sistemi)

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



Şekil 7. Western blot Yöntemi.

9. Reaksiyon distile su ile durduruldu.
10. Membranlar filtre kağıdına emdirilerek kurutuldu. Streç film (Saran wrap) ve alüminyum folyoya sarılarak +4°C' ta saklandı (Şekil 7.).

2.19. Molekül Ağırlığı Tayini

Standart protein bantlarının ve bromfenol mavisinin gel başlangıcına olan uzaklıkları ayrı ayrı ölçülerek her proteinin bağıl mobilitesi (μ) hesaplandı.

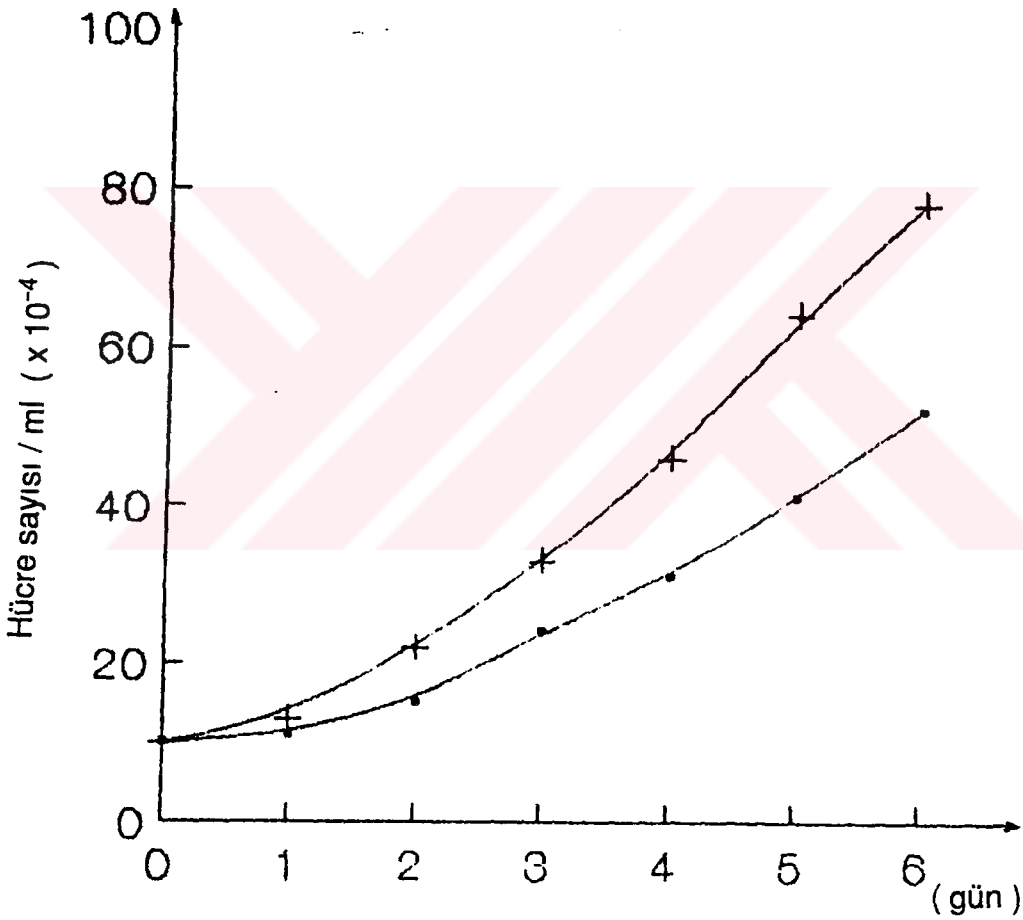
$$\mu = \frac{\text{Proteinin gelde aldığı yol}}{\text{Boyanın gelde aldığı yol}}$$

Bulunan μ değerleri absis'e, bilinen molekül ağırlıklarının logaritmik değerleri ordinata işaretlenerek $\log (M.A) = f(\mu)$ standart doğrusu çizildi.

3. BULGULAR

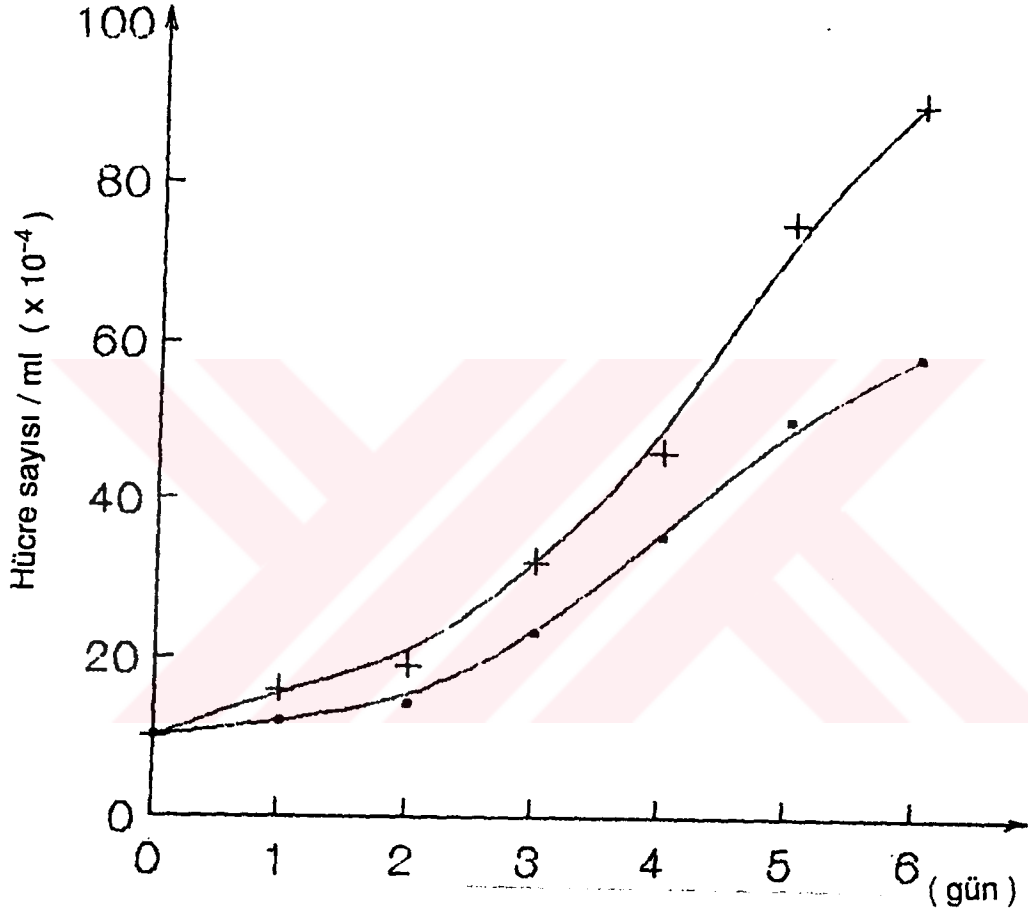
3.1. K562 ve MEL Hücrelerinin Üretilmesi ve Hücre Alt Kesimlerinin Hazırlanması

Uygun koşullarda çoğaltılan kontrol, K (125 ml) ve farklılaşmış, F (175 ml) K562 hücreleri altıncı günün sonunda toplandı. F grubundaki farklılaşma (benzidin pozitif) oranı yaklaşık % 70, grubunda ise kendiliğinden farklılaşma oranı % 2 olarak belirlendi. K562 hücrelerinin çoğalma eğrileri Şekil 7.'de gösterilmiştir.



Şekil 7. K562 hücrelerinin çoğalma eğrileri. Yoğunluğu 100.000 hücre/ml olarak ekilen hücreler altı gün süreyle gereç ve yöntemlerde belirtildiği gibi çoğaltıldı. Hücre derişimini saptamak için hergün ikişer örnek alındı ve hemositometrede 0,1 µl hacimde sayım yapıldı. (+), Kontrol hücreleri; (•), Farklılaşmış hücreler.

Gereç ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi çoğaltılan kontrol (Şekil 8.), K (110 ml) ve farklılaşmış, F (160 ml) MEL hücreleri altıncı günün sonunda toplandı. F grubundaki farklılaşma (benzidin pozitif) oranı yaklaşık % 65 saptandı. K grubunda ise kendiliğinden farklılaşma oranı % 1 olarak saptandı.



Şekil 8. MEL Hücrelerinin Çoğalma Eğrileri Yoğunluğu 100.000 hüç/ml olarak ekilen hücreler altı inkübe edildi. Hücre derişimini saptamak için hergün iki örnek alındı ve hemositometrede 0,1 µl hacimde sayım yapıldı. Grafikteki değerler her iki örneğin ortalamasıdır. Kontrol hücreleri; (+) farklılaşmış hücreler; (•).

MEL ve K562 hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış gruplarından, hücre özütü membran (P-30) ve post mitokondriyal (S-30) kesimleri gereç ve yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde hazırlandı (Şekil 5.) ve alt kesimlerin protein miktarları belirlendi (Tablo 6.).

Protein Miktarları (mg/ml)			
	P-30	S-30	Hücre özütü
K562 (K)	9,0	8,0	12,3
K562 (F)	12,0	14,1	18,0
MEL (K)	5,0	4,4	5,2
MEL (F)	3,0	2,1	10,6

Tablo 6. MEL ve K562 Hücre Alt Kesimlerinde Protein Miktarları: MEL ve K562 hücrelerinin ham hücre özütü, S-30 (post-mitokondri) ve P-30 (membran) kesimleri gereç ve yöntemlerde belirtildiği gibi elde edildi. Her kesimden alınan 5 ve 10 µl' lik örneklerdeki protein miktarları Lowry yöntemiyle saptandı (59).

3.2. Kontrol ve Farklılaşmış K562 ve MEL Hücre Alt Kesimlerinde Guanin Nükleotid Bağlama Etkinliği Üzerinde Çalışmalar

3.2.1. Hücre Alt Kesimlerinde (³H) GTP Bağlama Etkinliği

K562 ve MEL hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış gruplarından elde edilen ham hücre özütü, S-30 (post-mitokondri) ve P-30 (membran) kesimlerinde guanin nükleotid bağlama etkinlikleri, (³H) GTP varlığında saptandı. K562 insan eritrolösemi hücrelerinin membran kesimlerinin GTP bağlama etkinliğinde, farklılaşma grubunda kontrole göre belirgin bir artma gözlenirken, MEL hücrelerinde bunun tam tersine farklılaşma grubunda kontrole göre önemli bir azalma gözlenmiştir (Tablo 7.).

	Bağlanan GTP (pmo)			Bağlanan GTP (%)		
	P-30	S-30	Hücre Özütü	P-30	S-30	Hücre Özütü
K562 (K)	0,13	0,29	0,25	20	45	39
K562 (F)	0,23	0,69	0,20	36	100	31
MEL (K)	0,25	0,25	0,19	83	83	63
MEL (F)	0,12	0,30	0,10	28	100	33

Tablo 7. K562 ve MEL Hücre Alt Kesimlerinde (^3H) GTP Bağlama Etkinlikleri: 50 μg protein içeren kontrol ve farklılaşmış hücre özütü, S-30 ve P-30 alt kesimleri 1 μM (^3H) GTP (0,5 μCi) varlığında gereç ve yöntemler bölümünde belirtilen koşullarda 32°C' ta 5 dakika inkübe edildi. Tepkime süresi sonunda 60 μl ' lik tepkime karışımı nitroselüloz filtreler emdirildi. Filtreler nitroselüloz yıkama tamponu ile yıkandı ve kurutuldu. Bağlanan radyoaktivite sıvı sintilasyon sayacında ölçüldü. Tablo' daki yüzde değerleri K562 ve MEL hücrelerinde en yüksek GTP bağlayan kesimlere göre belirlenen nisbi GTP bağlama değerleridir.

3.2.2. Hücre Alt Kesimlerinde (^{35}S) GTP γS Bağlama Etkinliği

K562 ve MEL hücrelerinin kontrol ve farklılaşmış gruplarından elde edilen ham hücre özütü, S-30 (post-mitokondri) ve P-30 (membran) kesimlerinde guanin nükleotid bağlama etkinlikleri GTP' nin hidrolizlenmeyen analogu (^{35}S) GTP γS varlığında saptandı. (^3H) GTP bağlama testinde olduğu gibi K562 hücrelerinin farklılaşma grubu GTP bağlama etkinliğinde belirgin bir artmaya karşılık MEL hücrelerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 8.).

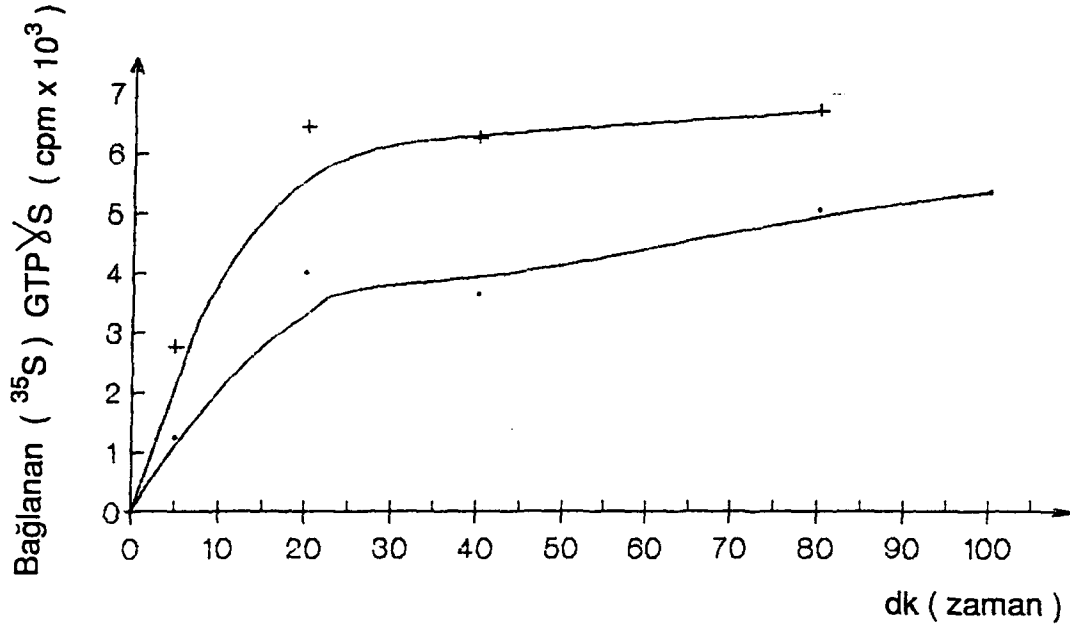
	Bağlanan GTP (fmol)			Bağlanan GTP (%)		
	Hücre			Hücre		
	P-30	S-30	Özütü	P-30	S-30	Özütü
K562 (K)	4,0	2,3	1,8	29	17	13
K562 (F)	13,8	2,2	3,2	100	16	23
MEL (K)	4,2	2,5	1,8	100	60	43
MEL (F)	1,2	1,5	1,5	28	36	55

Tablo 8. K562 ve MEL Hücre Alt Kesimlerinde (^{35}S) GTP γ S Bağlama Etkinlikleri: K562 ve MEL hücrelerinin 20 μg protein içeren kontrol ve farklılaşmış hücre özütü, S-30 (post-mitokondri) ve P-30 (membran) alt kesimlerinde GTP bağlama etkinliği GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu olan (^{35}S) GTP γ S varlığında incelendi. (^3H) GTP yerine (^{35}S) GTP γ S (0,75 μCi)'nin kullanıldığı tepkime Tablo 7.' de belirtildiği şekilde yürütüldü. Tepkime sonrası radyoaktivite yine Tablo 7.' de açıklandığı gibi saptandı. Tablo 8.' deki yüzde değerleri; K562 ve MEL hücrelerinde en yüksek GTP bağlayan kesimlere göre belirlenen nisbi GTP bağlama değerleridir.

3.2.3. K562 Membran Kesimlerinde (^{35}S) GTP γ S Bağlama Koşullarının Belirlenmesi

3.2.3.1. Zaman Kinetiği

K562 membran kesimlerinde (^{35}S) GTP γ S bağlanma tepkimesi için uygun koşulların belirlenmesi amacıyla, kontrol ve farklılaşmış membran (P-30) kesimlerinde (^{35}S) GTP γ S bağlanma etkinliği için zaman kinetiği incelendi.



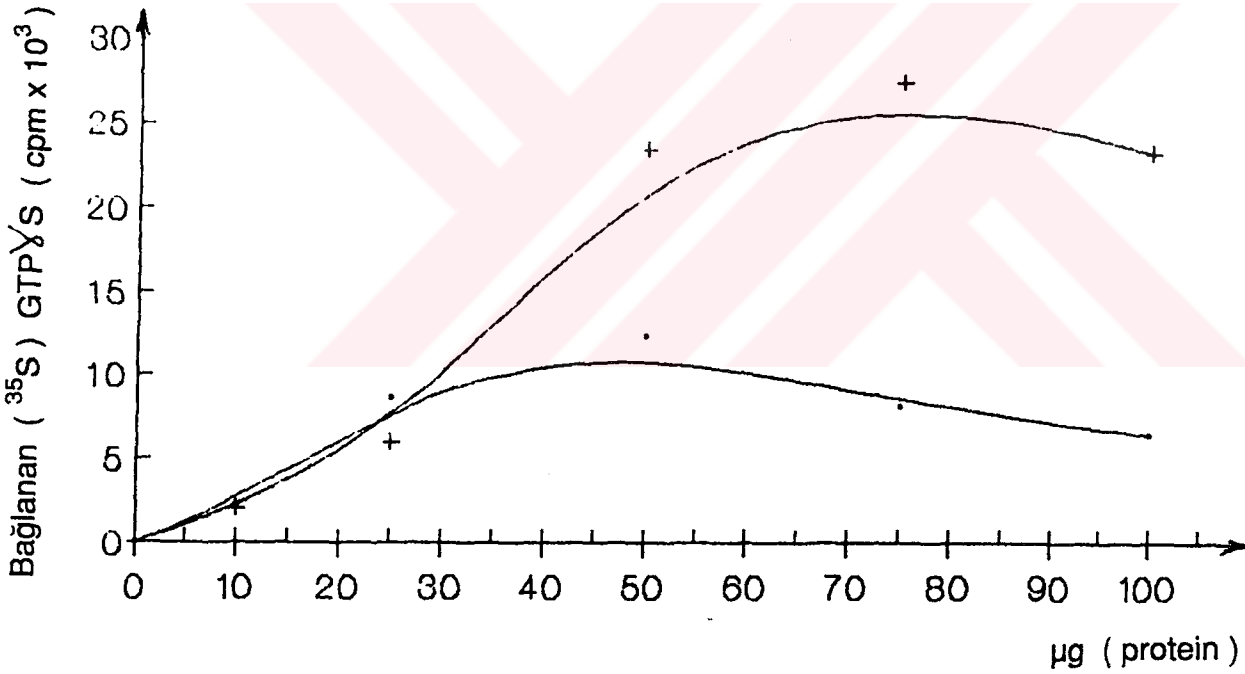
Şekil 9. K562 Hücrelerinin Kontrol ve Farklılaşmış Membran Kesimlerinde GTP γ S Bağlama Kinetiği: 20 μ g protein içeren K ve F membran kesimleri 60 μ l hacimde 32°C' ta 5, 20, 40, 80 ve 100 dakika süreyle gereç ve yöntemlerde açıklandığı şekilde inkübe edildi. Örnekler nitroselüloz filtrele- re emdirildi, filtreler yıkandı ve kurutuldu. Bağlanan (³⁵S) GTP γ S miktarı cpm olarak belirlendi.

Zaman (dk)	Bağlanan GTP (fmol)		Bağlanan GTP (%)	
	P-30 (K)	P-30 (F)	P-30 (K)	P-30 (F)
5	0,5	1,1	22	39
20	1,7	2,7	74	96
40	1,5	2,6	65	92
80	2,3	2,8	100	100
100	2,2	1,5	96	53

Tablo 9. CPM değerleri gereç ve yöntemlerde verilen formüller fmol boyutlara çevrildi: 20 μ g protein içeren K ve F membran örneklerinde GTP γ S bağlama etkinliği 20 dakikada doyuma ulaştı. (GTP γ S bağlama etkinliği dakikadaki sayım (cpm) olarak gösterilmiştir.) 20 dakikadaki GTP γ S bağ- lanması K için 4000 cpm, F için 6500 cpm olarak belirlendi. F grubundaki bağlanma kapasitesi K grubuna göre % 62,5 daha artmıştır.

3.2.3.2. Derişim Eğrisi

K562 hücrelerinden hazırlanan membran kesimlerinde GTP γ S bağlanma etkinliğinin protein derişimine bağımlılığı, tepkime karışımındaki membran protein miktarı 10 ile 100 μ g arasında arttırarak incelendi. (Şekil 10, Tablo 10) GTP γ S miktarının protein miktarlarına bağımlı olarak arttığı ve maksimum bağlanmanın K grubunda 50 μ g, F grubunda 75 μ g protein varlığında gerçekleştiği belirlendi. Protein miktarı maksimum bağlanmanın gerçekleştiği değerler yüksek olduğunda ise, her iki grupta da bağlanan GTP γ S miktarında azalma gözlemlendi.



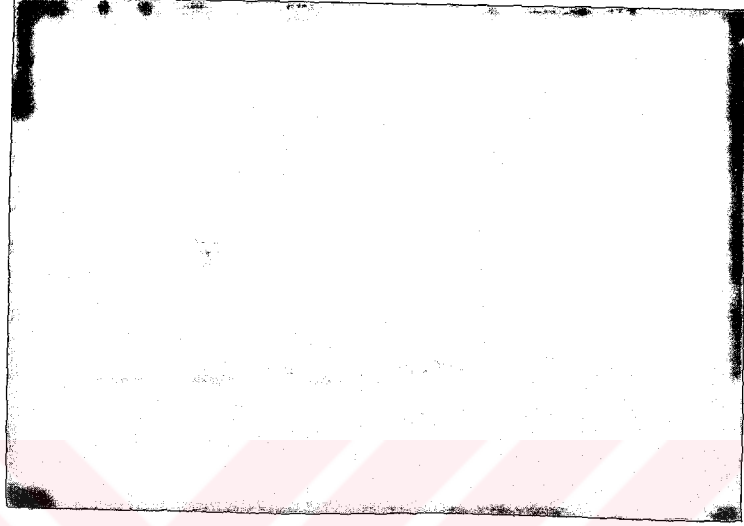
Şekil 10. GTP S bağlama etkinliğinin protein miktarına bağımlılığı: K562 hücrelerinin kontrol (K) ve farklılaşmış (F) gruplarından membran kesimleri (P-30) gereç ve yöntemlerde açıklandığı şekilde hazırlandı ve protein miktarları belirlendi. 0,75 μ Ci (³⁵S) GTP γ S içeren 60 μ l'lik tepkime karışımına artan miktarlarda (0-100 μ g) membran proteinleri eklendi. Bağlanan (³⁵S)GTP γ S sıvı sintilasyon sayacında cpm olarak saptandı.

Protein (ug) Miktarları	Bağlanan GTP (fmol)		Bağlanan GTP (%)	
	P-30(K)	P-30(F)	P-30(K)	P-30(F)
10	1,1	0,8	21	7
25	3,6	2,5	70	22
50	5,1	9,7	100	85
75	3,4	11,4	67	100
100	2,9	9,6	57	84

Tablo 10. Artan protein miktarlarında bağlanan GTP γ S' in molar boyutlarda incelenmesi: Şekil 10.' daki bulgular gereç ve yöntemlerdeki formül kullanılarak cpm' den fmol' e çevrilmiştir. Tablo' daki yüzde bağlanma; (K) ve (F) gruplarındaki en yüksek bağlanmaya göre belirlenen nisbi GTP γ S bağlama değerleridir.

3.3. Kontrol ve Farklılaşmış Hücre Kesimlerinde G protein Miktarlarının İmmünolojik Problar Kullanılarak Karşılaştırılması.

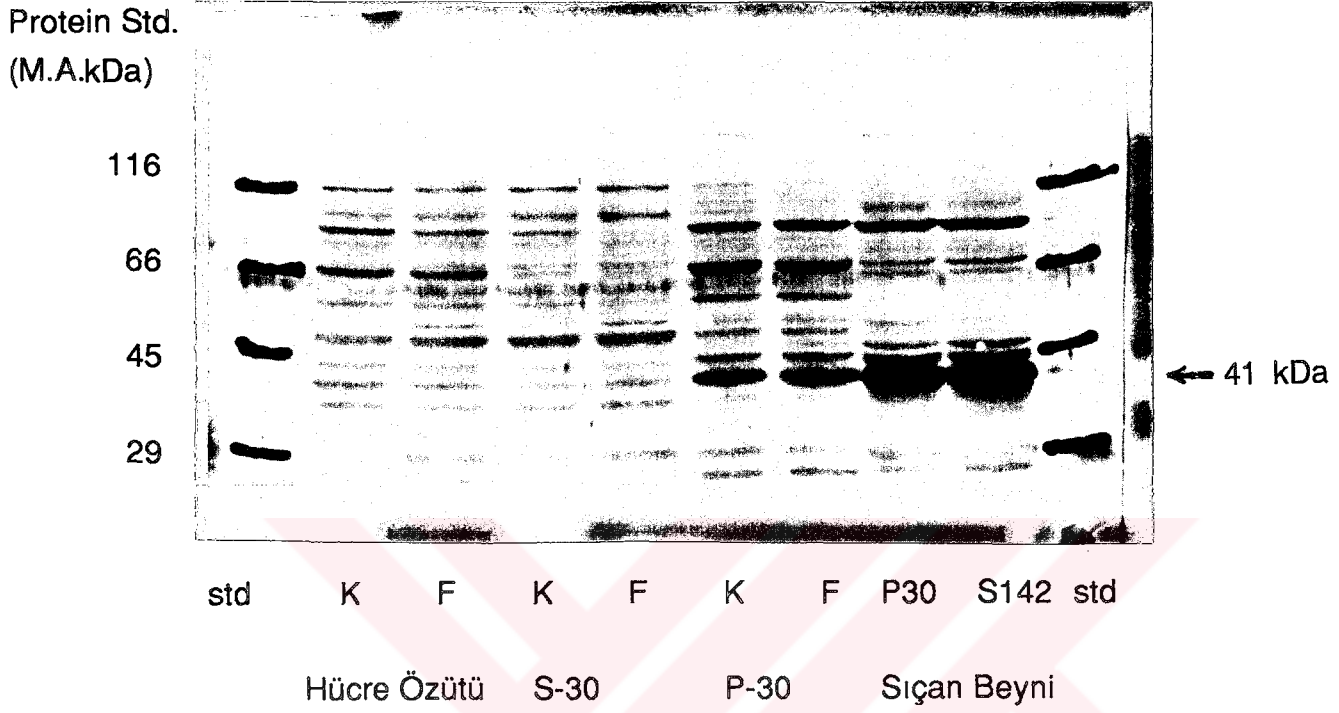
Kontrol ve farklılaşmış MEL hücre özütlerinde G protein miktarları Western Blot yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Özüt proteinleri, SDS poliakrilamid gel elektroforeziyle molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra, nitroselüloz membranlara aktarıldı ve G proteinlerinin α altbirimlerine özgün antikora gereç ve yöntemlerde belirtildiği şekilde etkileştirildi (Şekil 11.). MEL hücrelerinde, kontrol ve farklılaşmış özütlerdeki dansitometrik analiz sonucu G α altbirimlerinin miktarlarında fark belirlenmedi.



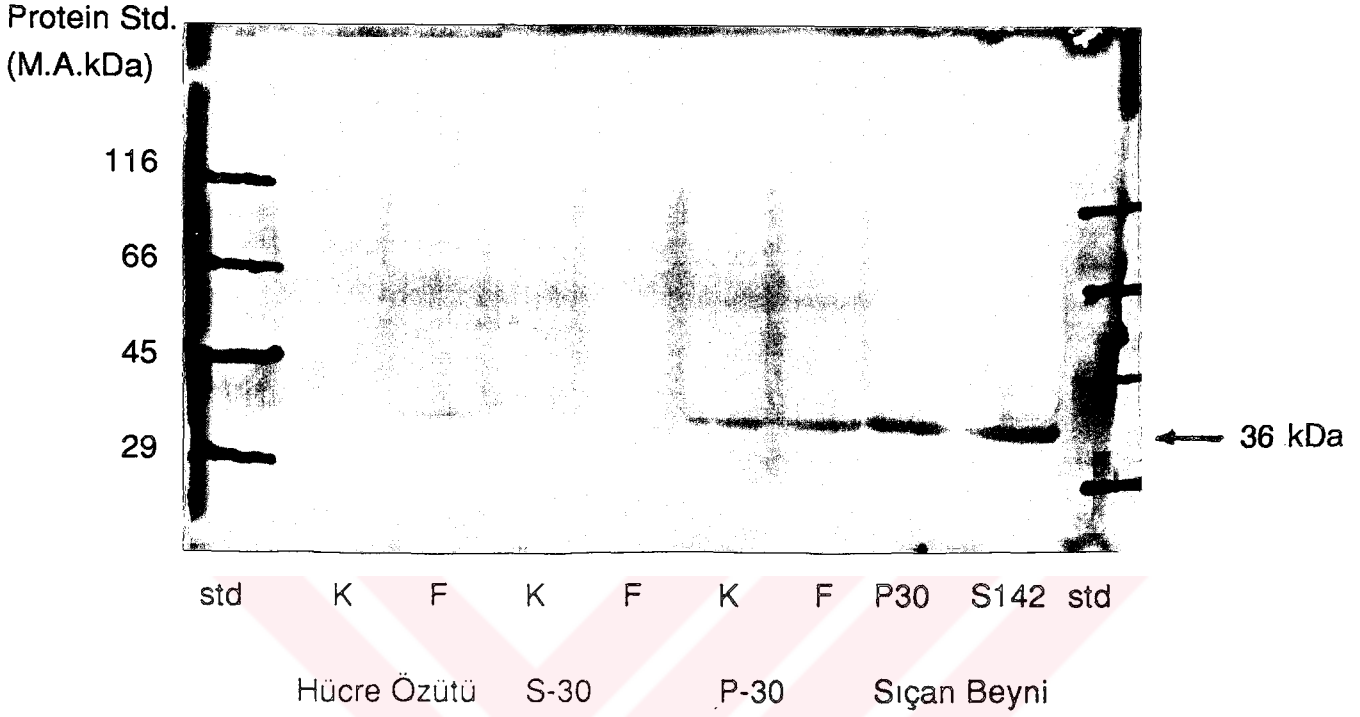
33µg 66µg 99µg 33µg 66µg 99µg

Şekil 11. MEL hücre özütlerinde G_{α} -altbirim miktarlarının Western Blot yöntemiyle belirlenmesi: Kontrol ve farklılaşmış MEL hücrelerinden elde edilen ham hücre özütleri artan miktarlarda (33µg, 66µg, 99µg) SDS poliakrilamid gel elektroforezine uygulanarak molekül ağırlıklarına göre ayrıldılar ve nitroselüloz filtrelere aktarıldılar. (Şekil 11.' de P960 (G_{α} ortak) antikoruna ile etkileştirilmiş filtre görülmektedir.)

K562 hücre özütlerinden hazırlanan P-30 ve S-30 kesimleri de G proteinlerinin ortak α -altbirimlerine (Şekil 12) özgün antikorla etkileştirildi. G protein miktarlarının P30 kesimlerinde zenginleştiği, ancak kontrol ve farklılaşmış kesimler arasında G protein altbirim miktarları açısından önemli bir fark olmadığı saptandı.



Şekil 12. K562 hücre kesimlerinde G_{α} -altbirim miktarlarının Western Blot yöntemiyle belirlenmesi: Kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden hazırlanan ve 25 μ g protein içeren ham hücre özütü, S-30 ve P-30 (membran) kesimleri SDS-poliakrilamit gel elektroforezine uygulandı. Proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra P960 antikoruyla gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi etkileştirildi.



Şekil 13. K562 hücre kesimlerinde $G\beta$ -altbirim miktarlarının Western Blot yöntemiyle belirlenmesi: Kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden hazırlanan ve 25 μg protein içeren ham hücre özütü, S-30 ve P-30 (membran) kesimleri SDS-poliakrilamit gel elektroforezine uygulandı. Proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra P960 antikoruyla gereç ve yöntemlerde anlatıldığı gibi etkileştirildi.

TARTIŞMA

Hücre içi sinyal ileti sistemlerinde, guanin nükleotidlerini bağlayan proteinler olarak bilinen G proteinleri, hücre zarı tarafından alınan sinyallerin, hücre içi sinyallere dönüştürülmesinde görev alan aracı moleküllerdir. Ayrıca taşıyım ve salgı-lama olaylarını düzenledikleri düşünülmektedir. Son zamanlarda yürütülen bazı çalışmalar G proteinlerinin hücre farklılaşmasında da rol oynayabileceğini düşün-dürmüştür. Mulleney ve Milligan nöroblastoma x glioma hibrit hücrelerinde yürüt-tükleri bir çalışmada hücre içi cAMP derişimini arttırarak farklılaşmaya yol açan koşullar altında G_o 'ın α altbiriminde artış gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada boğ-maca toksininin BC3H1 kas hücrelerinde büyümeyi durdurarak farklılaşmayı uyar-dığı gösterilmiştir (50). Bu araştırmacılara göre, boğmaca toksini bu hücrelerin zarın-da bulunan ve bü-yüme faktörlerine özgün reseptörlerden gelen sinyalleri hücre içine aktaran G pro-teinini ADP-ribozillemektedir. HL60 ve U392 monositlerinde G_i miktarlarının farklılaşmaya koşut olarak arttığı gözlemlenmiştir (1,52). 3T3-L1 fibro-blast hücrelerinin lipolitik maddelerle (DEX-IBMX) yağ hücrelerine farklılaşması es-nasında G_s , G_i ve G_o miktarlarının değiştiği saptanmıştır (53).

MEL ve K562 hücreleri hemopoietik hücre proliferasyonunu ve gen anlatı-mının (ekspresyon) düzenlenmesini araştırmak için uygun model sistemleridir. Bu nedenle, eritroid hücre farklılaşmasında G proteinlerinin olası rolünü incelemek için MEL ve K562 hücreleri seçilmiştir. Fare eritrolösemi (MEL BB 88) hücrelerinin de hemin ile farklılaşmaya yönlendirilerek hemoglobin sentezi yaptıkları bilinmek-tedir (54, 55). Çalışmanın birinci bölümünde hemin çözeltisi ile farklılaşmaya in-düklenen K562 hücrelerinde benzidin pozitif oranı % 70 iken, DMSO ile farklılaş-maya indüklenen MEL hücrelerinde benzidin pozitif oranı % 65 olarak gözlenmiştir. Bu koşullar altında hücre sayısının kontrollere göre azaldığı saptanmıştır. Bu azal-ma indükleyicilerin hücre proliferasyonunu yavaşlattığını ileri süren literatür bulgu-larıyla uyum göstermektedir (56). İndükleyici kimyasalların plazma membranı ve iyon değişimlerinde etkin rolleri olduğu bildirilmiştir (57). Ancak bu maddelerin fark-lılaşmayı hangi mekanizmayla uyardıkları bilinmemektedir. Eritroid farklılaşmayı uyaran hormonlar hedef hücre yüzeyindeki özgün reseptörlere bağlanırlar. Bu re-

septörlerin G proteinleriyle kenetlenerek cAMP düzeylerini etkiledikleri düşünülmektedir.

Çalışmanın ikinci bölümünde G proteinlerinin eritroid hücre farklılaşmasında rol oynama olasılığı araştırılmıştır. Bu amaçla kontrol (K) ve farklılaşmış (F) MEL ve K562 hücrelerinde ham hücre özütü, S-30 (post-mitokondri) ve P-30 (membran) kesimleri elde edildi. G proteinlerinin yüksek ilgiyle guanin nükleotidlerini bağladıkları bilinmektedir. Bu nedenle G proteinlerinin tanımlanmasında (^3H) GTP ve (^{35}S) GTP γ S genel bir test sistemi olarak kullanılmaktadır. K562 hücrelerinin K ve F gruplarından elde edilen membran kesimleri (^3H) GTP'yi bağlama etkinlikleri açısından karşılaştırıldığında, F grubu membran kesimine bağlanan GTP miktarının K grubuna kıyasla iki kat yüksek olduğu gözlenirken MEL hücrelerinde, K grubundaki membran kesimine bağlanan GTP miktarının F grubuna bağlanan miktarın iki katı olduğu görülmüştür. K562 hücrelerinin miktarının F grubuna bağlanan miktarın iki katı olduğu görülmüştür. K562 hücrelerinin S-30 kesimlerinde, membran kesimlerinde olduğu gibi F grubundaki GTP bağlama etkinliği K grubunun iki katı iken MEL hücrelerinde S-30 kesimlerinde iki grup arasında GTP bağlama etkinliği açısından anlamlı bir fark saptanamamıştır. GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu olan (^{35}S) GTP γ S ile elde edilen bulgular aynı doğrultudadır: K562 hücrelerinin membran kesimlerinde F grubunun (^{35}S) GTP γ S' i bağlama etkinliği K grubunun 3,5 katı iken MEL hücrelerinin P-30 kesimlerinde K grubunun (^{35}S) GTP γ S'i bağlama etkinliği grubunun 3.5 katı kadardır. Bu bulgular K562 hücre membranlarında F grubunun, MEL hücre membranlarında ise K grubunun guanin nükleotit etkinliğinin diğer gruba göre yüksek olduğuna işaret etmektedir. K562 ve MEL hücrelerinin guanin nükleotidlerini bağlama etkinliklerinin farklılaşmaya koşut olarak zıt yönde değişmesini, her iki hücre tipinin eritroid kökenli olması nedeniyle açıklamak zordur. Ancak DMSO ve heminin insan ve fare eritroid hücre membranlarındaki farklı reseptörlere bağlanarak hücre farklılaşmasını farklı G proteinleri ile uyarması olasıdır. Eritroid farklılaşmanın farede eritropoietin (Epo), interleukin 3 (IL-3) ve insanda "erythroid-potentiating activity" (EPA) gibi glikoprotein hormonlarıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (58). Bu faktörlerin herbiri hedef hücrede farklı yüzey reseptörlerine bağlanmakta, ancak bu faktörlerin eritropoiezi hangi mekanizmayla düzenledikleri bilinmemektedir.

Bu çalışmada ayrıca GTP bağlama etkinliği için uygun koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. K562 hücrelerinden hazırlanan membran kesimlerinde GTP bağlama tepkimesinin zamana bağımlılığı incelenmiş ve 20 dakikalık tepkime süresinde her iki örnekte doyuma ulaşıldığı ve F grubundaki guanin nükleodit bağlama kapasitesinin kontrollerin yaklaşık 1,6 katı olduğu gözlenmiştir. Aynı tepkimenin protein derişimlerine bağımlılığı incelendiğinde, kontrol grubu için doyurucu membran protein derişiminin 50 µg olduğu belirlenmiştir. Doyurucu olmayan (<50 µg) derişimlerde kontrol ve farklılaşmış grupların GTP'yi bağlama etkinliklerinde fark gözlenmezken, maksimum bağlanma sağlayan protein derişimlerinde (K-50 µg, F-75 µg) farklılaşmış membran kesiminin bağlanma etkinliğinin, kontrolün yaklaşık iki katı olduğu saptanmıştır.

K562 ve MEL hücrelerinde kontrol ve farklılaşmış grupların guanin nükleotid bağlama etkinliklerinde gözlenen farklar, farklılaşma sürecinde G protein düzeylerinde değişiklikler olabileceğini düşündürmüştür. Bu olasılığı araştırmak amacıyla kontrol ve farklılaşmış hücrelerden hazırlanmış kesimlerde toplam protein miktarları "Western Blot" yöntemiyle belirlenmiştir. G proteinlerinin α ve β altbirimleriyle etkileşen antikorların kullanıldığı bu deneylerde kontrol ve farklılaşmış hücre kesimlerindeki G protein α ve β altbirim miktarları karşılaştırılmıştır. MEL hücrelerinde artan özüt miktarlarına bağımlı olarak G proteinlerinin 41 kDa ağırlıklı α altbirim miktarında artma gözlenmiş; ancak kontrol ve farklılaşmış özütler arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir. K562 hücre özütü, S-30 ve P-30 kesimlerinde de G proteinlerinin α ve β altbirimlerinin miktarları açısından kontrol ve farklılaşmış gruplar arasında önemli bir fark saptanamamıştır.

Son yıllarda bazı hücrelerde yürütülen çalışmalar G proteinlerinin hücre farklılaşmasında rol oynadığını düşündürmektedir. K562 ve MEL hücreleriyle yürütülen bu çalışmada farklılaşmaya koşut olarak GTP bağlama etkinliklerinde gözlenen değişiklikler, G proteinlerinin eritroid hücre farklılaşmasında da rol oynayabileceğini sezindirmiştir. Buna karşın immünblot deneyleri ise ham ve kısmen saflaştırılmış hücre kesimlerinde G protein miktarlarının farklılaşmaya paralel olarak değişmediğini göstermiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan antikorların farklı G proteinler için seçici olmamaları nedeniyle, G proteinlerinden birinin miktarında ortaya

çıkabilecek bir farkı saptamak mümkün olmamıştır. Oysa yukarıda da adı geçen diğer çalışmalar saf G proteinleriyle yada G_0 , G_S , ve G_i' ye özgün antikorlar kullanılarak yürütülmüştür. Gelecekte özgün antikorlarla tekrarlanacak immünblot deneyleri ve moleküler hibridizasyon çalışmaları G proteinlerinin eritroid hücre farklılaşmasındaki olası rolünü aydınlatacaktır.



ÖZET

Kültür ortamında çoğaltılan K562 ve MEL hücreleri kimyasal maddelerle farklılaşmaya indüklendiler. Diferansiyel santrifüj işlemlerinden sonra ham hücre özütünden S-30 (post mitokondri) ve P-30 (membran) kesimleri elde edildi. Bu kesimlerde GTP bağlama etkinlikleri incelendi.

K562 hücrelerinin membran kesimlerinde F (farklılaşmış) grubunun GTP bağlama etkinliği K (kontrol) grubuna göre iki kat daha fazla bulunmuştur. Oysa MEL hücrelerinin K grubunda GTP bağlama etkinliği F grubuna oranla iki mislidir.

GTP bağlama etkinliklerindeki farkın yanısıra, G protein miktarlarında da farklar olup olmadığının saptanması amacıyla ham hücre özütü, S-30 ve P-30 kesimlerinde özgün antikolar kullanarak "Western Blot" analizleri yapıldı. Blot' ların dansitometrik analizinde K ve F grupları arasında anlamlı bir fark gözlenemedi.

SUMMARY

K562 and MEL cell lines grown in suspension culture were chemically induced to differentiate with hemin and DMSO respectively. After differential centrifugation, the crude cell extracts, S-30 (post-mitochondria) and P-30 (membrane) fractions were obtained and GTP-binding assays were performed in these fractions. The cell membranes of the differentiated K562 cells showed a twofold increase in GTP-binding activity with respect to the control groups, whereas in MEL cells, the GTP-binding activity of the control cell membranes was twofold greater than that of the differentiated membranes.

Western blot analysis using specific antibodies was done to determine whether there were differences in G protein amounts between the control and differentiated cells. Densitometric measurements on the blots indicated that there were no significant differences in the total amounts of G protein upon differentiation of K562 and MEL cells.

KAYNAKLAR

1. Spiegel, A.M., G proteins in clinical medicine. Hospital Practice. 93-112 (1988)
2. Gilman, A. G proteins: Transducers of receptor - generated signals. Ann. Rev. Biochem. 56: 615-649 (1987)
3. Jones, D.T., Reed, R.R. Golf: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. Science 244: 790-795 (1989)
4. Snyder, S. H., Sklar, P.B., Pevsner, J. Molecular mechanisms of olfaction. J.Biol. Chem. 263: 13971-13974 (1988)
5. Hri, T., Ohaka, Y., Ui, M., Katada, T. Functional modification by cholera-toxin-catalyzed ADP-ribosylation of a guanine-nucleotide-binding regulatory protein serving as the substrate of pertussis toxin. FEBS. 202: 635-641 (1991).
6. Masters, S.B., Sullivan, K.A., Miller, R.T., Beiderman, B., Lopez., N.G., Ramachandran, J., Bourne, H.R. Carboxyl terminal domain of $G_{s\alpha}$ specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase. Science. 241: 448-451 (1988).
7. Katada, T., Oinuma, M., Ui, M. Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylyl cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. J. Biol. Chem. 261: 5215-5221 (1986).
8. Freissmuth, M., Gilman, A.G., Mutations of $G_{s\alpha}$ designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. J.Biol. Chem. 264: 21907-21914 (1989).

9. Masters, S.B., Miller, R.T., Chi, M-H., Chang, F-H., Beiderman, B., Lopez, N.G., Bourne, H. R. Mutations in the GTP-binding site of $G_s\alpha$ alter stimulation of adenylyl cyclase, *J.Biol. Chem.* 264: 15467-15474 (1989).
10. Tang, L., de Vos, A. M., Milburn, M. V., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, Miura, K., Ohtsuka, E., Kim, S-K. Structural differences between a ras oncogene protein and the normal protein. *Nature.* 337: 90-93 (1989).
11. Freissmuth, M., Casey, P, J., Gilman, A. G. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling *FASEB.* 3: 2125-2131 (1989).
12. Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, T. Structure and function of signal - transducing GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 349-400 (1991).
13. Milligan, G., Houslay, M. D., G proteins as mediators of Cellular signalling processes. *Molec. Phar. Cell. Reg.* 1: 55-56 (1990).
14. Bourne, H.R., Sanders, D.A., Mc Cormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349: 117-127 (1991).
15. Bourne, H.R., Sanders, D.A., Mc Cormick, F. The GTPase superfamily: conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* 348: 125-132 (1990).
16. Evans, T., Brown, M.L., Fraser, E.D., Northup, J. K. Purification of the major GTP - binding proteins from human placental membranes. *J.Biol. Chem.* 261: 7052-7059 (1986).
17. Waldo, G.L., Evans, T., Fraser, E.D., Northup, J.K., Martin, M.W., Harden, T.K. Identification and purification from bovine brain of a guanine-nucleotide-binding protein distinct from G_s , G_i and G_o . *Biochem. J.* 246: 431-439 (1987).

18. Yamamoto, K., Ikeda, K., Tanimoto, T., Takai, Y., Purification and characterization of a novel GTP - binding protein with a molecular weight of 24.000 from bovine brain membranes J.Biol. Chem. 263: 2897-2904 (1988).
19. Kahn, R.A., Gilman, A.G. The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of G_s by cholera toxin is itself a GTP binding protein. J. Biol. Chem. 261: 7906-7911 (1986).
20. Yamamoto, K., Konda, J., Hishido, T., Teranshi, Y., Takai, Y. Purification and characterization of a GTP-binding protein with a molecular weight of 20,000 in bovine brain membranes. J. Biol. Chem. 263: 9926-9932 (1988).
21. Bokoch, G.M., Parkos, C.A., Mumby, S.M. Purification and characterization of the 22,000-Dalton GTP-binding protein substrate for ADP-ribosylation by botulinum toxin, G_{22k} J.Biol.Chem. 263: 16744-16749 (1988).
22. Kahn, R.A., Goddard, C., Newkirk, M., Chemical and immunological characterization of the 21- kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. J.Biol.Chem. 263: 8282-8287 (1987)
23. Bor-Sagi, B.D., Feramisco, J. R., Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. Cell. 42: 841-848 (1985).
24. Hamm, H.E., Deretic, D., Hofmann, K. P., Schleicher, A., Kohl, Burkhard. Mechanism of action of monoclonal antibodies that block the light activation of the guanyl nucleotide-binding protein, transducin. J.Biol. Chem. 262: 10831-10838 (1987).
25. Navon, S.E., Fung, B.K-K. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. J.Biol. Chem. 262: 15746-15751 (1987).

26. Hingorani, V. N., Tobias, D.T., Hendeson, J.T., Ho, Y-K. Chemical cross-linking of bovine retinal transducin and cGMP Phosphodiesterase J.Biol.Chem. 263: 6916-6926 (1988).
27. Kahn, R.A., Gilman, A.G., ADP-Ribosylation of G_s promotes the dissociation of its α and β subunits. J.Biol.Chem. 259: 6235-6240 (1984).
28. Sullivan, K.A., Miller, R.T., Masters, S.B., Beiderman, B., Heiderman, W., Bourne, H.R., Identification of receptor contact site involved in receptor-G Protein coupling. Nature. 330: 758-762 (1987).
29. De Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, J., Naguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Kim, S-H. Three dimensional structure of an oncogene protein catalytic domain of human c-H-ras p21. Science. 239: 888-893. (1988).
30. Pfeuffer, T., Helmreich, E. J. M. Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylate cyclase by guanyl nucleotide analogues and separation of a nucleotide binding protein. J.Biol.Chem. 350: 867-876 (1975).
31. Northup, J.K., Sternweis, P.C., Smigel, M.D., Schleifer, L.S., Ross, E.M., Gilman, A.G. Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. Proc.Natl.Acad.Sci. 77: 6512-6520 (1980).
32. Cassel, D., Pfeuffer, T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. Proc.Natl.Acad.Sci. 75: 2669-2673 (1978).
33. Allen, M., Spiegel, M.D., Peter, G.M., Michael, A., Levine, M.D., Robert, W., Downs, M. D. Clinical implications of guanine nucleotide-binding proteins as receptor - effector couplers. Eng. J. Medicine. 312: 26-33 (1985).

34. Hurley, J.B., Simon, M.I., Teplow, D.B., Robishaw, J.D., Gilman, A.G. Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products Science. 226: 860-862 (1984).
35. Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Hewlett, E.L., Gilman, A.G. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. J.Biol.Chem. 258: 2072-2075 (1983).
36. Codina, J., Hildebrandt, J., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R.D., Nancarrow, C. R. Pertussis toxin substrate, the putative N_i component of adenylyl cyclases, is an $\alpha\beta$ heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. Proc.Natl.Acad. 80: 4276-4280 (1983).
37. Sternweis, P.C., Robishaw, J.D. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. J.Biol. Chem. 259: 13806-13813 (1984).
38. Goldsmith, P., Gierschik, P., Milligan, G.J., Unson, C.G., Vinitzky, R., Malech, H., Spiegel, A. Antibodies directed against synthetic peptides distinguish between GTP - binding proteins in neutrophil and brain. J.Biol.Chem. 262: 14683-14688 (1987).
39. Sherman, M.L., Shefman, T.D., Kufe, D.W. Modulation of cyclic AMP levels and differentiation by adenosine analogs in mouse erythroleukemic cells. J.Cell. Physiol. 134: 429-439 (1988).
40. Bull, B.S., Gorler, D.B. Morphology of the erythron Ed. Williams, W.J., Beutler, E., Eslev, A.J., Leithman. Hematology. Chapter: 30. (1991).
41. Pincus, S.M., Beckman, G., George, W.J. Inhibition of dimethylsulfoxide induced differentiation in friend erythroleukemic cells by diacylglycerols and phospholipase C. Biochem. Biophys. Res. Com. 125:491-499 (1984).

42. Marks, M.A., Rifkind, R.A., Erythroleukemic differentiation *Ann. Rev. Biochem.* 47: 419-448 (1978).
43. Anderson, L.C., Jokinen, M., Gahmberg, C.G. Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Nature.* 278: 364-365 (1979).
44. Gale, R.E., Clego, J.B., Huens, E.R. K562 Human leukemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature.* 280: 163-164 (1979).
45. Gopalakrishna, T.V., Anderson, W.F. Mouse erythroleukemia cells. 58: 507-511 (1979).
46. Sternweis, P., Robishaw, J. D. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. 259: 13806-13813 (1984).
47. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 364-365 (1970).
48. Codina, J., Hildebrandt, J.D., Sekuro, R.D., Birnbaumer, M., Bryan, J., Manclark, C.R., Iyengar, R., Birnbaumer, L. Purification and characterization of G proteins in *Methods in Enzymol.* Ed. Johnson, R.A., Corbin, J.D. 195: 243-329.
49. Mullaney, I., Milligan, G. Elevated levels of the guanine nucleotide binding protein, G_0 , are associated with differentiation of neuroblastoma glioma hybrid cells. *FEBS.Lett.* 244: 113-118 (1989).
50. Kelvin, D.J., Simard, G., Tai, H. H., Yomaguci, T. P., Connolly, J. A., Growth factors, signaling pathways and the regulation of proliferation and differentiation in BC3H1 Muscle cells. I.A. Pertussis Toxin Sensitive path-way is involved. *J.Cell.Biol.* 108: 159-167 (1989).

51. Murphy, P.M., Brann, M., Goldsmith, P., Spiegel, A., Malech, H.L., Detection of multiple forms of G_{iX} in HL60 cells. FEBS.Lett. 221: 81-86 (1987).
52. Offermans, S., Schafer, F., Hoffman, B., Bobbien, E., Spicher, K., Hinsch, D., Schultz, G., Rosenthal, W. Agonist-sensitive binding of photoreactive GTP analog to a G-protein - subunit in membranes of HL-60 cells. FEBS.Lett. 260: 14-18 (1990).
53. Gierschik, P., Morrow, B., Milligan, G., Rubin, C., Spiegel, A., Changes in the guanine nucleotide-binding proteins, G_i and G_o , during differentiation of 3T3-L1 cells. FEBS.Lett. 99: 103-106 (1986).
54. Friend, C., Scher, W., Holland, J.G., Sato, T., Hemoglobin Synthesis in Murine-Virus Induced Luekemic cells in vitro: Stimulation of erythroid differentiation by dimethylsulfoxide. 68: 378-382 (1971).
55. Hata, Y., Yamaji, Y., Shiotani, T., Fujita, J., Kamano, H., Ikada, K., Takahara, J., Irino, S. Induction of erythroid differentiation of K562 cells by carboxylimidazolium 5-olate. Biochem. Biophys. Res.Com.42: 2307-2312. (1991).
56. Tanaka, M., Levy, J., Tera da, M., Breslow, R., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Induction of differentiation of HL-60 cells by DMSO: Evidence for stochastic model not linked to the cell division. Can.Res. 42: 445-449 (1982).
57. Faletto, D.L., Macara, I. G., The role of Ca^{++} in DMSO-induced differentiation of friend el cells. J.Biol.Chem.260: 4884-4889 (1985).
58. Fraser, J.K., Lin, F-K., Berridge, M.V. Expression and modulation of specific high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. Blood. 71: 104-109 (1988).
59. Oliver, B., Lowry, H., Rosebrough, N.J., Forr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin reagent. J.Biol.Chem.193: 265-275. (1951).