

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

**NORMAL VE ANORMAL KOŞULLARDA G PROTEİN
EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ**

Tammam Sipahi

T 91460

DOKTORA TEZİ

**Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Beki KAN**

İSTANBUL, 1999

İÇİNDEKİLER

SAYFA No:

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
SUMMARY	iv
KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ	1
1.1 Hücreler Arasındaki İletişim	1
1.1.1 Kimyasal Habercilerinin Çeşitleri	1
1.1.2 Hormonların Salgılandıkları Bezler	2
1.1.2.1 Hipofiz Bezi	2
1.1.2.2 Hipofiz Tümörleri ve Hormon Salınımı	
Üzerindeki Etkisi	3
1.1.3 Hormonların Etkiledikleri Reseptörler	4
1.1.4 Sinyal İletim Mekanizmasının	
Birincil ve İkincil Ulakları	5
1.2 GTP-Bağlayan Proteinler Süperaillesinin Üyeleri	5
1.3 G Proteinlerinin Yapısı	7
1.3.1 G Proteininin α -Altbiriminin Yapısı	11
1.3.2 G Proteininin α -Altbirimlerinin Çeşitleri	12
1.3.3 $\beta\gamma$ -Altbiriminin Yapısı	14
1.4 G Proteini ve İnsan Hastalıkları	16
1.5 G Proteinleriyle Kenetli Sinyal İletiminde	19
Belirlenen Hastalıklar	
1.5.1 İşlev Kaybına Neden Olan Mutasyonlar	
Sonucu Oluşan Hastalıklar	19
1.5.1.1 Renk Körlüğü	19

1.5.1.2 Retinitis Pigmentosa	20
1.5.1.3 X'e Bağlı Nefrolojik Diabetes İnsipidus	21
1.5.1.4 Ailesel (Kalıtımsal) Glukokortikoid Yetmezliği	21
1.5.1.5 Albright Kalıtımsal Osteodistrofisi (AHO)	21
1.5.2 Uyarıcı Mutasyonlar Sonucu Oluşan Hastalıklar	23
1.5.2.1 McCune-Albright Sendromu (MAS)	23
1.5.2.2 Testotoksikoz	24
1.6 Heterotrimerik G proteinlerinin Onkogenik Roller	24
1.6.1 <i>gsp</i> Onkogeni	25
1.6.2 <i>gip</i> Onkogeni	32
1.6.3 <i>gep</i> Onkogeni	34
1.7 Tümör Baskılayıcı Genler	34
1.8 Çalışmanın Amacı	36
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER	37
2.1 Kimyasal Maddeler	37
2.2 Radyoaktif Maddeler	38
2.3 Elektroforetik Analizde Kullanılan standartlar	39
2.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	39
2.5 Kullanılan Çözeltiler	40
2.5.1 DNA'nın Elde Edilmesinde Kullanılan Çözeltiler	40
2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler	40
2.5.3 AgaroZ Gel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	41
2.5.4 SSCP Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	42

2.5.5 Gümüş Nitrat Boyamada Kullanılan Çözeltiler	44
2.5.6 Hibritleme İşleminde Kullanılan Çözeltiler	44
2.6 Dokulardan Genomik DNA İzolasyonu	46
2.7 Genomik DNA'nın Agaroz Gel Elektroforezi	46
2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	49
2.8.1 Kullanılan Primerlerin Dizileri	49
2.8.2 PZR Koşulları	50
2.8.3 Agaroz Gel Elektroforezi	51
2.9 SSCP (Tek Sarmal Komformasyon Polimorfizmi)	51
2.10 Örneklerin Nokta-Emdirme Yöntemiyle	
Membranlara Aktarılması	51
2.11 Hibritleme	52
2.11.1 Ön-Hibritleme	52
2.11.2 Kullanılan Allel-Seçici Problar	52
2.11.3 Oligonükleotit Probların İşaretlenmesi	53
2.11.4 Bağlanma Etkinliğinin Saptaması	54
2.11.5 Hibritleme	54
3. BULGULAR	55
3.1 Tümör Dokularından Genomik	
DNA İzolasyonu	55
3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	56
3.2.1 G _s Proteininin α -Altbirimini Kodlayan Genetik	
Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla	
Çoğaltılması	56
3.2.1.1 G _{sc} 'nin 201. Kodonunu İçeren Bölgenin	
Çoğaltılması	56

3.2.1.2 G_{sc} 'nın 201. Kodonu İçin Hazırlanan	
Negatif ve Pozitif Kontroller	56
3.2.1.3 G_{sc} 'nın 227. Kodonunu İçeren	
Bölgenin Çoğaltılması	57
3.2.1.4 G_{sc} 'nın 227. Kodonu İçin Hazırlanan	
Negatif ve Pozitif Kontroller	58
3.2.2 G_{i2} Proteininin α - Altbirimini Kodlayan	
Genetik Bölgelerin Polimeraz Zincir	
Reaksiyonuyla Çoğaltılması	59
3.2.2.1 $G_{i2\alpha}$ 'nın 179. ve 205. Kodonlarını İçeren	
Bölgenin Çoğaltılması	59
3.2.2.2 $G_{i2\alpha}$ 'nın 179. Kodonunu İçeren	
Bölgenin Çoğaltılması	59
3.2.2.3 $G_{i2\alpha}$ 'nın 205. Kodonunu İçeren	
Bölgenin Çoğaltılması	60
3.2.2.4 $G_{i2\alpha}$ 'nın 179. Kodonu İçin Hazırlanan	
Negatif ve Pozitif Kontroller	61
3.2.2.5 $G_{i2\alpha}$ 'nın 205. Kodonu İçin Hazırlanan	
Negatif ve Pozitif Kontroller	61
3.3 SSCP (Teksarmal Konformasyon polomorfizmi)	
Yöntemiyle Mutasyonların İncelenmesi	62
3.3.1 G_{sc} Geninin 8. Eksonundaki Mutasyonların	
SSCP Analiziyle İncelenmesi	62
3.3.2 G_{sc} Geninin 9. Eksonundaki Mutasyonların	
SSCP Yöntemiyle İncelenmesi	65
3.3.3 $G_{i2\alpha}$ Genindeki <i>gip</i> Mutasyonlarının SSCP	
Yöntemiyle İncelenmesi	67

3.4	<i>gsp</i> ve <i>gip</i> Mutasyonlarını Allel-Spesifik Oligonükleotit Hibritleme (ASOH) Yöntemiyle belirlenmesi	69
3.4.1	G _{sa} Geninin 8. Kodonundaki Mutasyonları ASOH ile Saptaması	70
3.4.2	G _{sα} Geninin 9. Kodonundaki Mutasyonların ASOH ile İncelenmesi	72
3.4.3	G _{12α} Geninin 5. Eksonundaki Mutasyonların ASOH Yöntemiyle İncelenmesi	73
3.4.4	G _{12α} Geninin 6. Eksonundaki Mutasyonların ASOH Yöntemiyle İncelenmesi	74
4.	TARTIŞMA	76
5.	SONUÇ	84
6.	KAYNAKLAR	85
7.	BİYOĞRAFI	98

TEŞEKKÜR

Bilimsel düşünceyi geliştirici ve yapıcı eleştirileri ile tezimin planlanmasından yazılmasına kadar her aşamada önemli katkılarda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Beki Kan'a gösterdiği anlayış ve destek için teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmayı destekleyen ve yardımlarını hiç esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nur Sayhan'a, sayın Prof. Dr. Fahir Özer'e, sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yaşar Kaynar'a, tezin yazılması sırasında yardımlarından dolayı arkadaşım Cevdet Nacar'a, M.Ü.T.F. Biyofizik ve Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dallarının öğretim üyeleri ve asistanlarına, katkılarından dolayı Kings College School of Medicine'den Chris Esapa'ya ve bu araştırmaya maddi destek sağlayan M.Ü. Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

ÖZET :

Bu çalışmada hücre sinyal iletim sisteminde önemli yere sahip olan G-proteinlerinin α -altbirimlerindeki olası mutasyonların endokrin sisteminin hipofiz tümörlerinde oynadığı rol ve bu mutasyonların hastalık mekanizmasındaki potansiyel önemi araştırıldı.

G_s ve G_i proteinlerinin α -altbirimlerindeki olası bazı mutasyonları incelemek için dokulardan DNA elde edildi. DNA elde edildikten sonra G_{sa} 'nın 201 ve 227 numaralı kodonları ile $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 numaralı kodonlarını içeren bölgeler özgün primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltıldı. PZR ürünleri agaroz gellerinde yürütüldü ve EtBr ile boyanarak UV altında görüntülendi.

PZR ürünlerindeki mutasyonlar, SSCP (Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi) yöntemi kullanılarak incelendi. Örnekler gliserollü veya gliserolsüz olarak, 0.5XMDE (Mutasyon Belirleme), ve % 6 denatüre edici olmayan poliakrilamit jellerinde elektroforeze tabi tutuldu ve gümüş nitratla boyandı. Ayrıca nokta-emdirme düzeneği kullanılarak naylon filtreye emdirilen PZR ürünleri radyoaktif işaretlenmiş allel seçici problarla hibritleştirildi.

SSCP yöntemi ile 5 hasta örneğinde 201 kodonunda 1 hasta örneğinde 227 kodonunda *gsp* mutasyonu düşünüldü. Ayrıca 179 ve 205 numaralı kodonlar için 3 hasta örneğinde *gip* mutasyonunu düşündüren farklar gözlemlendi.

G_{sa} 'nın 201 ve 227 G_{i2a} 'nın ise 179 ve 205 kodonlarına özgün kontrol problemlerle (R 201, Q227, R179 ve Q205) etkileştirilen örneklerin tümünde, beklendiği gibi, pozitif sinyal alındı. Denenmiş değişik mutant problemlerle ise etkileşim sonucunda 4 hasta örneğinde 201 (arjinin yerine sistein) mutasyonu saptandı. G_{i2a} 'nın 179 ve 205 kodonları için denenmiş problemlerle *gip* mutasyonuna rastlanmadı. R201C mutasyonları ile birtane R179P mutasyonu Kings College School of Medicine laboratuvarında yapılan dizi analiziyle doğrulandı.



SUMMARY

The overexpression of G-protein α -subunits as a result of mutations has been associated with growth and neoplasia. Furthermore, G- proteins are thought to play a role in tumor invasion and metastasis. In this study, the presence of *gsp* and *gip* mutations in 22 pituitary adenoma tissue was investigated. DNA was isolated from tissue and the region encompassing codons 201 and 227 of $G_{s\alpha}$ and codon 179 and 205 of $G_{i2\alpha}$ were amplified using polymerase chain reaction. To identify the presence of *gsp* and *gip* mutations in pituitary adenomas, DNA samples were denatured and subjected to SSCP analysis in non-denaturing polyacrylamide gels and MDE gels with or without 6% glycerol. Comparison of the mobility of the variously folded single-strand conformers of tumor and normal DNA revealed differences in five samples for exon 8, in one sample for exon 9 and three samples for exon 5-6. The same DNA samples were dot blotted onto nylon membranes and hybridized with radiolabeled allele specific oligonucleotide probes. As expected, positive signals were obtained with the wild-type (R 201, Q227, R179 and Q205) probes in all tissue samples. However, only 4 samples hybridized with the mutant (R 201 C) probe.

Kısaltmalar

ASOH: Allel Spesifik Oligonükleotit Hibritleme.

ADTA: Etilenediamintetraasetikasit.

EtBr : Etidyüm Brömür.

GH : Büyüme Hormonu

gr. : gram

GDP : Guanozin difosfat.

GTP : Guanozin 5'-O-(3-tiotrifosfat).

OD : Optik Yoğunluk

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi.

SSCP : Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi.

1. GİRİŞ

1.1 Hücreler Arasındaki İletişim

Çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki iletişim kimyasal haberciler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu haberciler farklı dokuların metabolik etkinliklerini düzenlemekte, organizmanın çevresel değişimlere uyum sağlamasına yardımcı olmakta ve organizmayı üreme sürecine hazırlamaktadırlar. Tüm kimyasal haberciler, habercinin varlığını saptayan ve reseptör adı verilen proteinler aracılığıyla işlev görürler. Kimyasal habercilerin özgün reseptörlere bağlanmasıyla bir dizi kimyasal tepkime sonucu hücre içi yanıt oluşur (1).

1.1.1 Kimyasal Habercilerinin Çeşitleri

Kimyasal haberciler çok çeşitlidirler ve değişik gruplar içinde sınıflandırılırlar:

- a) Sinir sisteminde görev alan asetilkolin, norepinefrin, serotonin ve dopamin gibi habercileri içeren *nörotransmitterler* (2).
- b) Glikoprotein yapısında olan ve viral infeksiyonlara karşı korunum mekanizmasını tetikleyen *interferonlar* (3).
- c) Bir canlı türünden başka bir canlı türüne geçebilen *feromonlar* (4).
- d) Büyüme faktörleri gibi *hormon benzeri peptidler*.
- e) Bir hücre yada hücre grupları tarafından vücut sıvılarına salgılanarak vücudun diğer hücrelerinde fizyolojik kontrol görevini yapan *hormonlar*.

Hormonların bazıları vücuttaki bütün dokuları etkilerken, (örneğin hipofiz ön bezinden salgılandıktan sonra kan yolu ile tüm vücuda dağılan ve vücut bölümlerinin çoğunda büyümeye neden olan *büyüme hormonu*), diğerleri ise hedef dokuyu seçip sadece onu etkilerler, (örneğin hipofiz ön bezinden salgılandıktan sonra sadece *hedef* doku olarak böbreküstü bezi korteksini uyaran ve adrenokortikal hormonların salgılanmalarını sağlayan *adrenokortikotropin*) (5).

1.1.2 Hormonların Salgılandıkları Bezler

Büyüme hormonu, adrenokortikotropin, tiroid uyarıcı hormon (TSH), folikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinizan hormon, prolaktin, antidiüretik hormon (vasopressin) ve oksitosin hormonları salgılayan **hipofiz bezi**, *kortizol ve aldosteron* salgılayan **böbreküstü bezi korteksi**, *tiroksin, triiodotironin ve kalsitonin* hormonları salgılayan **tiroid bezi**, *insülin ve glukagon* hormonları salgılayan **pankreasın langerhans adacıkları**, *östrojen ve progesteron* hormonları salgılayan **overler**, *testeron* hormonu salgılayan **testisler**, *parathormon* hormonu salgılayan **paratiroid bezi** ve *insan korionik gonadotropini, östrojen, progesteron ve insan somatomammotropini* hormonları salgılayan **plasenta** en önemli endokrin salgı bezleri (5) olarak sayılabilir.

1.1.2.1 Hipofiz Bezi

Beyin tabanında *sella turcica* üzerinde bulunan, 1 cm çapında ve 0.5-1 gram ağırlığında olan hipofiz bezi hipofizeal sap ile hipotalamusa bağlanmaktadır. Fizyolojik açıdan hipofiz bezi ön hipofiz ve arka hipofiz adını taşıyan iki farklı bölümden oluşur. Antidiüretik ve oksitosin hormonları arka hipofizden (nörohipofizden) salgılanırken, kalan hormonlar ise ön hipofizden salgılanırlar. Ön hipofiz bezinden

salgılanan büyüme hormonu (somatotropin hormon) 191 amino asit içeren tek polipeptid zincirinden oluşan bir proteindir. Erişkin plazmasındaki normal derişimi yaklaşık olarak 3 ng / ml'dir. Büyüme hormonu hücrelerin büyümesini ve mitozu arttırarak çok sayıda hücrenin gelişmesini sağlamaktadır. Bu hormonun salgılanmasının kontrolü *büyüme hormon serbestleştirici hormon* (GHRH) ile *büyüme hormonu baskılayıcı hormon* (GHIH) tarafından sağlanır (6).

1.1.2.2 Hipofiz Tümörleri ve Hormon Salınımı Üzerindeki Etkisi

Hipofiz bezinde değişik adenomlar gelişebilir. Bu adenomlar boyanma özelliklerine göre sınıflandırıldığında en önemlileri şunlardır :

1-Kromofob (Endokrin non aktif; fonksiyonel olmayan): Hipofiz tümörlerinin en sık rastlanılanıdır. Bu tümörler genellikle hormon salgılamazlar ve gri-beyaz renklidirler. Cushing sendromlu bazı hastalardaki hipofiz tümörleri kromofoblardan yada kromofoblarla karışık bazofil hücrelerden oluşur.

2- Asidofil adenomu: Büyüme hormonunun aşırı yapımına neden olurlar. Bu tümörler kemikleşme dönemi tamamlanmadan önce ortaya çıkarlarsa *gigantizme*, kemikleşme dönemi tamamlandıktan sonra ortaya çıkarlarsa *akromegaliye* neden olurlar.

3- Bazofil adenomu: En az görülen hipofiz adenomudur. Yüz, boyun ve gövdeyi kapsayan şişmanlık, hipertansiyon, deride siyanotik renk, meme ve batin derisinde morumsu çizgilenmeler ve gonadal bozukluklar gibi belirtilerle ortaya çıkan Cushing sendromu ile birlikte görülür (7).

Hipofiz adenomları için genel olarak kullanılan bu sınıflandırmaya, daha özgün olan ve hücre türüne göre düzenlenen yeni bir sınıflandırma şekli oluşturulmuştur (8) (Tablo 1.1).

Tablo 1.1 Hipofiz Adenom Türlerinin Dağılımı

Tümör tipi	Hastalık	Salgılanan Hormon	Yüzdesi
Somatotrof	Akromegali/gigantizm	GH	10-15
Prolaktinoma	Hipogonadizm	Prolaktin	25-40
Kortikotrof	Cushing sendromu	ACTH	10-15
Gonadotrof	Hipopituitarizm	FSH ve/veya LH	10-15
α -altbirimi	Hipopituitarizm	Serbest α -altbirimi	5
Tirotrof	Hipertiroidizm	TSH	<3
Fonksiyonel olmayan	Kütle etkisi	Hiçbiri	10-25

1.1.3 Hormonların Etkiledikleri Reseptörler

Hormonların bir kısmı sadece hücre içindeki reseptörlerle etkileşime girerken bir kısmı da hücre membranının dış yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşime girer. Hücre membranının dış yüzeyinde bulunan reseptörler 3 sınıftan oluşur: a) G-proteinleriyle kenetli reseptörler (GPKR) (9-11); b) iyon kanalı kenetli reseptörler; ve c) enzim kenetli reseptörler. G-proteinleriyle kenetli reseptörler hayvanlarda tanımlanmış yüzden fazla üyesi ile en geniş hücre-yüzey reseptörleri ailesini oluşturur. Bu reseptör ailesi membranı 7 kez kateden proteinler süperailisinin bir üyesidir (12).

1.1.4 Sinyal İletim Mekanizmasının Birincil ve İkincil Ulakları

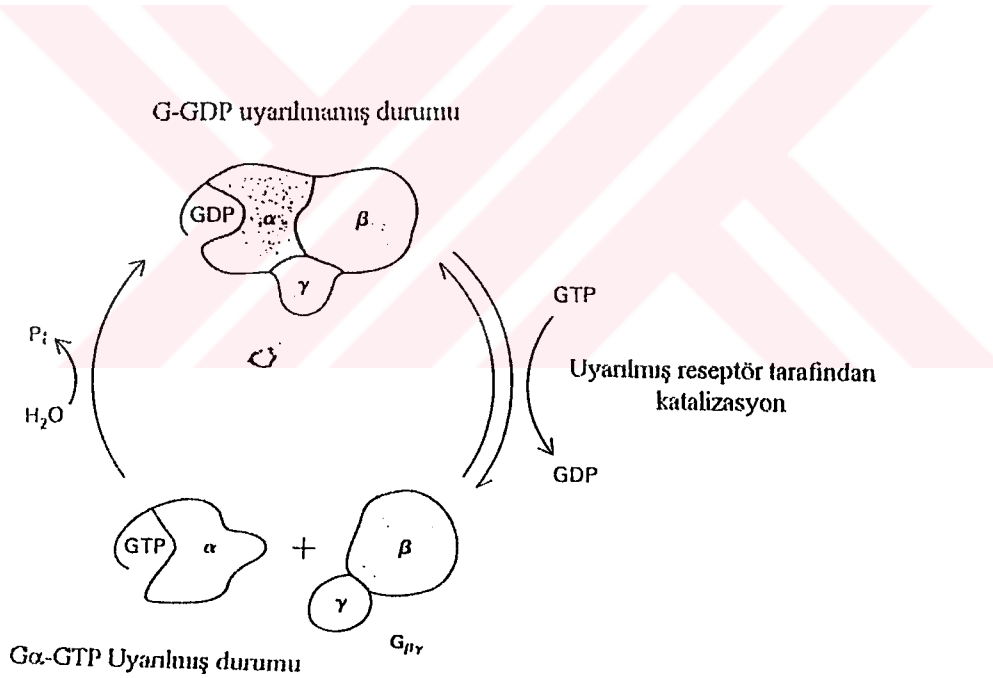
Hücre membranının dış yüzeyinde bulunan reseptörün hormonla etkileşimi sonucu *ikincil ulak (second messenger)* adı verilen bir aracı molekül etkinleşir. Hormonun kendisi ise birincil ulaktır. Siklik AMP (cAMP) ve fosfatidil inositol difosfat (PIP₂) en yaygın iki ikincil ulaktır. cAMP, *adenilat siklaz* yolunda görev alır ve protein kinazların etkinleşmesini sağlar. Fosfatidil inositol difosfat ise *fosfoinositit* tepkime şelalesinde görev alır ve hidrolizlenerek inositol trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) adlı iki hücre içi ulağa dönüşür. İnositol trifosfat kalsiyum kanallarını açarken, diaçilgliserol protein kinazları etkinleştirir (13).

1.2 GTP-Bağlayan Proteinler Süperaillesinin Üyeleri

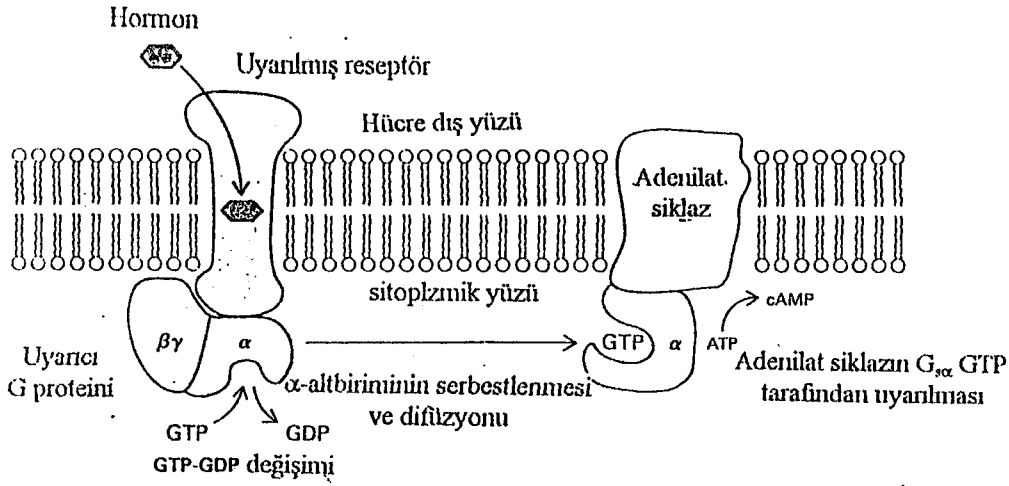
G proteinleri GTP-bağlayan proteinler süperaillesinin bir üyesidir. GTP-bağlayan proteinler süperaillesi şu üyelere oluşmaktadır: a) protein sentez faktörleri, b) membran-geçişli sinyal süreçlerinde yer alan heterotrimerik GTP-bağlayan proteinler (kısaca G proteini), c) protoonkogenik *ras* proteinleri (*Ras* proteinleri), d) *rab*, *rap*, *rho*, *rac*, *smg21*, *smg25*, *YPT*, *SEC4*, *ARF* genlerinin ürünleri olan düşük molekül ağırlıklı GTP-bağlayan proteinler (kısaca “küçük Gs”) ve e) *tübülinler* (14,15).

Sinyal iletiminde rol alan bütün GTP-bağlayan proteinler GTP bağlar ve hidrolizler. Bu özellik proteinin çok sayıdaki farklı hücresel süreçte moleküler bir anahtar olarak işlev görmesi açısından çok önemlidir. GTP-bağlayan proteinler, ligandın fosfat potansiyeline bağlı

olarak iki form (Şekil 1.1) (13) arasında gidip gelirler (14,16). GTP-bağlı form aktif yapıdır. Bu formda protein hedef molekülü tanıyıp onunla etkileşime girer (Şekil 1.2) (13). Bağlı GTP'nin GDP ve inorganik fosfata hidrolizlenmesiyle, yapı GDP-bağlı forma yani inaktif forma kayar. GDP-bağlı formun GTP-bağlı forma dönüşümü ise dışarıdaki bir GTP'nin bağlı GDP ile yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Bu basamak dışarıdaki enerjinin sisteme GTP formuyla girdiği basamaktır (14,17).



Şekil 1.1: G proteinlerinin GTPaz döngüsü.



Şekil 1.2: Adenilat siklazin G_s tarafından uyarılması.

1.3 G Proteinlerinin Yapısı

Çok sayıda hormonal ve duyuşal sinyal iletiminde görev alan heterotrimerik G proteinleri üç altbirimden oluşmaktadır: α , β ve γ . Bu altbirimlere ilişkin özellikler Tablo 1.2 ve Tablo 1.3'te gösterilmiştir (18). α -altbirimi guanin nükleotitleri bağlayan diğer proteinlerle yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterir ve birincil yapısı G proteinini tanımlar (19). β ve γ -altbirimleri birbirlerine sıkıca bağlıdırlar ve ancak çok güçlü denatürantlarla işlem görürlerse ayrılırlar (14). Her G proteininde $\beta\gamma$ kompleksi bulunmasına rağmen, G proteinleri α -altbirimlerine göre sınıflandırılır (19).

TABLO 1.2. Memeli G proteini α altbirimleri

AİLE	ALT TİP	EKSPRESYON	EFEKTÖRLER
$G\alpha_s$	$G\alpha_{ss}$ (2 form) ^a	heryer	adenilat siklaz (tüm tipler) ↑ Ca^{2+} kanalı (L tipi) ↑
	$G\alpha_{sL}$ (2 form) ^a	heryer	
	$G\alpha_{olf}$	koku epiteli	adenilat siklaz ↑
$G\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{gust}$	tat hücreleri	?
	$G\alpha_{t-r}$	retinal çubuk, tat hücreleri	cGMP fosfodiesteraz ↑
	$G\alpha_{t-c}$	retinal koni	cGMP fosfodiesteraz ↑
	$G\alpha_{i1}$	yaygın	adenilat siklaz (tip I, V, VI) ↓
	$G\alpha_{i2}$	heryer	
	$G\alpha_{i3}$	yaygın	
	$G\alpha_{o1}$ ^a	nöron, nöroendokrin hücre	Ca^{2+} kanalı (L-/N- tipi) ↓
	$G\alpha_{o2}$ ^a	nöron, nöroendokrin hücre	Ca^{2+} kanalı (L-/N- tipi) ↓
	$G\alpha_z$	nöron, trombosit	?
$G\alpha_q$	$G\alpha_q$	heryer	fosfolipaz C β ↑ ($\beta_3 \geq \beta_1 > \beta_2; \beta_4$)
	$G\alpha_{11}$	heryer	
	$G\alpha_{14}$	böbrek, akciğer, dalak	
	$G\alpha_{15/16}$ ^b	hemopoietik hücre	
$G\alpha_{12}$	$G\alpha_{12}$	heryer	?
	$G\alpha_{13}$	heryer	?

^a ekli varyantlar^b tür varyantları ($G\alpha_{15}$, fare; $G\alpha_{16}$, insan)

α -altbirimi guanin nükleotitlerinin (GDP veya GTP) bağlandığı yüksek ilginlikli tek bir bağlanma bölgesine sahiptir. α -altbiriminin GDP bağlı formu $\beta\gamma$ kompleksine sıkıca bağlıdır ve etkinleşmemiş formdadır. Buna karşın, α -altbiriminin GTP-bağlı formu $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılır (19,20), membran iç yüzeyinde difüzlenerak *efektör* protein ile etkileşime girer ve hücreşel yanıtı oluşturacak olan zincirleme tepkimeyi başlatır. Mg^{+2} ile birlikte alüminyum tetraflorür (AlF^4) GDP bağılı α -altbirimi ile etkileşerek GTP'yi taklit eder ve α -altbirimini etkinleştirebilir (13). Gittikçe artan sayıdaki kanıt, α -altbirimi gibi $\beta\gamma$ kompleksinin de bazı efektör moleküllerle etkileşime girebildiğini (21,22) ve bu moleküllerin etkinliğini değıştirebildiğini göstermektedir (23,24).

G proteinleri GDP-bağılı dinlenim durumunda iken heterotrimerik ($\alpha\beta\gamma$) yapıdadır ve reseptör yada efektörle etkileşim halinde değıldir. Ligandın reseptöre bağlanması ile reseptörde yapısal bir değışim gerçekleşir ve GDP-bağılı heterotrimerik formdaki G proteinine bağlanması için yüksek ilginliğe sahip reseptör bölgesi açığa çıkar (25,26). G proteini ile ligand tarafından uyarılmış reseptör arasındaki etkileşimin çok sayıda bölge üzerinden olduğı (20,27) ve G proteinin reseptör tarafından uyarılması ile G_α 'da GDP'nin GTP ile yer değıştirdiğı düşünölmektedir. GTP'nın bağlanması ile, α -altbiriminin reseptöre ve $\beta\gamma$ kompleksine ilgisi azalır, G_α .GTP $\beta\gamma$ -altbiriminden ayrılarak etkinleşir ve bir efektör molekölü ile etkileşime girer. $\beta\gamma$ -altbirimi de bazı efektörleri düzenliyebilir. Doğal GTPaz aktivitesi GTP'yi GDP'ye hidrolizler ve G proteinini aktif olmayan dinlenim durumuna döndürür (G_α .GDP). α -altbirimi efektörden ayrılarak, $\beta\gamma$ -altbirimi ile biraraya gelir (18,25).

TABLO 1.3. Memeli G Proteinini β ve γ Alt Birimleri

ALT TİP	EKSPRESYON	EFEKTÖR VE ETKİLEŞTİĞİ PROTEİN ^a
β_1	yaygın, retinal çubuk	
β_2	yaygın dağılım	
β_3	yaygın, retinal koni	adenilat siklaz tip I ↓
β_4	yaygın dağılım	adenilat siklaz tip II, IV ↑
β_5	çoğunlukla beyin	fosfolipaz C β ($\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$) ↑
γ_1	retinal çubuk	fosfolipaz A ₂ ↑
γ_2	çoğunlukla beyin	reseptör kinaz (GRK 2 ve 3) ↑
γ_3	çoğunlukla beyin	fosfoinositid 3 kinaz γ ↑
γ_4	çoğunlukla beyin	Raf ?
γ_5	yaygın dağılım	fosdusin
γ_7	yaygın dağılım	
γ_8	retinal koni	
γ_9	koku epiteli	
γ_{10}	yaygın dağılım	
γ_{11}	yaygın (beyin hariç)	

^a Düzenlenme veya etkileşim $\beta\gamma$ kompleksi üzerinden gerçekleşmektedir.

Çeşitli G proteinlerinin birincil yapıları arasında benzerliklerin araştırılması sonucu yüksek derecede benzerliğe sahip birkaç bölge ortaya çıkarılmıştır (14).

a) P Bölgesi: Sadece G proteinlerinde değil nükleotit trifosfat kullanan birçok enzimde de ortak olan ve dizi motifi G-X-X-X-X-G-K-S/T olan bu bölgenin hidrolitik süreçlerde görev aldığı sanılmaktadır. Bu bölgenin bağlı GDP'nin α ve β fosforil gruplarına yakın olması ve Ha-ras p21 proteininin 12 no'lu kodonundaki Gly→Val mutasyonunun

GTPaz aktivitesinin kaybolmasına neden olması bu varsayımı güçlendirmektedir (26).

b) E Bölgesi: *Ras*'ın 32-42 numaralı amino asitlerini kapsayan bu bölge efektör molekülüyle etkileşime girmesi nedeniyle E bölgesi olarak adlandırılmaktadır. *ras* p21 proteinin bu bölgesindeki mutasyonlar, GTP bağlama özelliğini etkilememeksizin transformasyon etkinliğinin yok olmasına neden olmaktadır. Bu bölgenin dizisi farklı aileler arasında değil sadece aynı aile içinde güçlü olarak korunmaktadır (15).

c) G Bölgesi: Bütün GTP-bağlayan proteinlerde korunan ve N-K-X-D dizi motifini içeren bu bölge, GTP'nin guanin halkası ile doğrudan etkileşime girmektedir (28,29).

d) G' Bölgesi: Dizi motifi D-X-X-G-Q olan bu bölge birçok GTP-bağlayan proteinde yüksek oranda korunmuştur. Bu bölgenin GDP-ve GTP-bağlı durumlar arasındaki yapısal değişimde görev aldığı sanılmaktadır (30).

e) G'' Bölgesi: Bu bölge de GTP'nin guanin halkasına yakın bir bölgedir. Dizinin motifi ise H-(F/M)-T-C-A-(T/V)-D-T'dir (14).

1.3.1 G Proteinin α -Altbiriminin Yapısı:

Tüm α -altbirimleri kendi başlarına birer enzimdirler. Bu proteinler içsel GTPaz etkinliğine sahiptirler ve bağlı GTP'nin terminal fosfatını hidrolizleyerek bağlı GDP ve serbest inorganik fosfatın (P_i) oluşmasını sağlarlar. Günümüze değin 20 farklı G protein α -altbirimi tanımlanmıştır (31). α -altbirimleri 39-52 kDa molekül ağırlığında bir protein ailesidir. Amino asit dizilişi olarak aralarında % 45-80 oranında benzerlik vardır. Birincil yapılarının farklılığı yanında translasyon sonrası değişimleri de farklıdır (25).

Son yıllarda G proteinlerinin yapı-işlev bağlantısını açıklamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. $G_{\alpha t} \cdot GTP\gamma S$, $G_{\alpha t} \cdot GDP$, $G_{\alpha t} \cdot AlF_4$, $G_{\alpha i} \cdot GTP\gamma S$, $G_{\alpha i} \cdot AlF_4$ ve $G_{\alpha i} \cdot GDP$ 'nin yapılarının çözümlenmesiyle (32), $G_{\alpha}-G_{\beta\gamma}$ etkileşimi ve GTP- hidrolizini belirleyen etmenler gibi birçok soruya yanıt aranmıştır. Bu çalışmalar α - altbiriminin GTPaz bölgesi (domain) ve α -heliks bölgesi olmak üzere iki bölgeden oluştuğu ortaya koymuştur (33,34). GTPaz bölgesi, GTPaz ailesine üye tüm proteinlerde ortaktır ve altı uzun β -şeridi çevreleyen beş α -heliks'ten oluşmuştur. Heterotrimerik G proteinlerine özgün α -heliks bölgesi ise tümüyle α -heliks yapıdadır. GTPaz bölgesi, reseptör, efektör ve $\beta\gamma$ -altbirimleri bağlama bölgesi içerir. α -heliks bölgesinin işlevi ise henüz açıklığa kavuşmamıştır (17,35,36).

1.3.2 G Proteinlerinin α -Altbirimlerinin Çeşitleri:

α -altbirimlerine göre G proteinleri Tablo 1.2'de görüldüğü gibi $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$ ve $G_{\alpha 12}$ olmak üzere dört aileye ayrılır.

G_s (stimülatör-uyarıcı) proteini adenilat siklaz etkinliğini arttırarak görev yapar. Adenilat siklaz etkinliğinin artmasıyla cAMP sentezi artar ve cAMP ikincil ulak olarak hücre içi yanıtı başlatır. Hücre içi yanıtın sonlanması için GTP'nin hidrolizlenerek GDP'ye dönüşmesi ve dolayısıyla G proteinin etkinliğinin ortadan kalkması gerekir, fakat bazı patolojik durumlarda bu mekanizma aksayabilir. Örneğin kolera toksininin enzimatik olarak NAD^+ 'yi parçalayıp ADP-riboz kalıntısını G_s 'in Arg187 veya Arg201 kalıntılarına eklemesiyle GTP'nin hidrolizi önlenir ve G proteini sürekli aktif formda kalarak adenilat siklazin sürekli olarak uyarılmasıyla birincil haberciden bağımsız olarak hücre içi

yanıt devam eder. Kolera toksini aynı işlemi $G_{t,}$, G_{olf} ve G_i için de gerçekleştirir (37).

G_i (inhibitör) proteini adenilat siklaz aktivitesini baskılayarak cAMP seviyesini düşürür. Boğmaca (pertussis) toksini G_i , G_o , G_t ve G_{gust} proteinlerinin α -altbiriminde, karboksil ucundan 4 amino asit kalıntısı uzaklıkta ve reseptörle etkileşimden sorumlu olan sistein amino asidini ADP-ribozilleyerek G proteinleri ile özgün reseptörü arasındaki keneti bozar (37). Sonuçta adenilat siklazın etkinliği engellenemediğinden cAMP düzeyi artar.

G_q proteini *fosfolipaz C* enzimini etkinleştirir. Bu enzim ise fosfatidil inositol difosfatı (PIP_2) parçalayarak inositol trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol'ün (DAG) oluşmasını sağlar. Diaçilgliserol protein kinazları uyarırken, inositol trifosfat ise iyon kanallarını etkinleştirir. Bu gruba dahil olan G_{16} proteini hemopoiyetik hücrelerin sadece belli bir alt grubunda bulunmasına rağmen işlevsel olarak farklı birçok reseptör tarafından etkinleştirilebilmektedir (38).

G_{12} hakkında ise henüz pek fazla birşey bilinmemektedir (31).

G_α 'nın reseptörlerle etkileşiminin ikisi amino ucunda diğeri de büyük olasılıkla karboksil ucunda olmak üzere üç bölgede gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Reseptörün etkinleşmesi sonucu $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılan α -altbiriminin birçok ikincil ulak enzimi ve iyon kanalı ile etkileşime girdiği ve onları düzenlediği bilinmektedir. Efektör-G protein etkileşiminin G_α 'nın arka yüzünde bulunan i4-L9 bölgesinde yerleşik olduğu düşünülmektedir (39). $G_{\alpha i}$ / $G_{\alpha s}$ kimeraları kullanılarak yapılan çalışmalar, adenilat siklazı uyaran bölgenin $G_{\alpha s}$ 'nın karboksil ucunda

235-356 bölgesinde bulunduğunu göstermiştir (17,40). Bu bölgedeki kalıntılara ilişkin mutasyonlar adenilat siklazu uyarma yeteneğinde azalmaya neden olmaktadır (41).

α -altbiriminin amino ucunun $\beta\gamma$ -altbirimi ile etkileşime giren bölge olduğu düşünülmektedir (42). α -altbiriminin amino ucunundan 2 kDa'luk bir parçanın tripsinle uzaklaştırılmasından sonra α -altbiriminin $\beta\gamma$ -altbirimi ile birleşme özelliği yok olmaktadır. Özellikle 7-10. amino asitlerin birleşme için önemli olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, 50-60. kalıntılar civarındaki bir bölgenin de etkileşimler açısından önemli olduğunu düşündürmektedir (21,25,43).

1.3.3 $\beta\gamma$ -Altbiriminin Yapısı:

$\beta\gamma$ -altbirimi sadece denatürasyon koşullarında ayrılabilen birbirine sıkıca bağlı bir dimer komplekstir (44,45). Aralarında % 50-90 oranında benzerlik bulunan 6 β -altbirimi ve birbirinden farklı 12 γ -altbirimi bulunmaktadır. β -altbirimi yaklaşık 36 kDa molekül ağırlığına sahip olup birbirinden tamamen farklı iki ayrı bölümden oluşmaktadır: N-ucu yaklaşık 20 amino asit içeren amfipatik α heliks yapısındadır, karboksil ucu ise yedi kez tekrar eden bir motiften oluşan pervane şeklindeki bir bölgedir (19). Tekrar eden bu 43 amino asitlik birimlere WD (triptofan, aspartik asit) tekrarı adı verilir. WD tekrarı pek çok farklı hücresel süreçte rol alan proteinlerde rastlanan bir motiftir.

γ -altbirimi herbiri 6-9 kDa ağırlığında olan daha küçük proteinlerden oluşan bir gruptur. γ -altbirimleri, β -altbirimlerine göre daha heterojendir; dizi benzerlikleri %27 ile %75 arasında değişir. Ayrıca, bu proteinlerin tümü translasyon sonrası değişimlere uğramakta

ve böylelikle γ -altbirimi ailesine daha fazla çeşitlilik katmaktadır. Farklı $\beta\gamma$ -altbirimlerdeki işlevsel farklılığın γ -altbirimleri tarafından belirlendiği düşünülmektedir (31,46).

$\beta\gamma$ -altbirimi kovalent olmayan mekanizmalarla etkileşimlere girmektedir. Bu etkileşimlerin belirli β -altbirimlerinin belirli γ -altbirimleri ile etkileşime girmesi açısından özgünlüğü vardır. Bunun da hücre sinyallerinin düzenlenmesinin başka bir düzeyi olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu γ -altbiriminin Cys36 ve Cys37'i içeren 14 amino asitlik bir bölgesinin β -altbirimi ile etkileşimde seçiciliği sağlamak için yeterli olduğu bulunmuştur (25). Ayrıca bu merkezi bölgenin β -altbirimi bağlama bölgesinin de bir parçası olduğu sanılmaktadır. γ -altbiriminin son üç amino asidi altbirimlerin birleşmesi açısından gereklidir.

$\beta\gamma$ -altbiriminin girdiği etkileşimler hakkında α -altbirimine göre pek fazla birşey bilinmemektedir. γ -altbirimi çapraz bağlantı temelinde α -altbirimi ile etkileşime girmektedir. Yapısal konum olarak birbirine çok yakın olmalarına rağmen γ -altbirimi olmaksızın α ve β -altbirimleri birbirleri ile etkileşime girememektedir. $\alpha\gamma$ dimeri fonksiyonel olarak aktif değildir, çünkü β ve γ -altbirimleri tek başlarına α -altbirimi ile işlevsel bir etkileşime girememektedir (29).

Son yıllara kadar sadece α -altbiriminin ikincil ulak efektör sistemini düzenlediği sanılıyordu. Fakat bugün bilinmektedir ki $\beta\gamma$ -altbirimleri gerek tek başlarına gerekse aktif α -altbirimi ile birlikte birçok ikincil ulak sisteminin düzenlenmesinde önemli rol almakta ve ilgili reseptörüyle fiziksel etkileşime girebilmektedir (25). $\beta\gamma$ -

altbirimlerinin G-proteini bağı reseptör kinazlar yoluyla reseptörlerin duyarsızlaşmasında da görev aldığı gösterilmiştir (47).

1.4 G Proteini ve İnsan Hastalıkları

Sinyal iletim yollarında oldukça kritik bir konuma sahip olmaları nedeniyle, G proteinlerinin yapı ve işlevlerindeki bozukluklar önemli hastalıklara neden olmaktadır (48,49). G proteinine bağı sinyal iletiminin insan organizmasındaki çeşitliliği nedeniyle körlük, hormon direnci, erken ergenlik ve neoplazi gibi birbirinden oldukça farklı klinik tabloları olan hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (50).

Birincil haberciden hedef organa kadar sinyal iletimi bir dizi ardışık basamak bütününden oluştuğundan bu basamakların herhangi birindeki bir bozukluk sonucu benzer klinik tablo oluşur. G proteini, efektör ve reseptör, hücre dışı sinyallerle tetiklenen bir dizi açma-kapama düğmesi olarak düşünülebilir. α -altbiriminin GTPaz etkinliği ve duyarsızlaşma işlemi bu açma-kapama düğmelerinin çalışma sürelerini ayarlar. Sinyal yolunun herhangi bir bileşenindeki değişimin düğmenin açılmasını önlemesi sonucu hedef organda sinyale karşı direnç oluşur. Benzer şekilde, düğmenin gerekmediği halde açılmasına veya uzun süre açık kalmasına neden olan değişiklikler birincil haberciden bağımsız olarak aşırı işleve neden olur. Artan veya azalan sinyal transdüksiyonunun kuramsal nedenleri ve insan hastalıklarında tanımlanmış örnekleri Tablo 1.4’de gösterilmiştir (50).

G proteinleriyle kenetli sinyal yolunun bileşenlerinden birisinin tümüyle ortadan kalkması doğal olarak sinyal yolunu tamamen bloke edecektir. Fakat bileşenin tamamen yok olmayıp da işlevinin

TABLO 1.4. Anormal Sinyal İletiminin Kuramsal Nedenleri ve İnsan Hastalıklarındaki Örnekleri

Azalan Sinyal İletimi

1. Membrana hedeflenme ve/veya sentez bozukluğu sonucu reseptör, G proteini veya efektör ekspresyonunun azalması
Örnek: Retinitis pigmentosa'daki rodopsin mutasyonları
DNI'deki V2 vazopresin reseptör mutasyonları
AHO'daki $G\alpha_s$ mutasyonları
2. Reseptör, G proteini veya efektörün yanlış aktivasyonu
Örnek: Boğmaca toksininin neden olduğu $G_{i/o}$ değişimi
AHO'daki $G\alpha_s$ mutasyonu (Arg385→His)
3. GTPaz etkinliğinin veya duyarsızlaşmanın artması nedeniyle reseptör, G proteini veya efektörün etkin kaldığı sürenin azalması
Örnek: Duyarsızlaşma artışına yol açan β -ARK etkinliğinin artışı
nedeniyle kalp hastalıklarında β -adrenerjik yanıtın azalması

Artan Sinyal İletimi

1. Reseptör, G proteini veya efektörün aşırı ekspresyonu
2. Reseptör, G proteini veya efektörün zamansız etkinliği
Örnek: Retinitis pigmentosada rodopsin mutasyonu (Lys296→Glu)
3. GTPaz etkinliğinin veya duyarsızlaşmanın azalması nedeniyle reseptör, G proteini veya efektörün etkin kaldığı sürenin artması
Örnek: Kolera toksininin neden olduğu G_s değişimi
Sporadik hipofiz ve tiroid tümörleri ve MAS'taki $G\alpha_s$ mutasyonları
Adrenal ve over tümörlerindeki $G\alpha_{12}$ mutasyonları

AHO: Albriht Kalıtsal Osteodistrofisi
ARK: β -Adrenerjik Reseptör Kinaz
MAS: McCune-Albright Sendromu

normale göre artması veya azalmasının oluşturacağı sonuçları kestirmek oldukça güçtür. Sonuç, G proteinleriyle kenetli sinyal yolundaki etkenlerin hangilerinin hız-sınırlayıcı (rate limiting) etkenler olduğuna bağlıdır. Araştırılmasına rağmen, bu problem henüz tam olarak çözülememiştir. Efektör, G proteini (51) ve reseptörlerdeki (52) mutasyonlara ilişkin çalışmalar sonucu sinyal iletimini önemli ölçüde değiştirebilecek potansiyel değişimler açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda insan hastalıklarında rol alan sinyal iletim yolları bileşenlerine ait mutasyonların bulunabileceği bölgeler (50,53-55) hakkında fikir edinilmiştir.

İşlev kaybına neden olan mutasyonlar sinyal yolunun bileşenlerinin sentezinin bozulmasına neden olduğu gibi, agonistin reseptöre bağlanmasında, reseptör-G proteini kenetlenmesinde, G proteinin GTP tarafından uyarılmasında veya G proteini-efektör etkileşimlerinde bozukluklara neden olur. Bunun sonucunda oluşan hastalıklar ise şunlardır : kalıtsal glukokortikoid yetersizliği, nefrojenik diabetes insipidus (NDI), retinitis pigmentosumun bazı türleri, Albright kalıtsal osteodistrofisi (AHO) ve çeşitli renk körlükleri (51,54).

Uyarıcı mutasyonlar ise G proteinlerinin agonistten bağımsız olarak reseptör tarafından etkinleştirilmesine ve azalan GTPaz etkinliği nedeniyle G proteinin sürekli aktif kalmasına neden olmaktadır. Bunların sonucunda oluşan hastalıklar ise şunlardır : McCune-Albright sendromu (56,57) ve testotoksikoz.

Birçok hücre sel yanıt farklı G proteinleriyle kenetli yollar tarafından pozitif veya negatif olarak düzenlenmektedir. Örneğin birçok endokrin salgı bezinde hem hormon salınımı hem de hücre bölünmesi G_q

veya G_s eşlikli yollarla uyarılmakta ve G_i/G_o eşlikli yollarla baskılanmaktadır (58). Hücresel yanıtın bu şekilde düzenlenmesi sonucunda uyarıcı yolların sürekli etkinliği veya baskılayıcı yolların işlev kaybı, hedef organda aynı anormal yanıtın oluşmasını sağlamaktadır. Örneğin hiperprolaktinemi, G_q 'nın sürekli etkinliği veya G_i/G_o 'nun işlevini kaybetmesi sonucu oluşur (50). G proteini eşlikli bir yoldaki bozukluğun klinik tablo olarak görünümü, etkilenen bileşenin hücresel dağılımına bağlıdır. Bir tek hücre tipinde ekspres edilen hücre bileşenindeki bozukluğun (örneğin rodopsin) klinik tablosu tek bir odakta toplanırken, organizmanın tamamında ekspresyonu daha yaygın bulunan bir bileşenin (örneğin β adrenerjik reseptörü) bozukluğu sonucunda oluşan klinik tablo organizmanın bütününe yansıyacaktır (50,59). Bu kural özellikle bir sonraki kuşağa aktarılan, yani eşey hücrelerindeki mutasyonlar için geçerlidir. Buna karşılık organizmanın her tarafında ekspres edilen bir bileşene ait gende somatik bir mutasyon tek bir odakta gerçekleşmişse, hastalık tek bir odakta kalacaktır.

1.5 G proteinleriyle Kenetli Sinyal İletiminde Belirlenen Hastalıklar

1.5.1 İşlev Kaybına Neden Olan Mutasyonlar Sonucu Oluşan Hastalıklar

1.5.1.1 Renk Körlüğü

G proteiniyle kenetli reseptörde meydana gelen mutasyonlar sonucu olduğu gösterilen ilk hastalıktır (60). Kırmızı ve yeşil koni opsinleri X kromozomu üzerindeki iki gen tarafından kodlanmaktadır.

Bu reseptörler belirli bir dalga boyundaki ışık tarafından uyarılmakta ve cGMP fosfodiesteraz aktivitesini düzenleyen özelleşmiş bir G proteini olan koni transdüsini ile kenetlenmiş bulunmaktadır. Koni opsin genindeki büyük kesiklerden (delesyon) tek baz değişimine kadar uzanan mutasyonlar renkli görme kaybı ile ilişkilendirilmiştir.

1.5.1.2 Retinitis Pigmentosa

Retinal çubuk fotoreseptörü olan rodopsini kodlayan genlerdeki mutasyonlar (61) sonucu retinitis pigmentosa'nın bazı otozomal baskın (dominant) ve çekinik (resesif) formları oluşmaktadır. Bu rodopsin mutasyonları retinal dejenerasyon nedeniyle ilerleyen (progressive) körlüğe neden olmaktadır. Hastalığın oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, anormal olarak katlanan reseptörün hücre içinde birikmesiyle oluştuğu sanılmaktadır.

Hastalığın çekinik formunun bulunduğu bir ailede rodopsinin hücre içi üçüncü halkasını kodlayan dizinin içinde zamansız bir durma kodonu oluşturan bir mutasyon sonucu olasılıkla reseptörün sentezi zamanından önce tamamlanacaktır. Hastalığın klinik tablosunun oluşması için iki allelin de etkilenmesi gerekmektedir. Hastalığın otozomal baskın formuna reseptörün çeşitli bölgelerindeki mutasyonların panoplisi eşlik etmektedir (62). Mutant rodopsin formları ile yapılan *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki, bu mutasyonlar reseptörün uygun şekilde katlanmasını önlemekte, bazı durumlarda ise reseptörün endoplazmik retikulumdan hücre membranına taşınmasına engel olmaktadır. Rodopsin sentezlemek üzere özelleşmiş olan çubuk hücreleri ise anormal olarak katlanmış rodopsinlerin birikimi sonucu ölmektedir. Baskın retinitis pigmentosum'un bir türünde ise lys296→glu mutasyonu

gerçekleşmektedir (63). Bu mutasyonun reseptörü sürekli olarak etkinleştirdiği gösterilmiştir. Bu durumda fotoreseptör dejenerasyonunun fototransdüksiyon yolunun sürekli uyarılması sonucu gerçekleştiği sanılmaktadır, ancak bu durumu dengelemek için duyarsızlaşmanın ortaya çıkmaması oldukça ilginçtir.

1.5.1.3 X'e Bağlı Nefrolojik Diabetes İnsipidus (NDI)

V2 vazopressin reseptöründeki mutasyon sonucu reseptörün işlevini kaybetmesiyle oluşur. Antidiüretik hormona karşı renal direnç gelişir (64,65). Genin erkeklerde hemizigos olması nedeniyle işlev kaybına neden olan herhangi bir mutasyon hemen hastalığın klinik tablosunun oluşmasına neden olacaktır.

1.5.1.4 Ailesel (Kalıtsal) Glukokortikoid Yetmezliği

ACTH'ye karşı direnç gelişmesi sonucu oluşur. ACTH reseptöründe işlev kaybına neden olan nokta mutasyonlar bulunmuştur (66). Farelerde cüceliğe neden olan, GHRH (growth hormone-releasing hormone) reseptöründeki duyarsız (missense) bir mutasyon bulunmuştur. Benzer mutasyonlar insanlardaki bazı kalıtsal cücelik formlarının anlaşılmasına yardımcı olabilir. G proteinleriyle kenetli reseptör hastalıklarının tümünde gözlenen ortak nokta etkilenen reseptörlerin yerel dağılımına uyan yerel fenotipik görünümлерidir.

1.5.1.5 Albright Kalıtsal Osteodistrofisi (AHO)

AHO, kısa boy, şişmanlık, yuvarlak yüz, deri altında kemikleşme veya kalsifikasyon ve fokal iskelet bozuklukları ile nitelenen bir hastalıktır. Hastaların çoğunluğunda membran G_s işlevi

yaklaşık olarak %50 azalmıştır. Etkilenmiş aile bireylerinde G_{sa} geninin çoklu ayırık (multiple distinct) heterozigos mutasyonları bulunmuştur (67,68). Mutasyonların çoğu mRNA ve/veya protein sentezini baskılamaktadır, fakat bazı duyarsız mutasyonların (Arg385→His) G_s reseptör kenetini bozduğu anlaşılmıştır (68-69). Aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan iki erkekte G_{sa} 'nin yüksek oranda korunan bir bölgesinde duyarsız bir mutasyon (Ala366→Ser) bulunmuştur (70). Bu hastalarda hem paratiroid hormon direncinin hem de gonadotropinden bağımsız erken ergenlik gelişiminin bulunması bazı değişimlerin reseptöre özgün eşleşmeleri değiştirdiğini düşündürmektedir. G_s yoluyla adenilat siklazın uyarılmasına bağlı çok sayıdaki hormona karşı (paratiroid hormonu, tirotrofin, gonadotropinler ve glukagon) direncin görüldüğü AHO fenotipi pseudohipoparatriodizm (PHP) tip Ia olarak adlandırılmaktadır. PHP tip Ia hastalarında G_s 'i uyaran ACTH ve vazopresin gibi diğer hormonlara karşı bir direncin klinik kanıtları genellikle gözlenmez. PHP hastalarının akrabalarında yalnızca AHO'nun ekspres edilmesi pseudopseudohipoparatriodizm (PPHP) olarak adlandırılır. Eksojen paratiroid hormonuna yanıt olarak üriner cAMP düzeyindeki normal ani artış, PHP hastalarında azalırken PPHP hastalarında normal kalmaktadır. AHO yokluğunda izole edilmiş paratiroid hormon direnci olan hastalarda (PHP Ib) paratiroid hormon reseptöründe bozukluk olduğu düşünülmektedir.

Gen ürününde %50 azalmanın nasıl direnç oluşturduğu halen açıklığa kavuşmamıştır. PPHP ve PHP hastalarının G_s etkinliğini azaltan mutasyonlara sahip olmasından dolayı başka ek etkenlerin hormon direncinin klinik tablosunu belirlemesi gerekmektedir.

1.5.2 Uyarıcı Mutasyonlar Sonucu Oluşan Hastalıklar:

1.5.2.1 McCune-Albright Sendromu (MAS)

Periferik seksüel erken gelişim, polyostotik fibröz displazi, deride café-au-lait (sütlü kahve rengine) pigmentasyon ve bir veya birkaç endokrin iç salgı bezinin (gonad, böbrek üstü korteksi, tiroid veya hipofiz somatotrofları) otonom aşırı işlevi (ki bunun sonucunda GH-salgılayan hipofiz adenomları, guatr hipertiroidizmi ve otozomal böbrek üstü hiperplazisi veya adenomu gibi endokronopatiler gelişir) ile nitelenen sporadik bir hastalıktır (71). cAMP, gonadların, tiroidin, böbrek üstü korteksin, somatotrofların, melanositlerin ve osteoblastların büyümesini ve/veya işlevini uyardığından, G_s sinyal yolunun aşırı derecede çalışması ile MAS'ta karakteristik olan deri ve kemik lezyonlarının oluştuğu düşünülebilir (72).

MAS'lı hastalarda G_{sa} 'da Arg201→Cys/His mutasyonları (*gsp* mutasyonları) bulunmuştur (73,74). Bu mutasyonlar GTPaz etkinliğini baskılayarak adenilat siklazin fazlaca uyarılmasını sağlamaktadır. Hastalarda mutasyonların mozaik dağılımı, embriyonik gelişimin erken aşamalarında ortaya çıkan somatik mutasyonları düşündürmektedir. Etkilenen tüm dokularda *gsp* mutasyonları bulunmaktadır. Çalışılan over ve böbrek üstü örneklerinde anormal olarak çoğalan bölgelerde diğer bölgelere göre daha fazla mutasyon bulunmuştur. Etkinliği arttıran G_{sa} mutasyonlarının fizyopatolojik sonuçları sadece fazla cAMP üzerinden olmayabilir. G_s , iyon kanallarının ve bir membran kalsiyum pompasının etkinliğini

düzenlediğinden (75), bu mutasyonların hücrel farklılaşma (76) ve hücreiçi membran trafiğinde (77) cAMP'den bağımsız rolleri de olabilir.

1.5.2.2 Testotoksikoz

Luteinizing hormon reseptöründeki (LHR) mutasyon sonucu oluşan bu hastalığın diğer adı Ailesel Erkek Erken Ergenlik Gelişimi (FMPP)'dir. Erkeklerde sınırlı otozomal baskın kalıtımı olan bu hastalığın moleküler fizyopatolojisi henüz açık değildir. Reseptörün altıncı halkasında Asp578→Gly mutasyonu bulunmuştur. Luteinizing hormon tek başına Leydig hücrelerindeki steroidogenesizi tetiklemeye yeterli iken, dişilerde overdeki steroidogenesizi uyarmak için hem LH hem de FSH'a gerek vardır. Bu nedenle LHR'nin zamansız etkinliği tek başına dişilerde erken ergenlik gelişimine neden olmaz (78).

1.6 Heterotrimerik G Proteinlerinin Onkogenik Roller

Hücre çoğalması, düzenleyici genler tarafından kontrol edilmektedir. Bu genler temelde iki gruba ayrılmaktadır: hücre çoğalmasını uyaran genler ve hücre çoğalmasını baskılayan genler. Bu genlerdeki iki tür mutasyon hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yani kansere neden olur. Bu iki mutasyon türü ise: a) çoğalmayı uyaran bir geni hiperaktif hale dönüştüren mutasyonlar (değişime uğrayan bu genler *onkogen*, normal allel ise *proto-onkogen* olarak adlandırılır). b) çoğalmayı baskılayan bir geni inaktif hale getiren mutasyonlar (değişime uğrayan bu genler ise *tümör baskılayıcı genler* olarak adlandırılır). Onkogene neden olan mutasyon baskın etkiye sahiptir. Diğer bir deyişle, hücredeki tek bir genin etkilenmesi kanserleşmeye yeterlidir. Tümör

baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ise çekinik etkilidir; dolayısıyla hücredeki her iki genin de etkilenmesi gerekir.

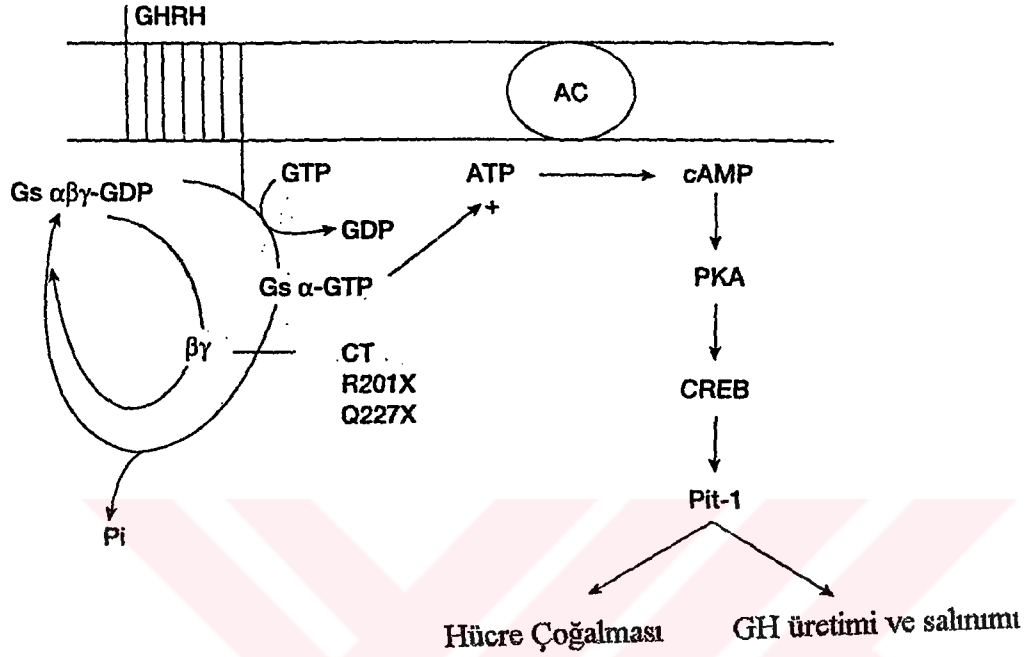
1.6.1 *gsp* onkogeni

Adenilat siklaz sinyal yolunun hücre çoğalmasına ilişkin etkisi hücre tipine bağlıdır. Belirli hücrelerde cAMP büyümeyi ve transformasyonu baskımlarken, başka hücrelerde çoğalmayı uyarıcı bir etki oluşturur (79-80). cAMP'yi mitogenik bir sinyal olarak tanıyan hücreler arasında hipofiz somatotrofları ve tiroid hücreleri de bulunmaktadır. Hipofiz somatotroflarının büyümesi GHRH tarafından sağlanırken, tiroid hücreleri tiroid uyarıcı hormona (TSH) yanıt vermektedir. Her iki trofik hormon da G_s 'e ve adenilat siklaz uyarısına kenetli reseptörler aracılığıyla çalışır (81). Bundan dolayı G_{sa} 'yı sürekli etkin kılan mutasyonların ilk önce hipofiz adenomlarında belirlenmesi ve daha sonra tiroid tümörlerinde bulunması şaşırtıcı değildir. Bu mutasyonlara ilişkin daha önceki kanıtlar ise bir grup GH salgılayan hipofiz tümörlerindeki sürekli yüksek kalan adenilat siklaz düzeyi ve G_s etkinliğidir (82). Daha sonra aynı tümörlerin α_s genlerinde mutasyonlar bulunmuştur (29). Bu mutasyonlar ise Arg201'in sistein (R201C) veya histidin (R201H) ile yer değiştirmesi veya Glu227'nin arjinin (Q227R) veya lösin (Q227L) ile yer değiştirmesine neden olan mutasyonlardır (29,83). Bu mutasyonlar α_s genini *gsp* denilen onkogene dönüştürür. Arg201 daha da önce bahsedildiği gibi, G_{sa} 'da kolera toksini tarafından ADP-ribozillenen kalıntıdır. α_s 'in GTP bağlama bölgesinde bulunduğu düşünülen Glu227 ise *ras*'ta Glu61 olarak bilinen onkogenik mutasyon bölgesine eşdeğerdir. Bu kalıntılardaki değişimler sonucu G proteinin GTPaz etkinliği kaybolmakta, α_s GTP-bağlı etkin yapıda kilitlenmekte

ve adenilat siklaz sürekli aktif olduğundan cAMP düzeyi yükselmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda GH-salgılayan hipofiz adenomlarının yaklaşık %43'ünde (90) ve tiroid aşırı işlevli adenomların %30'unda *gsp* mutasyonları bulunmuştur. Daha düşük oranlarda olmasına karşın, aynı mutasyonlar diğer tür hipofiz ve tiroid tümörlerinde, adrenokortikal ve paratiroid adenomlarında ve feokromositomalarda bulunmuştur (84)

gsp mutasyonu içeren ve GH salgılayan hipofiz adenomlarından elde edilen genomik DNA'ların analizi sonucu mutant α_s geni ve yaban tip (wild type) genin eşit oranda bulunduğu görülmüştür (29). Ancak, polimeraz zincir tepkimesi ile çoğaltılan cDNA'lar ise α_s transkriptlerinin büyük çoğunluğunun mutant genden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Mutant α_s geninin mRNA düzeyinde bu kadar fazla ekspres edilmesini sağlayan mekanizma ve bunun hipofiz somatotroflarında *gsp* mutasyonlarının etkinliğine ne ölçüde katkıda bulunduğu henüz bilinmemektedir. *gsp* mutasyonları içeren tümörlerde bulunan mRNA miktarı α_s geninin sadece yaban tipini içeren tümörlerdeki miktarından farklı değildir. Bununla beraber mutant α_s geni ve dolayısıyla ağırlıklı olarak mutant α_s transkripti içeren tümörler her zaman proteinin 52 ve 45 kDa'luk iki formunu da düşük seviyede ekspres etmektedir. Yapılan çalışmalarda α_s miktarının R210 ve Q227 mutasyonu içeren tümörlerde yalnızca yaban tip ekspres eden tümörlere göre 9 kez daha az olduğu bulunmuştur. S49 *cyc*⁻ hücreleriyle yapılan çalışmalar hipofiz tümörlerindeki düşük mutant α_s miktarının bu proteinin hızlı degradasyonundan kaynaklandığını göstermiştir.

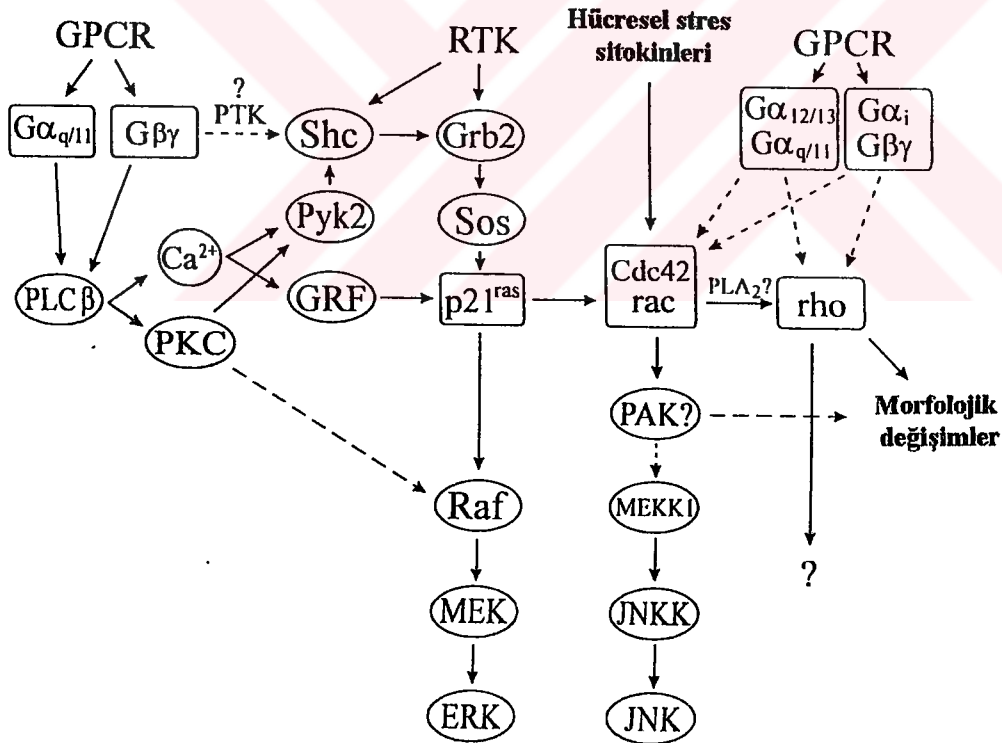
Mutasyonlar nedeniyle etkinleşen α_s , birçok sinyal yoluyla etkileşme girmesine rağmen proteinin mitogenik ve onkogenik etkisinin temelde cAMP düzeyini arttırması yoluyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Hücrelerin bir çoğunda cAMP, hücre büyümesini MAP kinaz yolakları aracılığıyla gerçekleştiren sinyal iletim yollarını sekteye uğratarak baskılamaktadır, ancak endokrin hücrelerin bir bölümünde cAMP'nın mitogenik etkileri vardır. cAMP artışı belirli hayvan hücrelerinde bazı özgün genlerin transkripsiyonunu etkinleştirmektedir. Örneğin, somatostatin hormonu salgılayan hücrelerde cAMP bu hormonu kodlayan geni açmaktadır. Somatostatin geninin düzenleyici bölgesinde cAMP yanıt elemanı (CRE) denilen kısa bir DNA dizisi bulunmaktadır. Bu bölge cAMP tarafından uyarılan diğer genlerde de vardır. Bu dizi CRE-bağlayan protein (CREB) olarak adlandırılan özgün bir gen düzenleyici protein tarafından tanınmaktadır (Şekil 1.3) (85). Eğer CREB tek bir serin kalıntısı (Ser¹³³) üzerinden cAMP'ye bağımlı protein kinaz A tarafından fosforillenirse hücre büyümesini düzenleyici genlerin transkripsiyonunu başlatmak üzere uyarılmış olur. Fosforillenme DNA-bağlama özelliğini etkilemeksizin CREB'in transkripsiyonel etkinliğini uyarır. Eğer bu serin kalıntısı mutasyona uğrarsa CREB inaktifleşir ve cAMP düzeyindeki artışa rağmen gen transkripsiyonu uyarılmaz (85-86). CREB'in mitogeneze ilişkin hedefleri, hipofizde özgün bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *pit-1* geni ve *c-fos* erken genidir. Son zamanlarda çeşitli endokrin hücre soylarında aşırı uyarılmış mutant α_s 'in ekspresyonu ile *c-fos*'un ve aynı zamanda *c-jun* ve *jun B* erken genlerinin transkripsiyonunda kalıcı bir artışın gerçekleştiği gösterilmiştir.



Şekil 1.3: G proteinin hücre çoğalması ve GH üretim ve salgılanımındaki rolü.

Mutasyon sonucu uyarılmış α_s tarafından oluşturulan cAMP sinyalinin diğer mitogenik yollarla nasıl etkileştiği henüz yeterince açık değildir. Tiroid hücrelerinde ve cAMP'ye yanıt olarak çoğalmaya programlanmış diğer sistemlerde ikincil ulak düzeyindeki artış hücre çoğalmasını uyarma açısından reseptör tirozin kinazlarla sinerjistik olarak etkileşmektedir. cAMP gibi reseptör tirozin kinazlar da mitogenik yolları kontrol eder. *Ras*'a bağımlı bir yol üzerinden $G_{\beta\gamma}$ -altbiriminin MAP kinazları etkinleştirmesine ilişkin bulgular nedeniyle (87) çoğalma

ve farklılaşmaya ilişkin sinyallerin dönüşümlerinde görev alan reseptör protein kinaz ailesinin en önemli üyesi olan MAP kinazlar (mitogen-activated-protein kinase) (Şekil 1.4) (89) G proteini konusunu yakından ilgilendirmektedir. MAP kinaz yolunun sürekli etkinliğinin tümör oluşumuna yeterli olması bu enzim ailesinin mitogenik sinyallerde oynadığı rolün önemini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 1.4: Memelilerde MAP kinaz yollarının düzenlenmesi.

MAP kinaz yolu Protein kinaz C veya *Ras* tarafından uyarılmaktadır (C-kinaz G proteini bağı reseptörler aracılığıyla çalışmaktadır), reseptör tirozin kinazların uyarılması MAP-kinazı etkinleştirmektedir. Bu uyarılma Grb2 adaptör proteini ve guanin nükleotidi değiştirme faktörü Sos'un aracılığıyla *Ras*'ın etkinleşmesi sonucu gerçekleşir. *Ras*'ın etkinleşmesi Raf-1'in etkinleşmesine, o da MAP-kinaz-kinaz-kinaz'ın (MEK) uyarılmasına neden olur. Aktiflenen MAP-kinaz-kinaz-kinaz, MAP-kinaz-kinaz'ı aktiflerken, bu enzim de MAP-kinazı uyarmaktadır. MAP-kinaz ise gen ekspresyonunu düzenleyen regülatör proteinleri fosforilleyerek etkinleştirmektedir. G proteininin rol aldığı bir diğer MAP kinaz aktivasyon yolu olan protein kinaz C yolu ise $G_{q/11}$ /PLC üzerinden gerçekleşmektedir. Ancak bu mekanizma da tam aydınlatılmış değildir. Protein kinaz C doğrudan Raf1'ı fosforillemektedir fakat, bunun Raf1 etkinleştirip etkinleştirmedeği kesin değildir.

G proteinlerinin MAP kinaz yolunu $\beta\gamma$ ve *Ras* ($p21^{ras}$) yoluyla etkinleştirdiği düşünülmektedir. Reseptör etkinliğiyle serbest kalan $\beta\gamma$ -altbiriminin *Ras*'ı ve dolayısıyla MAP kinaz etkinliğini nasıl oluşturduğu açık değildir. Fakat son zamanlarda $\beta\gamma$ -altbiriminin henüz bilinmeyen bir tirozin kinaz yoluyla adaptör protein Shc'nin tirozin fosforillenmesini gerçekleştirdiği öne sürülmektedir (89). Fosforillenen Shc, Grb2 ve Sos'un etkin katılımıyla $p21^{ras}$ 'ın etkinleşmesini sağlamaktadır.

Etkin α_s mutasyonlarını ekspres eden hücrelerde buna karşı güçlü bir mekanizma olan fosfodiesteraz sisteminin etkinliği artar. Fosfodiesteraz enzimi G proteininin normal işleyişinde görev alan ve cAMP'yi parçalayan bir enzimdir. cAMP miktarının artmaya

başlamasıyla bu enzimin etkinliği de artarak cAMP artışını dengelemeye çalışır. Ancak bu enzimin etkinliği hücreden hücreye değişir. Bu nedenle McCune-Albright sendromu gibi hastalıklarda tüm hücreler *gsp* mutasyonu taşımasına rağmen ancak bazı hücre türlerinde fenotip ortaya çıkmaktadır.

cAMP düzeylerinin artışı ile ilişkili bazı G protein-kenetli reseptörlerin büyüme faktörlerinin etkisini engelledikleri, bir çok hücrede gösterilmiştir. Bu etkinin Raf1 kinazın cAMP'ye bağımlı protein kinaz A tarafından fosforillenerek, Raf1'in uyarılmasını engellemesi ile açıklanabileceği önerilmiştir. Bu bulgu $p21^{ras}$, aracılı hücre transformasyonunun G_{sa} ile geri çevrilmesiyle uyumlu; ancak cAMP'nin bazı hücrelerdeki mitogenik etkisi ile çelişkilidir. cAMP'nin mitogenik yollardaki etkisinin hücrede mevcut sinyal sistemine ve halen açıklığa kavuşmamış diğer mekanizmalara bağımlı olduğu varsayılmaktadır.

Tiroid hücrelerinde ve bazı sistemlerde cAMP ile uyarılmış özgün yolların hücre büyümesini uyarmasının yanısıra, hücre farklılaşma programlarını da harekete geçirdikleri (81) dikkat çekmektedir. Böylelikle, cAMP'nin uyarılması farklılaşmış, aşırı işlevli tümörlerin oluşmasına yol açmaktadır. Örneğin, büyük sayıda tiroid tümörleri tarandığında, *gsp* mutasyonlarına farklılaşmamış tümörlerde değil aşırı işlevli adenomlarda rastlanmıştır (80). Ayrıca, *gsp* mutasyonu taşıyan hipofiz tümörlerinin büyük bir çoğunluğunda salgılama etkinliği fazla, farklılaşmış hücrelerin bulunduğu belirtilmiştir (82)

GDP'nin ayrılmasını hızlandıran mutasyonda GTPaz etkinliğini azaltan mutasyonlar gibi α_s 'in onkogenik uyarısına yol

açabilir. Gerçekten, Ala366'nın serinle (A366S) yer değiştirmesi sonucu GDP'nin α_s 'ten ayrılmasını hızlandıran bir mutasyonun hastalığa neden olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber bu mutant G_s proteini vücut sıcaklığı olan 37 °C'ta hızla parçalanmakta ve işlev fenotipinde bir kayıba neden olmaktadır. A366S α_s sadece testislerin düşük sıcaklığında yaşayabilmekte ve adenilat siklazı sürekli uyarmaktadır. Bunun etkisi de Leydig hücreleri tarafından testosteron üretiminin anormal derecede uyarılması olarak ortaya çıkmaktadır, dolayısıyla bu tip mutasyonlar tümör oluşumuna yol açmamakta ancak, α_s aracılığıyla düzenlenen çeşitli sistemlerin işlevlerinde bozukluklara yol açarak erken ergenlik gelişimine neden olmaktadır. A366S α_s 'in ısıya karşı olan düşük direnci GDP'nin yüksek çözünürlük hızından kaynaklanmaktadır, çünkü protein daha sık serbest (guanin nükleotidinin bağlanmadığı) durumda kalmakta ve bu durumda denatürasyona daha duyarlı olmaktadır (90).

1.6.2 *gip* onkogeni

$G_{i/o}$ proteinlerinin uyarılması adenilat siklazın baskılanmasına ve dolayısıyla cAMP seviyesinin düşmesine neden olmaktadır. $G_{i/o}$ 'e kenetli reseptörlerin de reseptör tirozin kinazlarca etkinleştirilen, *Ras*'a bağımlı yolu kullanan bir mekanizma ile MAP kinazları uyardığı bilinmektedir. Bazı hücrelerde MAP kinazlar $\beta\gamma$ kompleksi tarafından uyarılmaktadır. MAP kinaz yolunun $\beta\gamma$ tarafından etkinleştirilmesinin henüz tanımlanamamış bir tirozin kinazın doğrudan veya dolaylı etkinleşmesiyle başlatıldığı sanılmaktadır. $\beta\gamma$ -altbiriminin adaptör Shc proteininin tirozin üzerinden fosforillenmesini uyardığı, bunun Shc-Grb2-Sos kompleksinin oluşumuna yol açtığı ve sonra da *Ras*'ın Sos tarafından etkinleştirildiği gösterilmiştir. GTPaz etkinliğini baskılayan

mutasyonların sonucu aşırı uyarılan α_{i2} altbirimi bazı sistemlerde MAP kinaz uyarımına ve hücre transformasyonuna yol açmaktadır. Aşağıda da bahsedildiği gibi α_{i2} proteini bazı insan endokrin tümörlerinde ekspres edilmektedir. Ayrıca, mutasyona uğrayarak etkinleşen α_0 , NIH 3T3 hücrelerine transfecte edildiğinde transformasyona yol açmaktadır. $G_{i/o}$ proteinlerinin ekspresyonunun hücre siklusunun farklı evrelerinde dinamik olarak düzenleniyor olması, $G_{i/o}$ alt birimlerinin mitogenezin kontrolünde önemli rollerine işaret etmektedir.

$G_{i/o}$ proteinlerinin farklı altbirimlerinin hücre büyümesinin kontrolüne ilişkin bu rollerine karşın, insan tümörlerinde sadece α_{i2} 'nin mutasyonlarına rastlanmıştır. *gip2* onkogenleri olarak adlandırılan bu mutasyonlar over ve böbrek üstü korteksi tümörlerinin %30'unda (84) ve fonksiyonel olmayan hipofiz tümörlerinin %10'unda bulunmuştur. *gip2* onkogeninin etkinliğine ilişkin hücre içi olaylar tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, *gip2* etkisinin hücre tipine bağlı olduğu açıktır. Örneğin, aşırı uyarılmış α_{i2} , Rat 1 fibroblastlarında transformasyona yol açarken, NIH 3T3 ve SWISS 3T3 hücrelerinde aynı etkiyi oluşturmamaktadır. *gip2*'ye bağlı transformasyonların en azından kısmen MAP kinaz yolunun etkinleşmesi sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. α_{i2} proteininin bu yolu nasıl ve neden sadece bazı hücrelerde etkinleştirdiği bilinmemektedir. Günümüze değin yapılan araştırmalar, α_{i2} 'yi uyaran mutasyonların özgün onkojenik etkisine birçok mekanizmanın katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

1.6.3 *gep* onkogeni

Yumuşak doku sarkom hücrelerinden kökenlenmiş hücrelerden $G\alpha_{12}$ 'ye ait bir mutasyon izole edilmiş ve *gep* onkogeni olarak adlandırılmıştır. Bu onkogenin tümör oluşumundaki rolü hakkında henüz birşey bilinmemektedir.

Belirli bazı koşullar altında mutasyon sonucu etkinleşmiş α_q 'nın NIH3T3 fibroblastlarını transformasyona uğrattığı bilinmektedir. α_q 'nın hücre büyümesine etkisinin MAP kinaz yoluyla olduğu sanılmaktadır. Ancak, henüz α_q 'ya ilişkin bir onkogen tanımlanamamıştır. Dolayısıyla G proteinlerine ait şu anda bilinen onkogenler sadece *gsp*, *gip2* ve *gep*'tir (23).

1.7 Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerle ilgili temel bilgiler seyrek rastlanan bir kanser çeşidi olan retinoblastoma ile ilgili çalışmalardan gelmiştir. Sadece çocuklarda görülen bu kanser çeşidi, henüz olgunlaşmamış retinadaki nöral öncül hücrelerden gelişmektedir. Yapılan çalışmalarda 13 numaralı kromozomda bir delesyon saptanmıştır. Delesyon nedeniyle retinoblastomanın bir onkogenden değil tümör baskılayıcı gen kaybından dolayı oluştuğu sanılmaktadır. Bu gen ise **retinoblastoma** veya **Rb** geni olarak adlandırılmaktadır. Akciğer, meme ve mesane kanserlerinde de Rb geni delesyonu olduğu bulunmuştur (91).

Diğer bir tümör baskılayıcı gen ise adını molekül ağırlığından alan **p53**'tür. Rb geni gibi birçok kanser türünün gelişiminde rol alan **p53** proteini DNA'ya bağlanarak diğer düzenleyici genleri açar

ve hücrenin G₁ fazından S fazına geçmesine engel olur. Bütün kanser olgularının % 50'sinde görülen *p53* geni mutasyonları insan kanserlerindeki en yaygın genetik lezyondur (92).

Hipofiz tümörlerinde görev aldığı sanılan tümör baskılayıcı gen ise *MEN1*'dir. Hipofiz tümörleri monoklonal olmalarına rağmen, hormon üretimi veya hücre çoğalmasını kontrol eden genlerde somatik mutasyonlara ender rastlanmaktadır. Dolayısıyla hipofiz hücre tümörlerinin etyolojisi halen bilinmemektedir. Hipofiz tümörleri sporadik olarak veya *MEN1*'in bir parçası olarak gelişebilmektedir. 1997 yılında klonlanan *MEN1* geninin, menin adlı bir tümör baskılayıcı proteinin kodladığı bulunmuştur. Menin tümör baskılayıcı bir protein olmasına karşın hipofiz adenomalarının çok azında ekspresyonu down-regülasyona uğramaktadır. Bu bulgu da *MEN1* haricinde başka bir neden veya başka bir tümör baskılayıcı genin olması gerektiğini düşündürmektedir (93).

1.8 Çalışmanın Amacı

G-proteinleri aracılığıyla gerçekleşen sinyal ileti sistemlerinin bileşenlerinin yapı ve işlevlerine ait son yıllarda biriken bilgi, bu bileşenlerdeki bozuklukların hastalıklara yol açabileceğine işaret etmektedir.

Bilindiği gibi adenilat siklaz etkinliği G_s 'in uyarıcı G_i 'nin baskılayıcı denetimi altındadır. G_s ve G_{12} proteinlerinin α -altbirimindeki bazı uyarıcı mutasyonlar bu altbirimleri *ras* proteininde olduğu gibi olası onkoproteinlere dönüştürür. Değişik çalışmalarda ise (85,90), bu mutasyonların hipofiz adenomlarında da rastlanmış ve hastalıkla ilgisi tam olarak açıklanamamakla birlikte bu mutasyonların önemli oldukları saptanmıştır.

Bu çalışmanın amacı ise hipofiz tümörlerinin oluşmasında G proteinlerin rolüne açıklık kazandırmak üzere hipofiz tümörleri ameliyatla çıkarılmış Türk hastalarda G_{sa} 'nın (*gsp*) ve G_{12a} 'nın (*gip*) mutasyonları incelemek ve bu G proteininin mutasyonları, hastalık mekanizmasındaki potansiyelini araştırmaktır. Çalışma, Türk hastalarında hipofiz adenomlarının oluşmasındaki nedeni ve bu mutasyonlarla ilişkili olup olmadığı tam olarak aydınlanmasıyla, Türkiye'de izlenecek sağlık politikalarına yardımcı bilgiler verecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega)

Akrilamit (Serva)

Amonyumpersülfat (Sigma)

Asetik Asit (Glasial) (Saf Kimya)

Borik Asit (Merck)

Bromofenol Mavisi (Merck)

Etanol (Delta)

Etidyüm Bromür (Sigma)

Etilenediamintetraasetikasit (EDTA) (Merck)

dATP (MBI)

dCTP (MBI)

dGTP (MBI)

dTTP (MBI)

Fenol (Merck)

Formamit (Gibco BRL)

Formaldehit (Merck)

Gliserol (Sigma)

Gümüş Nitrat (Merck)

Hidroklorik Asit (Sigma)

Ksilen Siyanol F F (Sigma)

Klorofom (Merck)

Magnezyum Klorür (Sigma)

MDE Solüsyonu (FMC)

Orange G (Promega)

Potasyum Asetat (Sigma)
Potasyum Klorür(Horasan kimya)
Sodyumdodesilsülfat (Sigma)
Sodyumdihidrojenfosfatdihidrat (Merck)
Sodyum Hidroksit (Merck)
Sodyum Fosfat (Sigma)
Sodyum Karbonat (Merck)
Sodyum Klorür (Merck)
Sukroz (Sigma)
2,5-difeniloksazol (PPO) (Sigma)
T4 Polinükleotid Kinaz (Promega)
Trikloroasetikasit (Sigma)
Taq DNA polimeraz (Promega)
Tetrametilamoniyumklorür (Sigma)
N,N'-Metilen Bisakrilamit (Serva)
N,N,N',N'- Tetrametiletilediamin (TEMED)(Sigma)
Toluol (Saf kimya)
Tris (Sigma)
X-omat film (Kodak)
667 Polaroid film (Polaroid)

2.2 Radyoaktif Maddeler :

[γ -³²P]ATP, özgün etkinliği 5000Ci/mmol, 10mCi/ml.

Amersham (U K).

2.3 Elektroforetik Analizde Kullanılan standartlar:

Standartlar (Promega)	Molekül Ağırlığı
100bç DNA Lader Markeri	(100-1500) baz çifti (bç)
Lambda DNA <i>Hint</i> III Markeri	(125-23135) baz çifti (bç)

2.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar :

Agaroz Elektroforez Tankı	(Bio-Rad)
Nokta Emdirme Sistemi	(Bio-Rad)
Poliakrilamit Elektroforez Sistemi	(Bio-Rad)
Etüv	(Memmert)
Güç Kaynağı	(Dan-Kar)
Güç Kaynağı	(LKB)
Manyetik Karıştırıcı	(Hanna)
pH Metre	(WTW)
Santrifüj	(Hettich 30 RF)
Sıvı sintilasyon sayacı	(Packard Tri-Carb 1500)
Spektrofotometre	(LKB)
Su Banyosu	(Kotterman)
karıştırıcı (Vorteks)	(Janke & Kunkel)
Terazi	(Oertling NA-114)
Isı Döngü Cihazı	(MJ-Research-Mini Cyclor)
Isı Döngü Cihazı	(Techne-Progene)
Derin Dondurucu (-20°C)	(Arçelik)
Derin Dondurucu (-70°C)	(So-Low)
Buzdolabı	(Arçelik)
Kırık Buz Makinesi	(Scotsman AF-10)

Vakum Pompası	(Millipore)
Çalkama cihazı	(IKA-Vibrax-VXR)
UV Kaynağı	(Vilber Lourmat)
Otomatik Mikro pipetler	(Gilson)
Otoklav	(All American)
Homojenizatör	(Janke & Kunkel)

2.5 Kullanılan Çözeltiler :

2.5.1 DNA'nın Elde Edilmesinde Kullanılan Çözeltiler :

Homojenleştirme Tamponu

- 0.1 M NaCl
- 0.2 M Sukroz
- 0.01 M EDTA pH 7.0
- 0.3 M Tris-HCl

TE Çözeltisi

- 10 mM Tris-HCl pH 7.4
- 1 mM EDTA-NaOH pH 8.0

2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler :

- PZR Tamponu (10X), pH 8.3
- Tris 100 mM
- KCl 500 mM
- Gelatin 1 mg/ml

Nükleotit Karışımı (dNTP)

Her nükleotit derişimi 100 mM olan ana stoklardan, dört nükleotidi içeren ve herbirinin son derişimi 1.25 mM olan çalışma karışımı hazırlandı.

Primer Stok Çözeltisi

Çalışma için Gibco firmasında sentezletilen primerlerin 260 nm'daki OD değerleri ve $15.3XA + 11.8XG + 9.3XT + 7.4XC$ denklemiyle hesaplanan sönüm katsayısı değerlerinden yararlanılarak primerlerin ana stok derişimleri hesaplandı. Çalışma stoğu ise her primerin derişimi 10 pmol/μl olacak şekilde hazırlandı.

Polimerz zincir tepkimesinde kullanılan bütün stoklar -20°C'ta saklandı.

2.5.3 AgaroZ Gel Elektroförezinde Kullanılan Çözeltiler :

% 0.8 AgaroZ Gel Elektroförez

0.8 gr. AgaroZ

2.5 μl. Etidyüm Bromür (10mg/ml ana stoktan)

AgaroZ, 100 ml distile su içinde kaynatıldı, 60°C'a soğutulduktan sonra EtBr eklendi.

% 2 AgaroZ Gel Elektroförez

2 gr. AgaroZ

2 μl. Etidyüm Bromür (10mg/ml ana stoktan)

AgaroZ, 100 ml distile su içinde kaynatıldı, 60°C'a soğutulduktan sonra EtBr eklendi.

(6 X) DNA Yürütme Boyası

% 10 Ficoll 400

% 0.25 (w/v) Bromfenol Mavisi

% 0.25 (w/v) Xylen Cyanol FF

% 0.4 Orange G

10 mM Tris-HCl pH 7.5

50 mM EDTA

Elektroforez Yürütme Tamponunun Ana Stoku (10XTEB)

Tris 108 gram

Borik asit 55 gram

EDTA 7.44 gram

1 lt. distile su içinde çözündürüldü.

2.5.4 SSCP Yönteminde Kullanılan Çözeltiler :

Gliserolsüz PAGE Ayrışım Geli (%6)

1.5 M Tris-HCl pH 8.8 7.5 ml.

Akrilamit / Bisakrilamit (30:0.8) 6.0 ml.

%10 (w/v) Amoniyumpersülfat 100.0 µl.

TEMED 7.5 µl.

Distile Su 16.5 ml.

Gliserollü PAGE Ayrışım Geli (%6)

1.5 M Tris-HCl pH 8.8 7.5 ml.

Akrilamit / Bisakrilamit (30:0.8) 6.0 ml.

Gliserol 1.5 ml.

%10 (w/v) Amoniyumpersülfat	100.0 µl.
TEMED	7.5 µl.
Distile Su	15.0 ml.

Gliserolsüz 0.5X MDE Ayırışım Geli

2 X MDE	7.5 ml.
5 X TBE	3.6 ml.
Distile Su	18.9 ml.
%10 (w/v) Amoniyumpersülfat	120 µl.
TEMED	12 µl.

Gliserollü 0.5X MDE Ayırışım Geli

2 X MDE	7.5 ml.
5 X TBE	3.6 ml.
Distile Su	17.4 ml.
Gliserol	1.5 ml.
%10 (w/v) Amoniyumpersülfat	120 µl.
TEMED	12 µl.

PAGE Üst Geli (% 4.5)

1 M Tris pH 6.8	1.25 ml.
Akrilamit / Bisakrilamit (30:0.8)	1.5 ml.
%10 (w/v) Amoniyumpersülfat	100 µl.
TEMED	5 µl.
Distile Su	7.15 ml.

SSCP İçin Örnek Denatüre Edici Tampon

% 95 (v/v)	Formamit
10 mM	NaOH

% 0.05 (w/v) Bromfenol Mavisi

% 0.05 (w/v) Ksilen Siyanol

2.5.5 Gümüş Nitrat Boyamada Kullanılan Çözeltiler :

% 10 (v/v) Etanol

% 5 (v/v) Asetik asit

% 0.1 (w/v) Gümüş nitrat

% 1.5 (w/v) Sodyum hidroksit

% 0.15 (v/v) Formaldehit

% 0.75 (w/v) Sodyum karbonat

2.5.6 Hibritleme İşleminde Kullanılan Çözeltiler :

20 X SSPE

175.3 gr. NaCl

27.6 gr. NaH₂PO₄

3.0 gr. EDTA

NaOH ile pH 7.4 olacak şekilde 1 lt. dH₂O içinde hazırlandı.

100 X Denhardt Tamponu

5 gr. Ficoll Tip 400

5 gr. Polyvinylpyrrolidone

5 gr. Bovine Serum Albümin fraction

1 lt. dH₂O içinde çözündürüldü.

Hibritleme Tamponu

5 X SSPE

% 0.5 SDS

5 X Denhardt çözeltisi

0.1mg/ml Salmon Sperm DNA'sı

Membran Yıkama Tamponu I

2 X SSPE

% 0.1 SDS

Membran Yıkama Tamponu II

3 M Tetrametil amonyum klorür

% 0.2 SDS

50mM Tris pH 8.0

Geliştirici Tampon "Developer"

4-(Metilamino)-Fenol sülfat 1.5 gr.

Sodyum sülfat 2.5 gr.

Sodyum karbonat 2 gr.

Potasyum bromür 0.25 gr.

1 lt. distile su içinde çözündürüldü.

Sabitleştirici Tampon "Fixer"

Sodyum tiyofosfat 62.5 gr.

Potasyum metabisülfid 5 gr.

2.6 Dokulardan Genomik DNA İzolasyonu :

Doku örnekleri (Tablo 2.1) 0.1 M NaCl, 0.2 M Sukroz, 0.01M EDTA ve 0.3 M Tris-HCl (pH: 8.0) içeren homojenleştirme tamponunda 100 mg doku/ml tampon olacak şekilde Ultra turrax (9500 devir/dak.) homojenizatörü kullanılarak 4°C'ta homojenize edildi ve derişimi % 0.5 olacak şekilde SDS eklenip vorteksledikten sonra 65°C'ta 30 dakika inkübe edildi. Örnek üzerine derişimi 1M olacak şekilde potasyum asetat eklenip vorteksledikten sonra 1 saat süreyle 0°C'ta bekletildi. Örnekler 5000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi ve DNA içeren üst sıvı steril bir tübe aktarılarak, 1 hacim kloroform fenol karışımı ile (1:1) ile yıkandıktan sonra 1 hacim klorofom ile tekrar yıkandı ve son olarak 5 hacim soğuk etanol ile çöktürüldü (118). Elde edilen DNA çökeleği 350 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl, ve 1 mM EDTA [pH 8.0]) içinde çalkalamalı olarak oda sıcaklığında iki saat süreyle inkübe edilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı.

2.7 Genomik DNA'nın Agaroz Gel Elektroforezi :

DNA örnekleri % 0.8 agaroz gelinde 150 V'ta 30 dakika yürütüldü. Etidyüm bromür ile boyanan örnekler UV altında incelendi (Şekil 3.1). DNA'nın derişimleri ve saflık dereceleri ise 260 ve 280 nm'deki absorbsiyonları okunarak belirlendi (Tablo 2.2).

Tablo 2.1: Hasta bilgileri.

Hasta	Yaşı	Cinsiyet	Teşhis	Tümör Ebadı
VA	26	E	Prolaktinoma	Makro
BT	21	K	Prolaktinoma	Makro
HÖ	26	K	Cushings	Mikro
MA	24	E	Prolaktinoma	Makro
ŞÖ	34	K	Akromegali (rezidüel)	Makro
AŞ	34	K	Akromegali	Mikro
EÖ	65	K	Fonksiyonel olmayan	Makro
GB	42	K	Prolaktinoma	Makro
KD	43	K	Akromegali (rezidüel)	Makro
NC	53	K	Akromegali	Makro
İK	45	E	Fonksiyonel olmayan	Makro
ZY	48	K	Akromegali	Makro
MD	51	E	Akromegali	Makro
HT	41	E	Fonksiyonel olmayan	Makro
OA	44	E	Fonksiyonel olmayan	Makro
HK	56	E	Fonksiyonel olmayan	Makro
RC	34	K	Prolaktinoma	Mikro
FK	38	K	Prolaktinoma	Makro
AK	23	E	Fonksiyonel olmayan	Makro
ŞT	25	K	Fonksiyonel olmayan	Makro
ŞH	26	K	Prolaktinoma	Makro
LK	30	K	Akromegali	Makro

Makro Adenoma : Tümör çapı ≥ 10 mm

Mikro Adenoma : Tümör çapı < 10 mm

Tablo 2.2: Saflaştırılmış DNA'ların derişimleri.

Örnek NO:	Hasta adı	Absorbans (260 nm)	Absorbans (280 nm)	260nm/280nm oranı	DNA derişimi ng/μl
1	VA	0.218	0.124	1.76	1090
2	BT	0.302	0.176	1.72	1510
3	HÖ	0.244	0.137	1.78	1220
4	MA	0.102	0.073	1.40	510
5	ŞÖ	0.034	0.024	1.42	85
6	AŞ	0.221	0.128	1.73	1105
7	EÖ	0.381	0.226	1.69	1905
8	GB	0.098	0.060	1.63	490
9	KD	0.297	0.175	1.70	1485
10	NC	0.033	0.018	1.83	165
11	İK	0.267	0.179	1.49	1335
12	ZY	0.135	0.084	1.61	675
13	MD	0.035	0.020	1.75	175
14	HT	0.098	0.055	1.78	980
15	OA	0.054	0.031	1.74	540
16	HK	0.125	0.070	1.79	1250
17	RC	0.010	0.007	1.43	100
18	FK	0.371	0.221	1.68	1855
19	AK	0.084	0.065	1.30	420
20	ŞT	0.068	0.050	1.36	340
21	ŞH	0.062	0.035	1.77	310
22	LK	0.096	0.055	1.75	480

2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) :

G_{sa} 'nın ekson 8 bölgesi (241bç), ve ekson 9 bölgesi (187bç), $G_{i2\alpha}$ 'nın ekson 5 ve 6 bölgeleri (aradaki intron bölgesini de kapsıyacak şekilde 604bç), ekson 5 bölgesi (165bç), ve ekson 6 bölgesi (175bç), 50 µl reaksiyon hacminde, 10 mM Tris-HCl (pH:8.8), 50 mM KCl, % 0.19 non-iyonik deterjan, 10 pmol oligonükleotit primerler, 0.5 mM dNTP, 200 ng genomik DNA, 2 U Taq polimeraz enzimi ve $G_{i2\alpha}$ 'nın ekson 5 bölgesi ile ekson 6 bölgeleri için 2 mM, G_{sa} 'nın ekson 8 bölgesi ile ekson 9 bölgeleri için 2.5 mM, $G_{i2\alpha}$ 'nın aradaki entron bölgesi dahil ekson 5 ve 6 bölgesi için 1.5 mM $MgCl_2$ kullanılarak çoğaltıldı.

2.8.1 Kullanılan Primerlerin Dizileri:

G_{sa} :

Ekson 8 için (kodon 201):

GA3 : 5' CTA CTC CAG ACC TTT GCT TTA G 3'

GB3 : 5' ACA GCT GGT TAT TCC AGA GGG A 3'

Ekson 9 için (kodon 227):

GA4 : 5' GTT TCT TGA CAT TCA CCC CAG T 3'

GB4 : 5' AGC GAC CCT GAT CCC TAA CAA C 3'

$G_{i2\alpha}$:

Ekson 5 ve 6 için :

GC2 : 5' ATT GCA CAG AGT GAC TAC ATC CCC 3'

GD2 : 5' GGC GCT CAA GGC TAC GCA GAA 3'

Ekson 5 (kodon 179) için :

GC3 : 5' CCC AGC TAC CTG AAC GAC CTG G 3'

GD3 : 5' CTC GCT CAC TTG AAG TGT AGG TC 3'

Ekson 6 (kodon 205) için :

GC4 : 5' CAT CTG CAG GAT GTT TGA TGT GG 3'

GD4 : 5' CAT CCT CTC ACC ATC TCC TCG 3'

2.8.2 PZR Koşulları :

Gi2 α 'nın ekson 5 ve 6 (604 bç) bölgeleri için :

94°C 1 dak.

58°C 2 dak. 30 döngü

72°C 3 dak.

Gs α 'nın ekson 8 (241 bç) ve Gs α 'nın ekson 9 (187 bç)

bölgeleri için :

94°C 30 san.

60°C 30 san. 30 döngü

72°C 90 san.

Gi2 α 'nın ekson 5 (165 bç) ve Gi2 α 'nın ekson 6 (175 bç) için :

94°C 30 san.

61°C 45 san. 30 döngü

72°C 45 san.

Bütün programların sonu, örnekleri 4°C'ta saklıyacak programla bağlanmıştır.

2.8.3 Agaroz Gel Elektroförez:

PZR ile çoğaltılan DNA örnekleri %2'lik agaroz gelinde 150 V'ta (yaklaşık 75 mA) 30 dak. kadar yürütölerek ve etidyum bromür ile boyanarak UV altında incelendi.

2.9 SSCP (Tek Sarmal Komformasyon Polimorfizmi) :

PZR ürünleri, % 95 formamid, 10 mM NaOH, % 0.05 bromfenol mavisi ve % 0.05 ksilen siyanol içeren denatüre edici tamponla 95°C'ta 5 dakika süreyle işlem gördükten sonra buzda saklandı. Örnekler gliserollü veya gliserolsüz olarak, 0.5XMDE (Mutasyon Belirleme), ve % 6 denatüre edici olmayan poliakrilamit gellerinde 200 V'ta 2-6 saat elektroforeze tabi tutuldu. Geller % 10 etanol ve % 5 asetik asit ile sabitleştirilip, % 0.1 gümüş nitrat ile boyandı, bantlar % 1.5 NaOH / % 0.15 formaldehit ile ortaya çıkarıldıktan sonra tepkime % 0.75 sodyum karbonatla durduruldu.

2.10 Örneklerin Nokta-Emdirme Yöntemiyle Membranlara Aktarılması:

PZR yöntemiyle çoğalan örnekler 100 µl'lik hacim içinde 400 mM NaOH ve 25 mM EDTA olacak şekilde 99°C'ta 5 dakika denatüre edildi. Örnekler daha sonra nokta-emdirme düzeneği kullanılarak naylon membranlara emdirildi, 60°C'ta 10 dakika kurutuldu ve kullanılıncaya kadar 4°C'ta bekletildi.

2.11 Hibritleme :

2.11.1 Ön-Hibritleme :

Membranlar, steril 0.45µm filtrelerden geçirilmiş 5 X SSPE, % 0.5 SDS, 5 X Denhardt çözeltisi ve 0.1 mg/ml Salmon sperm DNA'sı varlığında 55°C'ta 3 saat ön hibritlemeye bırakıldı.

2.11.2 Kullanılan Allel-Seçici Problar :

Gsα'nın 201 kodonu için normal tip (R201) :

5'TT CGC TGC **CGT** GTC CTG ACT 3'

Gsα'nın 201 kodonu için mutant tip (R201A) :

5'TT CGC TGC **[G,T,A]GT** GTC CTG ACT 3'

Gsα'nın 201 kodonu için mutant tip (R201B) :

5'TT CGC TGC **C[C,T,A]T** GTC CTG ACT 3'

Gsα'nın 201 kodonu için mutant tip (R201C) :

5'TT CGC TGC **TGT** GTC CTG ACT 3'

Gsα'nın 227 kodonu için normal tip (Q227) :

5'GTG GGT GGC **CAG** CGC GAT GA

Gsα'nın 227 kodonu için mutant tip (Q227A) :

5'GTG GGT GGC **[G,A]AG** CGC GAT GA

Gsα'nın 227 kodonu için mutant tip (Q227B) :

5'GTG GGT GGC **C[C,G,T]G** CGCGAT GA

Gs α 'nın 227 kodonu için mutant tip (Q227C) :

5'GTG GGT GGC CA[C,T] CGC GAT GA

Gi2 α 'nın 179 kodonu için normal tip (R179) :

5'TA CGG ACC CGC GTA AAG ACC

Gi2 α 'nın 179 kodonu için mutant tip (R179A) :

5'TA CGG ACC [T,A,G]GC GTA AAG ACC

Gi2 α 'nın 179 kodonu için mutant tip (R179B) :

5'TA CGG ACC C[A,C,T]C GTA AAG ACC

Gi2 α 'nın 205 kodonu için normal tip (Q205) :

5'GTG GGT GGT CAG CGG TCT GA

Gi2 α 'nın 205 kodonu için mutant tip (Q205A) :

5'GTG GGT GGT [G,A]AG CGG TCT GA

Gi2 α 'nın 205 kodonu için mutant tip (Q205B) :

5'GTG GGT GGT C[C,G,T]G CGG TCT GA

Gi2 α 'nın 205 kodonu için mutant tip (Q205H) :

5'GTG GGT GGT CA[C,T] CGG TCT GA

2.11.3 Oligonükleotit Probların İşaretlenmesi :

Oligonükleotit problar 50 pmol oligonükleotit prob, 10 μ Ci [γ - ^{32} P] ATP, 1 X T4-kinaz tamponu, ve 1 μ l T4-kinaz enzimi içeren 20 μ l'lik tepkime karışımında 37°C'ta 45 dakika inkübe edilerek işaretlendi.

2.11.4 Bağlanma Etkinliğinin Saptaması :

100 µl TE tamponu içine, işaretlenmiş oligonükleotit probtan 0.5µl eklendi. Seyreltilmiř örnekten iki GF/C filtresine 5'er µl prob emdirildi, parçalardan biri olduğu gibi kuruturken öteki parça ise önce 0°C'ta % 10 TCA sonra %100 etanol içinde 10 dak. süreyle yıkandı. Kurutulan GF/C filtreleri % 0.4 PPO içeren toluol içinde özel cam şişelere yerleştirildi ve bağlanma etkinliği Packard sıvı sintilasyon sayacında saptandı.

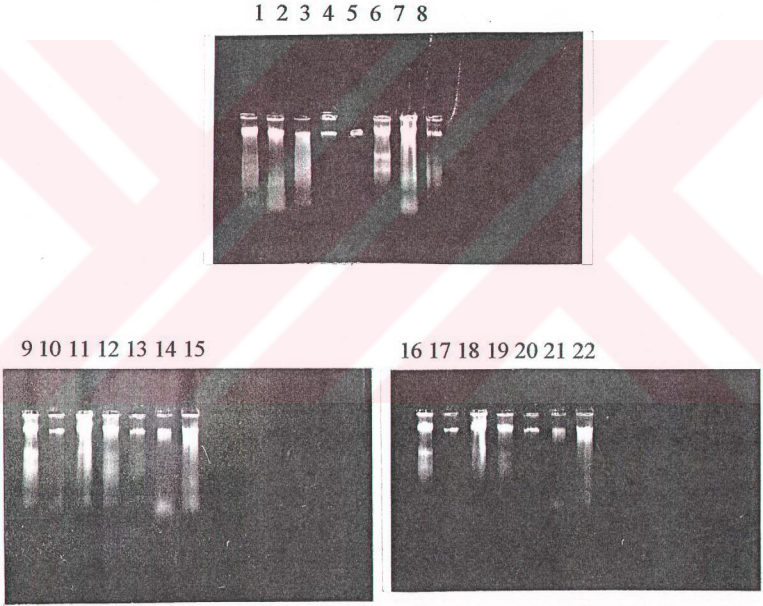
2.11.5 Hibritleme :

n hibritlemeye tabi tutulan membranlar, işaretlenmiş allel-spesifik problar varlığında aynı çözelti içinde 55°C'ta 5 saat hibritleme işlemine sokuldu. 5 saat sonra hibritleme sıvıları tüplere alınıp tekrar kullanılıncaya kadar -70 C'ta saklandı. Membranlar ise önce oda ısısında 2 X SSPE ve % 0.1 SDS tamponunda 10 dakika, ardından 3 M TMAC, 0.2 % SDS ve 50 mM Tris (pH: 8.0) içeren çözelti içinde 55 C'ta 10 dakika yıkandıktan sonra, yansıtıcı kaset içinde Kodak X-Omat filmin üzerine yerleştirildi. Film, -70 C'ta 1-2 gün bekletildikten sonra banyo edildi.

3. BULGULAR

3.1 Tümör Dokularından Genomik DNA İzolasyonu

Hastaların hipofiz tümör doku örnekleri tartıldı, homojenize edildi ve DNA'ları izole edildi (Şekil 3.1). DNA'ların derişimleri ise spektrofotometre kullanılarak tespit edildi (Tablo 2.2).



Şekil 3.1: Hipofiz tümör dokularından elde edilen DNA örneklerinin % 0.8 agaroz gelinde etidyüm bromürle boyanma sonucu UV altında elde edilen görüntüsü.

3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA'nın G proteinini kodlayan genetik bölgelerindeki mutasyonları inceleyebilmek için polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak istenilen bölgeler çoğaltıldı.

3.2.1 G_s Proteininin α -Altbirimini Kodlayan Genetik Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Çoğaltılması

Uyarıcı G proteininin α -altbirimindeki bazı mutasyonları ortaya çıkarabilmek için aşağıda görüleceği gibi 2 ayrı bölge çoğaltılmıştır.

3.2.1.1 G_{sa}'nın 201. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması

G_{sa}'nın 201 numaralı kodonunu içeren ve 241 bç büyüklüğünde olan bölge GA3 ve GB3 primerleri kullanılarak Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtilen koşullarda çoğaltıldı (Şekil 3.2).

3.2.1.2 G_{sa}'nın 201. Kodonu İçin Hazırlanan Negatif ve Pozitif Kontroller

G_{sa}'nın 201 kodonu için negatif kontrol olarak; R201 ve GB3 primerleri ile çoğaltılmış DNA bölgesi kullanılırken, pozitif kontrol olarak R201A ve GB3 primerleri kullanılarak çoğaltılmış bölge, R201B ve GB3 kullanılarak çoğaltılmış bölge ve son olarak R201C ve GB3 kullanılarak çoğaltılmış bölge kullanıldı (Şekil 3.3).

3.2.1.3 G_{sa} 'nın 227. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması :

G_{sa} 'nın 227 numaralı kodonunu içeren ve 187 bp büyüklüğünde olan bölge GA4 ve GB4 primerleri kullanılarak Gereç ve Yöntemlerde belirtilen koşullarda çoğaltıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: G_{sa} 'nın 8. ve 9. eksonları için PZR yöntemiyle çoğaltılmış tümör DNA bölgeleri. (-), DNA içermeyen negatif kontrol; (a), GA3 ve GB3 (b), GA4 ve GB4 primerleriyle çoğaltılmış PZR ürünleri.

3.2.1.4 G_{sa} 'nın 227. Kodonu İçin Hazırlanan Negatif ve Pozitif Kontroller

G_{sa} 'nın 227. kodonu için negatif kontrol oluşturmak için genomik DNA, Q227 ve GB4 primerleriyle, pozitif kontrolleri oluşturmak için ise Q227A ve GB4, Q227B ve GB4 ve Q227C ve GB4 primer çiftleri kullanılarak, PZR yöntemiyle çoğaltıldı (Şekil 3.3).

(m) 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 3.3: G_{sa} 'nın 201 ve 227 numaralı kodonlarındaki mutasyonları saptamak üzere hazırlanan kontrollerin elektroforezde incelenmesi. (1), 201. kodon için negatif kontrol; (2-4), 201. kodon için pozitif kontroller; (5), 227. kodon için negatif kontrol; (6-8), 227. kodon için pozitif kontroller; (m), DNA molekül ağırlık belirteçleri.

3.2.2 G_{12} Proteininin α - Altbirimini Kodlayan Genetik Bölgelerin Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Çoğaltılması

Baskılayıcı G proteininin α -altbirimindeki *gip* mutasyonlarını ortaya çıkarabilmek için aşağıda görüleceği gibi 3 ayrı bölge çoğaltılmıştır.

3.2.2.1 $G_{12\alpha}$ 'nın 179. ve 205. Kodonlarını İçeren Bölgenin Çoğaltılması

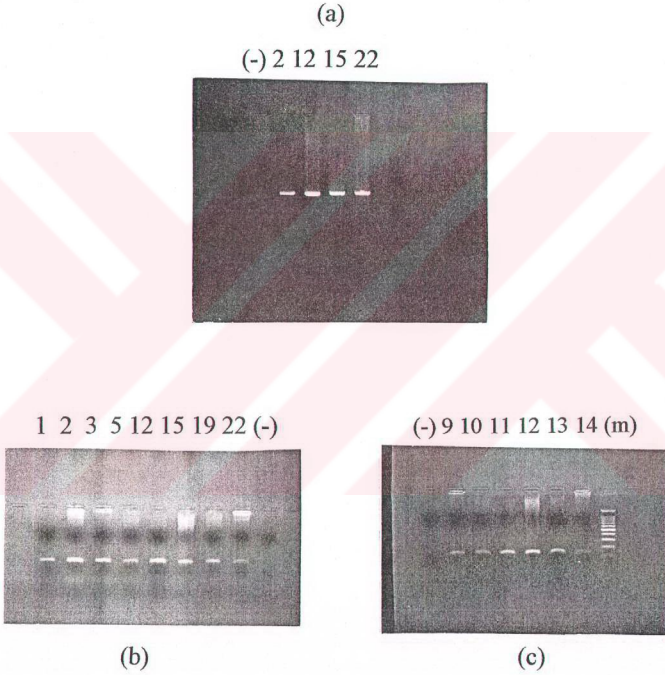
$G_{12\alpha}$ 'nın ekson 5, ekson 6 ve aradaki intron bölgesini de içeren ve 604 bp büyüklüğünde olan bölge, GC2 ve GD2 primerleri kullanılarak, Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtilen koşullarda çoğaltıldı (Şekil 3.4).

3.2.2.2 $G_{12\alpha}$ 'nın 179. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması

$G_{12\alpha}$ proteininin 179 numaralı kodonunu içeren ve 165 bp büyüklüğünde olan DNA genetik bölgesi GC3 ve GD3 primerleri kullanılarak Gereç ve Yöntemlerde belirtilmiş koşullarda çoğaltıldı (Şekil 3.4).

3.2.2.3 $G_{i2\alpha}$ 'nın 205. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması

$G_{i2\alpha}$ proteininin 205. kodonunu içeren ve 175 bp büyüklüğünde olan genomik DNA bölgesi GC4 ve GD4 primerleri kullanılarak, Gereç ve Yöntemlerde belirtilen koşullarda çoğaltıldı (Şekil 3.4).



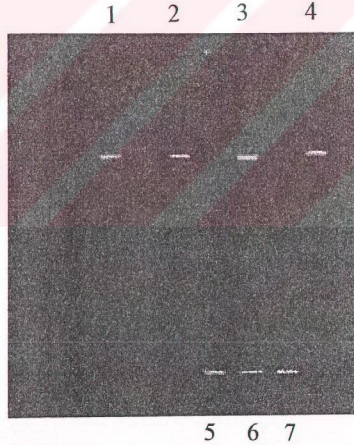
Şekil 3.4: $G_{i2\alpha}$ 'nın 5. ve 6. eksonları için PZR yöntemiyle çoğaltılmış tümör DNA bölgeleri. (-), DNA içermeyen kontrol; (m), DNA molekül ağırlık belirteçleri; (a), GC2 ve GD2; (b), GC3 ve GD3; (c) GC4 ve GD4 primerleriyle çoğaltılmış PZR ürünleri.

3.2.2.4 $G_{12\alpha}$ 'nın 179. Kodonu İçin Hazırlanan Negatif ve Pozitif Kontroller

$G_{12\alpha}$ 'nın 179 numaralı kodonu için negatif kontrol olarak R179 ve GD3 primerleri, pozitif kontrol olarak R179A ve GD3 primerleri, R179B ve GD3 primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.5).

3.2.2.5 $G_{12\alpha}$ 'nın 205. Kodonu İçin Hazırlanan Negatif ve Pozitif Kontroller

$G_{12\alpha}$ 'nın 205 numaralı kodonu için negatif kontroller Q205 ve GD4, pozitif kontroller ise Q205A ve GD4, Q205B ve GD4 ve son olarak Q205H ve GD4 primer çiftleri kullanılarak oluşturuldu (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: $G_{12\alpha}$ 'nın 179 ve 205 numaralı kodonlarındaki gip mutasyonlarını saptamak üzere hazırlanan kontrollerin elektroforezde incelemesi. (1), 179. kodon için negatif kontrol; (2,3), 179. kodon için pozitif kontroller; (4), 205. kodon için negatif kontrol; (5-7), 205. kodon için pozitif kontroller.

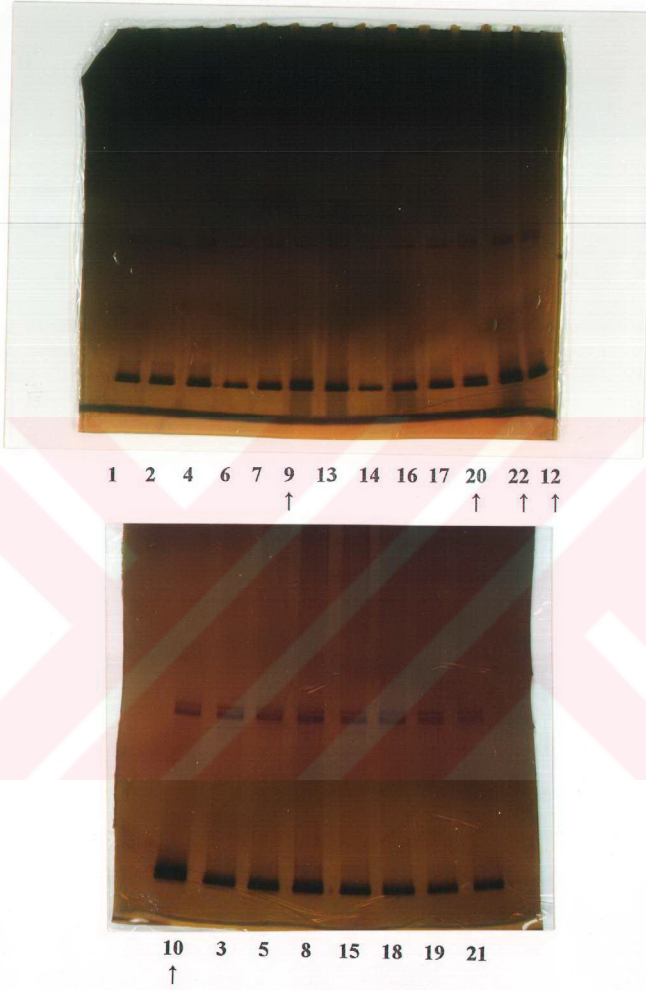
3.3 SSCP (Teksarmal Konformasyon polomorfizmi)

Yöntemiyle Mutasyonların İncelenmesi

Tek sarmal DNA, denatüre olmayan koşullarda molekül-içi etkileşimlerle belirlenen katlanmış bir yapıya sahiptir. Mutasyona uğramış bir DNA dizisi katlanmış yapısındaki değişiklikler nedeniyle elektroforezde mutasyona uğramamış diziden farklı hızla göç eder. SSCP analizi ile DNA polimorfizmlerinden, delesyonlardan veya nokta mutasyonlarından kaynaklanan değişiklikler farklı elektroforez koşulları kullanılarak belirlenir. Denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerinde ve sıcaklık farklarının önemli olmadığı MDE jellerinde mutasyon, bantlarda genişleme, yeni bantların yada heterodupleks bantların ortaya çıkması ile izlenebilir

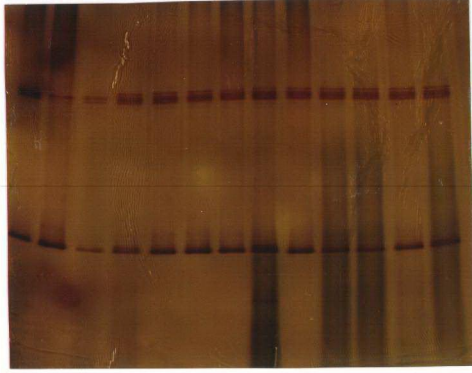
3.3.1 G_{scz} Geninin 8. Eksonundaki Mutasyonların SSCP Analiziyle İncelenmesi

G_{scz} 'nın 201 numaralı kodonunu içeren bölge PZR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra, denatüre edici tamponla 95°C'ta 5 dakika süreyle denatüre edildi ve örnekler buza yerleştirildi. Tek sarmal DNA'ları içeren örnekler 0.5 X MDE yada poliakrilamid jellerinde gliserollü veya gliserolsüz olarak yürütüldü. Denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerinde tek sarmal DNA örnekçelerinde bir farklılık gözlenmezken, normal ve mutant DNA'nın oluşturduğu heterodupleksler 5 hastada mutasyon olduğunu düşündürdü (Şekil 3.6). Mutasyonlardan kaynaklanan elektroforetik farklılıkları daha fazla vurgulayan gliserollü MDE jelinde heterodupleks bantlar, gliserolsüz MDE jelinde ise mutant tek sarmal DNA'lara bağlı oluşan ek bantlar görüldü (Şekil 3.7).



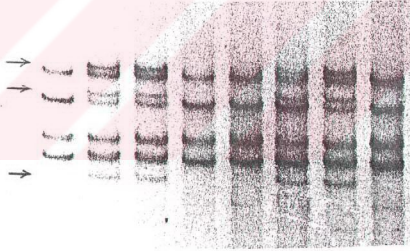
Şekil 3.6: G_{sc} 'nin 201 numaralı kodonundaki mutasyonların SSCP analiziyle belirlenmesi. G_{sc} 'nin 201. kodonunu kapsayan bölge için çoğaltılmış DNA örnekleri % 5 gliserol içeren % 6 poliakrilamid jellerinde yürütüldü ve gümüş nitrat ile boyandı. oklar heterodupleks bant içeren örneklere işaret etmektedir.

(A): Gliserollü 0.5 X MDE



4 7 8 9 5 13 14 10 17 18 19 21 22 7 8 9 10 11 4 13 14 15 16
↑ ↑ ↑ ↑ ↑

(B): Gliserolsüz 0.5 X MDE

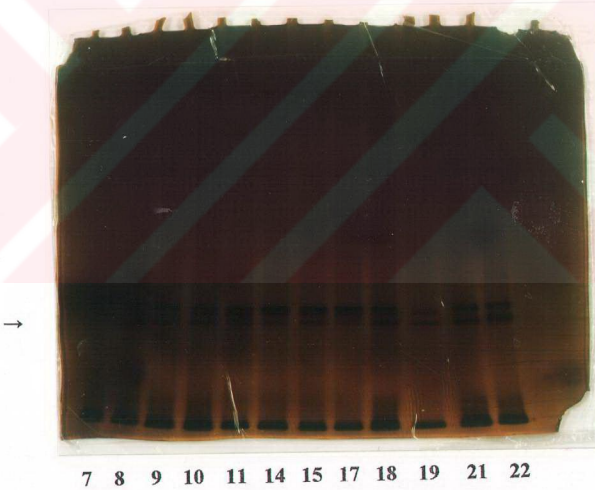


1 9 10 12 19 20 22 14

Şekil 3.7: G_{sc} 'nin 201 numaralı kodonundaki mutasyonların 0.5 X MDE jelinde belirlenmesi. PZR ile çoğaltılan DNA örnekleri (A) gliserol içeren (B) gliserol içermeyen 0.5 X MDE jellerinde 6-8 Watt'ta ve 14 saat süreyle elektroforez edildi ve gümüş boyama yöntemiyle görüntüldü. Oklar mutant diziden kaynaklanan (A) heterodupleks bantları ve (B) ek bantları göstermektedir.

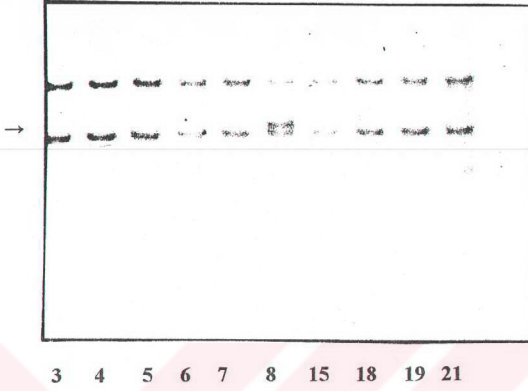
3.3.2 G_{sc} Geninin 9. Eksonundaki Mutasyonların SSCP Yöntemiyle İncelenmesi

G_{sc}'nın 227 numaralı kodonunu içeren bölge PZR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra, denatüre edici tamponla 95°C'ta 5 dakika süreyle denatüre edildi. Örneklerin 0.5 X MDE ve % 6 denatüre edici olmayan poliakrilamit jellerinde (1.5-2.0) saat süreyle 200V'ta gliserolsüz ve gliserollü olarak elektroforezleri yapıldı (Şekil 3.8 ve 3.9). Yapılan gliserollü ve gliserolsüz 0.5 X MDE ve % 6 poliakrilamit jellerde aynı sonuçlar alındı ve 1 hasta DNA'sının göç etme hızında mutasyona bağlı kayma belirlendi.

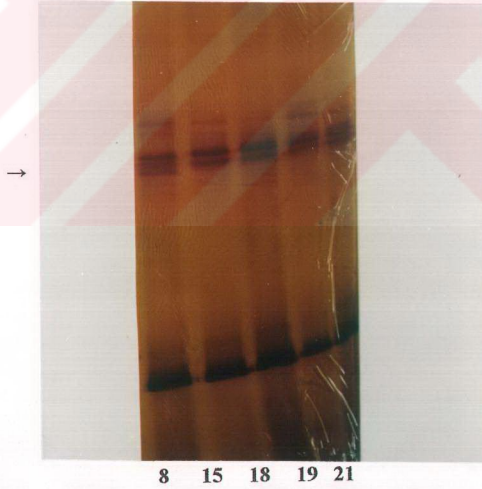


Şekil 3.8: G_{sc}'nın 227. kodonundaki mutasyonun SSCP analiziyle belirlenmesi. 227 numaralı kodon için çoğaltılan tümör DNA örnekleri gliserol içeren % 6'lık poliakrilamit jellerinde yürütüldü. Mutant örnekteki ek bant okla işaretlenmiştir.

(A) Gliserollü 0.5 X MDE



(B) Gliserolsüz 0.5 X MDE



Şekil 3.9: Gsα'nın 227 numaralı kodonundaki mutasyonun MDE jellerinde görüntülenmesi. (A) gliserol içeren (B) gliserol içermeyen MDE jeli.

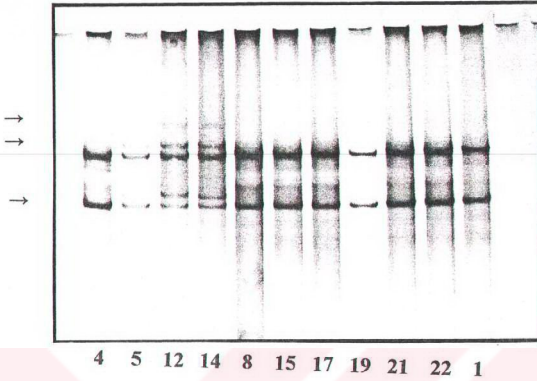
3.3.3 $G_{i2\alpha}$ Genindeki *gip* Mutasyonlarının SSCP Yöntemiyle İncelenmesi

$G_{i2\alpha}$ genindeki *gip* mutasyonlarını incelemek üzere tümör DNA örnekleri 179 ve 205 numaralı kodonları ve aradaki intron bölgesini kapsayacak şekilde (604 bp) ve ayrıca 179 (165 bp) ve 205 (175 bp) numaralı kodonları ayrı ayrı kapsayacak şekilde PZR ile çoğaltıldı. 604 bp'lik bölgelerin SSCP analizi sonucu poliakrilamit jelinde 1 hasta'da (12 numaralı) heterodupleks bant, MDE jelinde ise 3 hastada (5, 12, 14 numaralı) farklı hızda göç eden bantlar gözlemlendi (Şekil 3.10 ve 3.11). Ancak, intron bölgelerini kapsamayan 165 ve 175 bp'lik ürünlerin analizinde mutasyon düşündürülen farklı örnekçe belirlenmedi (Şekil 3.12 ve 3.13).

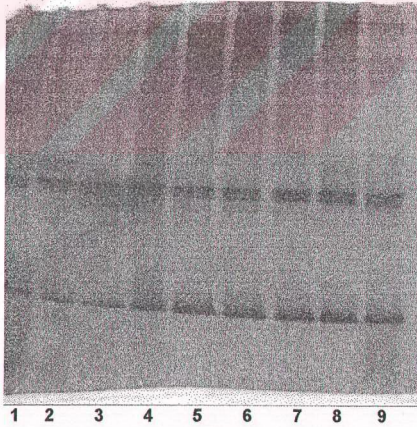


Şekil 3.10: $G_{i2\alpha}$ 'daki *gip* mutasyonlarının SSCP yöntemiyle incelenmesi. 179 ve 205 kodonlarını ve aradaki intron dizilerinin içeren bölge (604 bp), tümör DNA'larından PZR ile çoğaltıldı ve gliserol içeren % 6 poliakrilamit jelinde incelendi. Ok, heterodupleks banta işaret etmektedir.

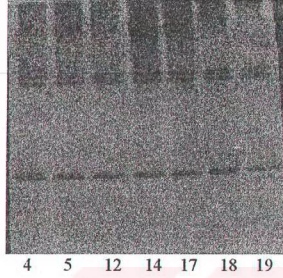
Gliserolsüz 0.5 X MDE



Şekil 3.11: *gip* mutasyonlarının MDE jelinde incelenmesi. 604 bç'lik PZR ürünleri gliserol içermeyen 0.5 X MDE jelinde yürütüldü. Oklar mutant tek sarmal DNA'dan kaynaklanan bantlara işaret etmektedir.



Şekil 3.12: $G_{12\alpha}$ 'nın 179 numaralı kodonu için SSCP analizi. 165 bç'lik PZR ürünleri gliserol içeren 0.5 X MDE jelinde incelendi. (1-8) hasta örnekleri



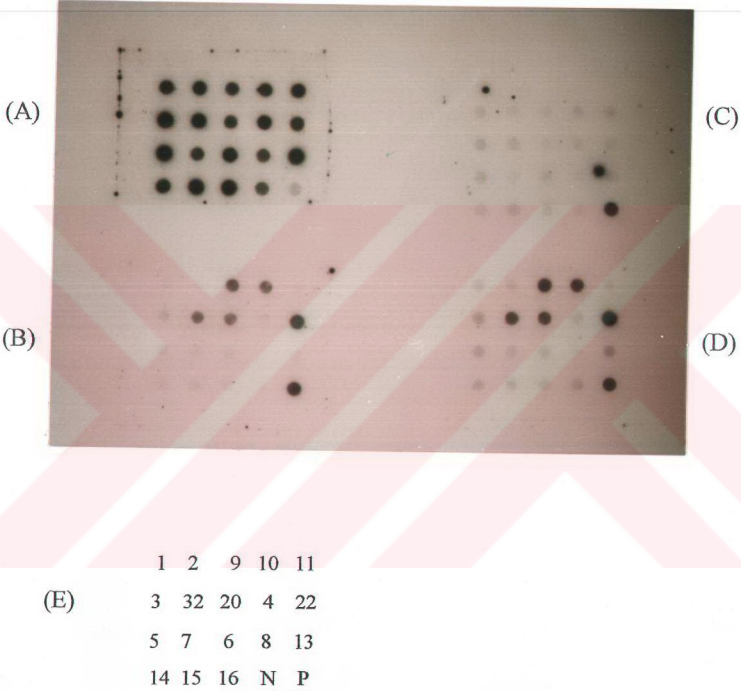
Şekil 3.13: $G_{i2\alpha}$ 'nın 205 numaralı kodonu için SSCP analizi. 175 bp'lik PZR ürünleri gliserolsüz içeren 0.5 X MDE jelinde incelendi.

3.4 *gsp* ve *gip* Mutasyonlarını Allel-Spesifik Oligonükleotit Hibritleme (ASOH) Yöntemiyle Belirlenmesi

G_{sa} 'nın 201 ve 227 ve $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 numaralı kodonlarındaki mutasyonları inceleyebilmek için, hipofiz tümörlerine ait olan bütün örnekler, Gereç ve Yöntemlerde belirtildiği koşullarda PZR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra nokta emdirme düzeneği kullanılarak naylon membranlara emdirildi ve kullanılıncaya kadar 4°C'ta bekletildi.

3.4.1 G_{sa} Geninin 8. Kodonundaki Mutasyonları ASOH ile Saptaması

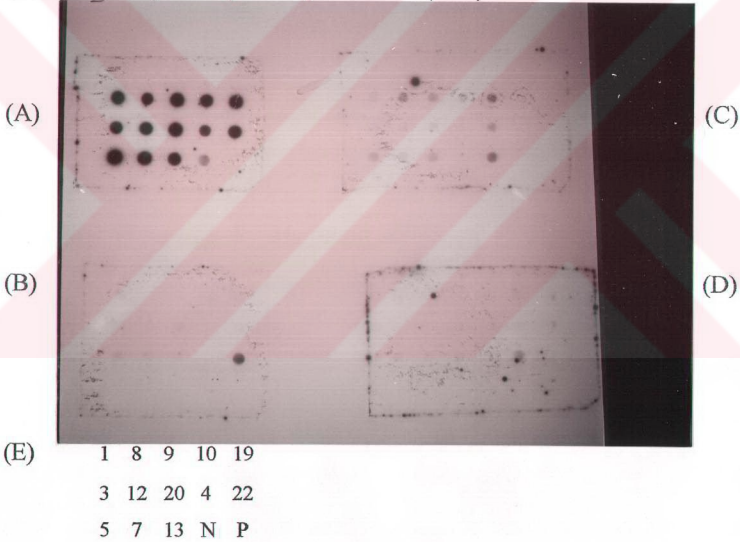
G_{sa}'nın 201 numaralı kodonunu incelemek için hazırlanan 4 membran, 0.45µm Millipore filtrelerden geçirilmiş 5 X SSPE, % 0.5 SDS, 5 X Denhardt çözeltisi ve 0.1 mg/ml salmon sperm DNA'sı varlığında 55°C'ta 3 saat ön hibritlemeye bırakıldıktan sonra [γ -³²P] ATP ile işaretlenmiş ve bağlanma etkinlikleri (yikanmış/yıkanmamış filtre oranı) % 60 - % 66 arasında olan R201(normal tip), R201A, R201B ve R201C (mutant tip) oligonükleotit problemlerle etkileştirildi. Membranlar 2 X SSPE ve % 0.1 SDS içeren çözelti içinde oda ısısında çalkalamalı olarak yıkandıktan sonra 3 M tetrametilamoniyumklorür (TMAC), %0.2 SDS ve 50 mM Tris pH 8 çözeltisi içinde 55°C'ta 10 dakika çalkamalı olarak yıkandı, etüvde biraz kurutuldu ve streç filmle sarıldı. Membranlar, yansıtıcı kaset içinde Kodak X-Omat filmi üzerine yerleştirildi, film -70°C'ta 1 gün bekletildikten sonra banyo edildi. Banyo edilen filmdeki negatif kontroller dahil bütün örneklerden sinyal alındığı için yıkama sıcaklığı her seferinde birer derece arttırılarak işlem tekrarlandı. 60°C'ta negatif kontrolde bir sinyal alınmadığı halde hem R201A probuyla hemde R201C probuyla etkileştirilmiş membranda 4 hasta örneğinde sinyal alındı (Şekil 3.14). Böylece bu hastaların 201. kodonlarında R201C (Arjinin→Sistein) mutasyonu taşıdıkları ve bu örneklerin SSCP yönteminde mutasyon içeren örneklerle aynı olduğu belirlendi.



Şekil 3.14: G_{sa} 'nın 8. eksonundaki *gsp* mutasyonlarının ASOH ile saptanması. PZR ile çoğaltılmış tümör DNA ürünleri (A), R201 (normal tip: Arjinin); (B), R201A (Arjinin→Serin, Sistein ve Glisin içeren karışım); (C), R201B (Arjinin→Histidin, Prolin ve Lösin içeren karışım); (D), R201C (Arjinin→Sistein) problemleri ile etkileştirildi. (E) hasta örneklerinin (1-18) dizilişi: N, negatif kontrol; P, pozitif kontrol

3.4.2 G_{sc} Geninin 9. Kodonundaki Mutasyonların ASOH ile İncelenmesi

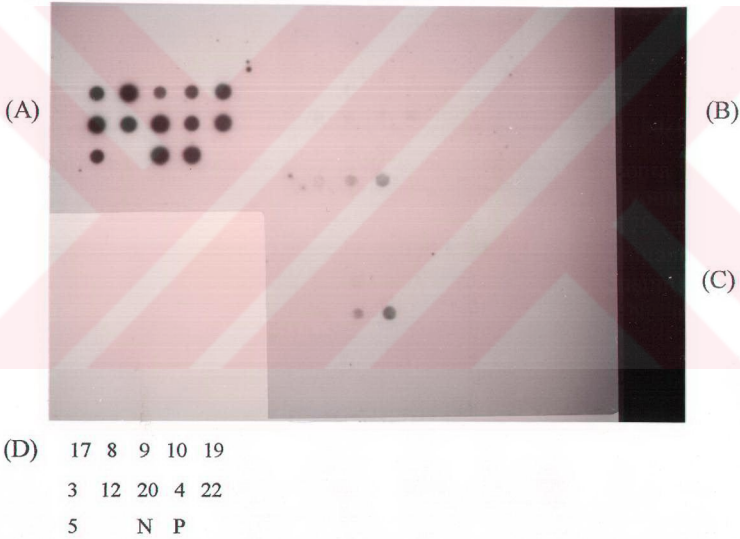
G_{sc}'nin 227 numaralı kodonunu incelemek için hazırlanan 4 membran [γ -³²P] ATP ile işaretlenmiş bağlanma etkinlikleri (yıkamış filtre / yıkanmamış filtre oranı) % 55 - % 65 arasında olan Q227 (normal tip), Q227A, Q227B ve Q227C (mutant tip) oligonükleotid problarla Gereç ve Yöntemlerde belirtildiği şekilde etkileştirildi. Son yıkama sıcaklığı 55°C'tan başlayarak 67°C'a kadar arttırıldı, ancak pozitif kontrollerin dışında hiç bir sinyal alımadı (3.15).



Şekil 3.15: G_{sc}'nin 227 numaralı kodonundaki mutasyonların ASOH, ile incelenmesi. PZR ile çoğaltılmış tümör DNA ürünleri (A), Q227 (normal tip: Glutamin); (B), Q227A (Glutamin→Glutamik asit ve Lizin içeren mutant prob karışımı); (C), Q227B (Glutamin→Prolin, Arjinin ve Lösin karışımı); (D), Q227C (Glutamin→Histidin) probleleriyle hibritleştirildi (E) hasta örneklerinin dizilişi N, negatif kontrol; P, pozitif kontrol.

3.4.3 $G_{i2\alpha}$ Geninin 5. Eksonundaki Mutasyonların ASOH Yöntemiyle İncelenmesi

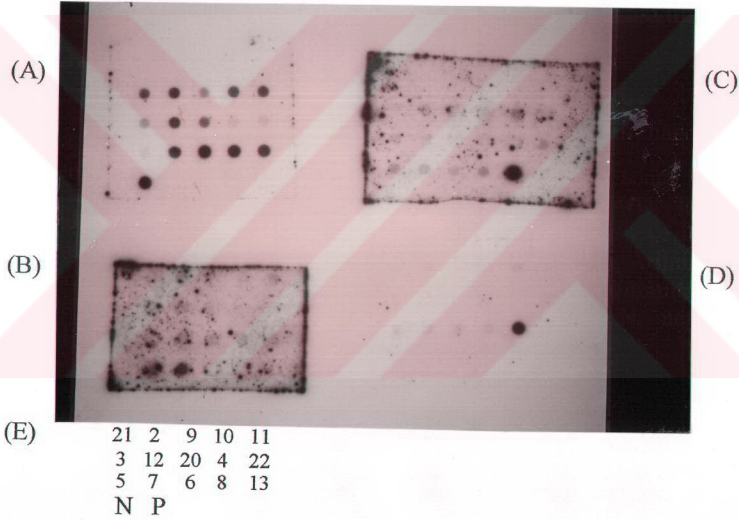
$G_{i2\alpha}$ 'nın 179 numaralı kodonunu incelemek için hazırlanan 3 membran, 56.5°C 'ta 3 saat ön hibritlemeye bırakıldıktan sonra $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ile işaretlenmiş ve bağlanma etkinlikleri R179 (normal tip) için %56, R179A için %41 ve R179B için % 53 (mutant tipler) olan oligonükleotit problemleriyle etkileştirildi. Son yıkamalar 56.5°C 'tan başlayarak 61.5°C 'a kadar gerçekleştirildi, ancak pozitif kontrol dışında hiç bir örnekte sinyal elde edilmedi (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: $G_{i2\alpha}$ 'nın 179. kodonundaki mutasyonlar ASOH yöntemiyle incelenmesi. PZR ile çoğaltılmış tümör DNA ürünleri (A), R179 (normal tip: Arjinin); (B), R179A (Arjinin→Sistein, Serin ve Glisin mutant prob karışımı); (C), R179B (Arjinin→Histidin, Prolin ve Lösin karışımı); (D), hasta örneklerinin dizilişi N, negatif kontrol; P, pozitif kontrol.

3.4.4 $G_{i2\alpha}$ Geninin 6. Eksonundaki Mutasyonların ASOH Yöntemiyle İncelenmesi

$G_{i2\alpha}$ 'nın 205 numaralı kodonunu incelemek için hazırlanan 4 membran, 57°C'ta 3 saat ön hibritlemeye bırakıldıktan sonra [γ - ^{32} P] ATP ile işaretlenmiş ve bağlanma etkinlikleri Q205 (normal tip) için %73, Q205A için %61, Q205B %47 ve Q205H için % 53 (mutant tipler) olan oligonükleotit problemlerle etkileştirildi. Son yıkamalar 67°C'ta gerçekleştirildi. Hasta örneklerinde herhangi bir mutasyon saptanmadı (Şekil 3.17).



Şekil 3.17: $G_{i2\alpha}$ 'nın 205. kodonundaki mutasyonların ASOH yöntemiyle incelenmesi. PZR ile çoğaltılmış tümör DNA ürünleri (A), Q205 (normaltip: Glutamin); (B), Q205A (Glutamin→Glutamik asit ve Lizin içeren mutant prob karışımı); (C), Q205B (Glutamin→Prolin, Arjinin ve Lösin mutant prob karışımı); (D), Q205H (Glutamin→Histidin mutant) problemleriyle hibritleştirildi (E) hasta örneklerinin dizilişi N, negatif kontrol; P, pozitif kontrol

Hipofiz Tümör Örneklerindeki *gsp* ve *gip* Mutasyonları.

Hasta	Yaşı	Cinsiyet	Teşhis	Tümör Ebadı	SSCP	ASOH	Dizi Analizi
VA	26	E	Prolaktinoma	Makro	-	-	
BT	21	K	Prolaktinoma	Makro	-	-	
HÖ	26	K	Cushings	Mikro	-	-	
MA	24	E	Prolaktinoma	Makro	-	-	
ŞÖ	34	K	Akromegali (rezidüel)	Makro	+(179/205)	-	Yapılacak
AŞ	34	K	Akromegali	Mikro	-	-	
EÖ	65	K	Fonksiyonel olmayan	Makro	-	-	
GB	42	K	Prolaktinoma	Makro	+(227)	-	Yapılacak
KD	43	K	Akromegali (residüel)	Makro	+(201)	R201C	R201C
NC	53	K	Akromegali	Makro	+(201)	R201C	R201C
İK	45	E	Fonksiyonel olmayan	Makro	-	-	
ZY	48	K	Akromegali	Makro	+(201)	-	Yapılacak
					+(179/205)	-	R179P
MD	51	E	Akromegali	Makro	-	-	
HT	41	E	Fonksiyonel olmayan	Makro	+(179/205)	-	-
OA	44	E	Fonksiyonel olmayan	Makro	-	-	
HK	56	E	Fonksiyonel olmayan	Makro	-	-	
RC	34	K	Prolaktinoma	Mikro	-	-	
FK	38	K	Prolaktinoma	Makro	-	-	
AK	23	E	Fonksiyonel olmayan	Makro	-	-	
ŞT	25	K	Fonksiyonel olmayan	Makro	+(201)	R201C	R201C
ŞH	26	K	Prolaktinoma	Makro	-	-	
LK	30	K	Akromegali	Makro	+(201)	R201C	

4. TARTIŞMA

G proteinleri, hücre yüzey reseptörleri ile hücre içi efektör moleküllerini birbirine bağlayarak, hücre içi ikincil habercilerin oluşmasına aracılık eden bir protein ailesidir. α , β ve γ altbirimlerinden oluşan bu heterotrimerik proteinler GDP-bağlı aktif olmayan form ve GTP-bağlı aktif form olmak üzere iki farklı konformasyonda bulunabilirler. Dinlenim halinde, G protein heterotrimerinin α -altbirimi GDP bağlı durumdadır. GTP bağlı aktif duruma geçtiğinde α -altbirimi $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılır ve hücre içi efektör moleküllerini uyarır. α -altbiriminin doğal GTPaz aktivitesi ile GTP GDP'ye hidrolizlenerek yeniden aktif olmayan durumuna geri döner. G proteini ailesinin bir üyesi olan G_s , aralarında hipofiz somatotrof reseptörü GHRH de bulunan bir çok reseptörü adenilat siklaz uyarısına kenetler.

G proteinleri kenetlendikleri reseptörler yoluyla çok sayıda biyokimyasal etkileşime aracılık etmektedir. G_s proteini yoluyla adenilat siklaz enziminin aktiflenmesi sonucu cAMP düzeyi artar ve Ca^{+2} kanalları uyarılır. G_i proteini yoluyla da adenilat siklaz enzimi baskılanır, cAMP düzeyi azalır ve K^+ kanalları açılır. Bu iki heterotrimerik G proteini etkinliği sonucu tiroid bezinde TSH, adrenal kortekste ACTH, yumurtalıkta LH, çizgili kas ve kalpte adrenalin, kemikte parathormon, karaciğerde glukagon, böbrekte vazopresin ve yağ dokusunda adrenalin, ACTH, glukagon ve TSH yoluyla hücresel yanıtlar oluşur. G_q proteininin uyarılmasıyla fosfolipaz C- β enzimi aktiflenerek fosfatidil inositol difosfat'ı (PIP_2) inositol trifosfat (IP_3) ve diacilgliserol'e (DAG) ayırır. Bu etkinlik sonucunda da karaciğerde vazopresin, pankreas ve düz kasta asetilkolin, mast hücrelerinde antijen ve trombositlerde trombin yoluyla

hücresel yanıt oluşur. G_o proteininin etkinliği sonucu da K^+ kanalları ve fosfolipaz C- β enzimi aktiflenir, Ca^{+2} kanalları ise inaktif olur. G_{olf} proteini koku duyu nöronlarındaki adenilat siklaz enzimini aktiflerken G_t de omurgalı çubuk fotoreseptörlerinde cGMP fosfodiesteraz'ı uyarır. Bu yanıtlar moleküler düzeyde protein fosforilasyonu, gen transkripsiyonu, hücre iskeleti reorganizasyonu, salgılama ve membran depolarizasyonu gibi hücre içi değişimler yol açar.

Hücre büyümesini etkileyen trombin, bombesin, serotonin ve anjiotensin gibi birçok ajanın G proteinlerine kenetli reseptörlerle etkileşmesi G proteinlerinin hücre büyümesi ve farklılaşmasında da etkin rol aldığını göstermektedir. Ayrıca G proteinlerinin tubulin, kollajen ve aktin ile etkileştiği gösterilmiştir. Dolayısıyla G proteinlerinin hücre hareketinin, hücre iskelet yapısının ve kemotaksisin düzenlenmesinde de rol aldığı düşünülmektedir. Organizmada özellikle hormonal sinyal sisteminde bu kadar etkin rol alması nedeniyle G proteini ve G proteini bağlı reseptörlerde meydana gelen bozukluklar çeşitli endokrin hastalıklara neden olmaktadır

Endokrin hastalıkların büyük çoğunluğu hormon yetersizliğine neden olan endokrin bezi bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Yetersizliğin bir diğer nedeni de hormon reseptörleri ve sinyal mekanizmasındaki bozukluklardır. Hormon miktarında artışa neden olan hastalıklar çoğunlukla tümör kökenlidir. Bunun tipik bir örneği aşırı GH salgılamasına neden olarak akromegaliye neden olan bazı hipofiz tümörleridir. Endokrin tümörlerin, normal hücre büyümesini ve farklılaşmasını bozan genetik değişimlerin birikimi sonucu oluştuğu sanılmaktadır. Yaygın olarak gözlemlenen ve insan karsinogenesizin temeli kabul edilen mutasyonal değişimler *p53* tümör baskılayıcı

genindeki ve *ras* proto-onkogenlerindeki nokta mutasyonlarıdır. Fakat karsinogenesizin mekanizmasının tam olarak açığa kavuşmamış olması ve birçok G proteini kenetli reseptörün ve G proteininin hücre büyümesinin kontrolünde görev alması bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların insan tümörlerinin oluşumundaki etkenlerden biri olabileceğini düşündürmektedir. . Bu çalışmada endokrin tümörlerinden sadece bir grubunu oluşturan hipofiz tümörleri üzerinde çalışılmıştır. Çalışılan hastaların 7'si akromegalik, 7'si fonksiyonel olmayan, 7'si laktotrof (prolaktinoma) ve 1'i kortikotrof (Cushing) hastaydı.

Tüm hipofiz adenomlarının % 10-15'ini oluşturan büyüme hormonu salgılayan hipofiz tümörleri çok az bir sıklıkla gigantizme olmakla birlikte çoğunlukla akromegaliye neden olmaktadır. Akromegali, ergenlik çağını geçen ve kemikleşme sürecini tamamlamış olan kişilerde hipofiz bezinin aşırı büyümesiyle ortaya çıkar. Büyüme hormonunun aşırı yapımı sonucu kemikler uzamaz, ancak yumuşak dokular büyümeye devam eder ve kemiklerde kalınlaşma olur. Bu kalınlaşma özellikle el ve ayaklardaki ince kemiklerde ve kranyum, burun, alın, supraorbital bölge, alt çene ve membranöz kemiklerde belirginleşir. Aynı zamanda iç organlar da aşırı bir şekilde büyümeye başlarlar. Avrupa toplumlarında akromegalik hastalarla yapılan çalışmalarda bu hastaların %30-40'ında $G_{\alpha s}$ proteinini kodlayan genin 201 ve 227 no'lu kodonlarında nokta mutasyonlarına rastlanmıştır (94). Japon toplumundaki akromegalik hastalarla yapılan diğer bir çalışmada ise 45 hastanın 2'sinde 201 no'lu kodonda mutasyona rastlanmıştır (95,96). İki toplum arasındaki büyük fark bu mutasyonların ırka özgü olabileceğini düşündürmüştür. Ancak Kore'li akromegalik hastalarla

yapılan çalışmalarda mutasyon sıklığının Avrupa'lı toplumların sıklığına yakın olduğu bulunmuştur (98). Böylece bu mutasyonların ırka özgü olduğu görüşü geçerliliğini kaybetmiştir. 22 Türk hastada gerçekleştirilen bu çalışmada ise SSCP analizine göre toplam 9 hastada mutasyon olasılığı düşünülmüştür. Bu hastaların 4'ünde R201C mutasyonu ASOH ile, 3'ünde ise dizi analiziyle doğrulanmıştır. En yaygın G_s mutasyonu olan R201C mutasyonu taşıyan tümörlerin 4'ü GH salgılayan (akromegali), 1 tanesi ise fonksiyonel olmayan tümörlerdir. Akromegalik hastaların bir tanesinde, SSCP analiziyle hem 201 numaralı hemde 179/205 numaralı kodonlarda gözlenen değişikliklere rağmen ASOH ile mutasyon belirlenememiştir. Yöntemler arasındaki bu farklılık çalışma ilkelerinden kaynaklanmaktadır. Mutasyonların arandığı kodonların dışında oluşan mutasyonlar da SSCP'de çift bant oluşumuna neden olabilmektedir. Oysa, problemlerin özgünlüğü nedeniyle bu mutasyonlar ASOH'ta gözlenmemektedir. Bundan dolayı, elektroforezde göç etme özelliği farklı olan 5 hastada *gsp* ve *gip* dışında bir mutasyon olasıdır. Ayrıca, 179/205 kodonları için PZR tepkimesi için kullanılan primerler, aradaki intron bölgesini de çoğalttığı için intron bölgede bir mutasyon olasılığı da söz konusudur. ASOH ile desteklenen bulgulara göre, *gsp* mutasyonu için akromegalik hastalarda belirlenen oran Avrupalı toplumların mutasyon sıklığına yakındır. R201C mutasyonu taşıyan tümör DNA'larından 3 tanesi dizi analiz için İngiltere'deki Kings College Tıp ve Diş Hekimliği fakültesine gönderilmiş ve bulgular desteklenmiştir. Ayrıca 179/205 mutasyonun yalnızca SSCP analiziyle düşündüren 3 örnek daha dizi analizine gönderilmiş, ancak henüz yanıt alınamamıştır.

Hipofiz adenomlarının yaklaşık %25-40'ını oluşturan ve prolaktin hormonunun salgılanması ile nitelenen hipofiz tümör tipinde *gsp* ve *gip* mutasyonlarına çok ender rastlanmaktadır (28). Bu çalışmada da prolaktinomali 7 hastanın literatüre uygun olarak sadece birtanesinde SSCP analiziyle mutasyon bulunmuş ancak ASOH yöntemiyle doğrulanmamıştır. Bu hastanın dizi analizi yapılacaktır.

Cushing sendromu olarak bilinen hipofiz adenomu ACTH salınımı ile karakterize olup tüm hipofiz adenomlarının %10-15'ini oluşturmaktadır. Cushing sendromunda da *gsp* ve *gip* mutasyonlarına çok ender rastlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada 32 Cushing sendromlu hastanın 2'sinde *gsp*, 1'inde *gip* mutasyonuna rastlanmıştır (59). Diğer bir çalışmada ise 9 hastanın hiçbirinde mutasyona rastlanmamıştır (96). Bu çalışmada ise sadece bir hasta ile çalışılmış ve bu hastada G protein mutasyonu belirlenmemiştir.

Hiçbir hormon salınımı yapmayan, sadece kütle etkisiyle çevre dokulara yaptığı baskıyla karakterize olan fonksiyonel olmayan hipofiz adenomu tüm hipofiz adenom türlerinin yaklaşık %10-25'ini oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada 21 fonksiyonel olmayan adenomlu hastada *gsp* mutasyonu araştırılmış ve sadece 2 hastada mutasyon bulunmuştur. Aynı çalışmada 27 fonksiyonel olmayan adenomlu hastada *gip* mutasyonu araştırılmış ve hiçbir hastada mutasyon bulunmamıştır. Bu çalışmada ise 7 fonksiyonel olmayan adenomlu hastanın 1'inde *gsp* mutasyonu (R201C) saptanmış birinde de SSCP çift bandı gözlenmiştir.

İnsan somatotrof adenomları hipofiz bezinden salgılanan GHRH'i (G_s 'e kenetli) pozitif, somatostatinin (SRIH, G_i 'ye kenetli) ise negatif düzenlemesine tabidir. GHRH reseptörüne bağlandığında sırasıyla G_s ve adenilat siklaz uyarılır, cAMP oluşur ve böylelikle PKA etkinleşir. Sonuç, büyüme hormon oluşumu ve somatotrof büyümesidir. Somatotrof adenomların bir bölümünde G_s ve adenilat siklaz etkinliğinde saptanan aşırı etkinlik, hipofiz tümörlerinde bu yolda olası bir bozukluğa dikkati çekmişti (82). Daha sonra bu grup tümörlerin yaklaşık %40'nda $G_{s\alpha}$ genini *gsp* olarak adlandırılan onkogene dönüştüren bir mutasyon saptanmıştır.

Büyüme hormonu salgılayan hipofiz adenomları içinde *gsp* mutasyonları taşıyan ve taşımayan hastaların klinik bulguları karşılaştırıldığında oldukça çelişkili sonuçlar çıkmıştır. *gsp*(+) ve (-) akromegalik hastalarda yaş ve cinsiyet açısından bir fark gözlenmezken, tümör büyüklüğü ve dolaşımdaki büyüme hormonu düzeyleri ile ilgili farklar belirlenmiştir. *gsp*(+) hastalarda tümörler bazı çalışmalarda daha küçük (97) ya da benzer, dolaşımdaki GH düzeyleri ise daha yüksek, daha düşük ya da benzer (94) bulunmuştur. Türk hastalarda klinik bulgular açısından *gsp*(+) ve (-)'li hastalarda bir fark bulunmamıştır. Ancak R201C mutasyonu taşıyan tümörlerin 5'inin de makro adenom olması dikkat çekmiştir.

Somatotrof adenomları bu tümörlerde *gsp* mutasyonlarının varlığına göre iki sınıf ayrılır. Bu iki grup yalnızca adenilat siklazın aşırı uyarısına yol açar. $G_{s\alpha}$ nokta mutasyonu ile değil, aynı zamanda somatostatin'e (SRIH) duyarlılıkları ile de birbirinden farklıdır. *gsp*(-) somatotrof adenomlarının bir bölümü somatostatin agonisti okreotide

duyarsızken, *gsp* onkogeninin varlığı her zaman bu peptidin büyüme hormonunun salgılanmasını baskılamaktadır. Bu özellik, *gsp* onkogenini akromegalide okreotide duyarlılık için potansiyel bir belirteç yapmaktadır. *gsp* mutasyonu taşıyan akromegalik hastaların SRIH'e daha fazla yanıt verdiği Spada ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Akromegalik hastaların bir bölümü somatostatin'in uzun erimli analogu, okreotid, ile tedavi edilmiştir. Ancak, okreotid hastaların bir kısmında GH düzeylerini normal değerlere düşürürken diğerlerinde etkisiz kalmıştır. Orkeotid'e yanıtın endokrin temelini araştırmak için Yeng ve arkadaşlarının (98) 30 akromegalik hastadan 17'sinin okreotide iyi yanıt verdiğini belirlemişlerdir. Bu grup hastanın 5'inde yapılan dizi analizi ile 3'ünün R201C mutasyonu taşıdığı, okreotide yanıt vermeyen 5 hastanın hiç birinde *gsp* mutasyonunun bulunmadığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada *gsp*(+) 6 hastanın hepsi okreotide yanıt verirken, *gsp*(-) hastalardan yalnızca 3 tanesi tedaviye yanıt vermiştir. Bu çalışmalar *gsp*(+) tümörlü hastaların somatostatin analoglarla tedavi için en uygun aday olduklarına işaret etmektedir.

Hipofiz tümörlerinin bir bölümünde her ne kadar G_{sa} etkinliği artmış ise de, tümör patogenezisinde ve fonksiyonunda G_{sa} 'nın rolü henüz çok açık değildir. *gsp* mutasyonlarının varlığına göre somatotrof adenomları iki gruba ayırmak mümkündür; ancak özellikle GHRH'a yanıt açısından iki grup kısmen örtüşmektedir. Ayrıca, klinik açıdan bakıldığında, *gsp*(+) ve (-) tümörleri birbirinden ayıran kesin fenotipik özellikler de tanımlanamamıştır. *gsp* mutasyonunun onkojenik olması adenilat siklaz sisteminin somatotrof büyümesinde ve işlevindeki önemli rolü ile uyumlu olmakla birlikte, *gsp* mutasyonlarının hipofiz hücrelerinde onkojenik olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur. Öte yandan,

fonksiyonel olmayan tümörlerin küçük bir bölümünde de olsa salgı sürecinde rol alan adenilat siklazın aşırı uyarılmasıyla sonuçlanan *gsp* mutasyonlarının bulunması da şaşırtıcıdır. *gsp* mutasyonları büyük bir olasılıkla hipofiz tümör oluşumu için gerekli olan birkaç onkogenik mutasyondan bir tanesidir.

gsp mutasyonlarının bulunması ile tümör oluşumu ve aşırı hormon salgılama etkinliği için ortak bir mekanizma ortaya konulmuş, daha etkin tedavi hedeflerinin belirlenmesine yol açılmıştır. Okeotid'e yanıtın SRIH reseptörlerinin ekspresyonuna bağımlı olduğunun gösterilmesiyle *gsp*(+) tümörlerinde SRIH reseptörlerinin fazla ekspres edildiği ve bunun da dengeleyici bir mekanizma olduğu varsayılabilir. Eğer bu hipotez doğrulanabilirse, *gsp*(+) tümörlü hastaların birincil olarak somatostatin analoguyla tedavi edilmeleri söz konusu olabilir. Ancak bunun için ön koşul *gsp*(+) ve *gsp*(-) hastaları klinik ve biyokimyasal parametrelerle ayırt etmek olacaktır.

5. SONUÇLAR

1. Hipofiz tümörleri alınmış 7'si akromegalik, 7'si fonksiyonel olmayan, 7'si laktotrof prolaktinoma ve 1'i Cushing 14'ü kadın, 8'i erkek olan 22 hasta örneği ile çalışılmıştır. Hastaların tümör dokularından DNA'lar izole edilip G_s proteininin α -altbirimini kodlayan ve 201 ile 227 kodonlarını içeren bölgeler ile G_i proteininin $\alpha 2$ -altbirimini kodlayan ve 179 ile 205 içeren genetik bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır.

2. Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) yöntemiyle incelenen hastaların 5'i $G_{s\alpha}$ 'nın 201 kodonu içeren bölgede, 1'i $G_{s\alpha}$ 'nın 227 kodonu içeren bölgede ve 3'ü $G_{i2\alpha}$ 'nin 179/205 kodonlarını içeren bölgede olmak üzere toplam 9 hastada *gsp* ve *gip* mutasyonu olasılığı düşünülmüştür.

3. Allel Spesifik Oligonükleotidlerle Hibritleme (ASOH) yöntemiyle yapılan çalışmalarda hastaların sadece 4'ünde *gsp* mutasyonuna rastlanmıştır. Hastaların 4'ünde olan bu mutasyonun $G_{s\alpha}$ 'nın 201 numaralı kodonunda (Arjinin yerine Sistein) olduğu saptanmıştır. İngiltere'deki Kings College Tıp ve Diş Hekimliği fakültesi laboratuvarına gönderilen 8 örnekten 5'i DNA dizi analizine bakılmış ve bu 5 örnekten 3 tanesinde R201C mutasyonları doğrulanmış, birtanesinde R179P mutasyonu saptanmış birtanesinde ise mutasyon içermediği saptanmıştır. Kalan 3 örneğin sonuçları ise tezin yazım aşamasına yetişememiştir

6. KAYNAKLAR

- 1- Zubay, G.: Biochemistry: Hormon Action. Macmillan Publishing Company, New York. Collier Macmillan Publishers, London, s.1045-1087, 1988.
- 2- Emil, L. S.: Principles of Biochemistry (Mammalian Biochemistry): The Nervous System. McGraw-Hill International Book Company, chapter 7: 243-272, 1983.
- 3- Emil, L. S.: Principles of Biochemistry (General Aspects): Viruses: The Interferons McGraw-Hill International Book Company, chapter 30: 810, 1983.
- 4- Zubay, G.: Biochemistry: Regulation of Gene Expression in Eukaryotes. Macmillan Publishing Company, New York. Collier Macmillan Publishers, London, s.1011-1044, 1988).
- 5- Guyton, A. C.: W. B. Saunders Company, United States of America. chapter 74: s.876-883, 1986.
- 6- Guyton A. C.: W. B. Saunders Company, United States of America. chapter 75: s.884-896, 1986.
- 7- Anderson, W.A.D., Thomas, M.S.: Synopsis of Pathology: Endocrine Glands. chapter 20: s.765-829, 1972.
- 8- Jameson, J.L.: Cecil Textbook of Medicine: The Pituitary. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Part XVII 202: s.1205-1221, 1996.

9- Iismaa, T.P., Shine, J.: G protein-coupled receptors. *Current Opinion in Cell Biology.*, 4:195-202, 1992.

10- Spiegel, A.M.: G proteins in cellular control. *Current Opinion in Cell Biology.*, 4:203-211, 1992.

11- Jüppner, H., Abousamra, A.B., Freeman, M., Kong X.F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L.F., Hock, J., Potts, J.T., Kronenberg, H.M., Segre, G.V.: A G protein linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide. *Science.*, 254: 1024-1026, 1991.

12- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: *Molecular Biology of The Cell.* chapter 15: s. 734-735, 1994.

13- Stryer, L.: *Biochemistry: Hormon Action.* W. H. Freeman and Company / New York Chapter 38: s. 975-988 1988.

14- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, T.: Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 60:349-399, 1991.

15- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A.M.: Receptor - effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1031:163-224, 1990.

16- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B.: Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 369:621-628, 1994.

- 17- Osawa, S., Dhanasekaran., Woon, C.W., Johnson, G.L.: Gai-Gas chimeras define the function of α chain domains in control of G protein activation and $\beta\gamma$ subunit complex interactions. *Cell.*, 63: 697-706, 1990.
- 18- Offermans, S., Simon, M.I.: Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surveys* 27: 177-198, 1996.
- 19- Hepler, J.R.: G proteins. *Trends. Biochem. Sci.*, 383-387, 1992.
- 20- Lupas, A.N., Lupas, J.M., Stock, J.B.: Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled coil. *FEBS Lett.*, 11835: 105-108, 1992.
- 21- Dratz E. A., Furstenau, J.E., Lambert, C.G., Thireault, D.L., Rarick, H., Schepers, T., Pakhlevanians, S., Hamm, H.E.: NMR structure of a receptor-bound G-protein peptide. *Nature.*, 363: 276-281, 1993.
- 22- Federman, A.D., Conklin, B.R., Schrader, K.A., Reed, R.R., Bourne, H.R.: Hormonal stimulation adenylyl cyclase through Gi-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature.*, 356:159-161, 1992.
- 23- Clapham, D.E., and Neer, E.J.: New roles for G-protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signalling. *Nature*, 365, 403-406, 1993.
- 24- Gutkind, J.S.: The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.*, 273: 1839-1842, 1998.
- 25- Wittinghofer, A. (1994). The structure of transducin $G_{\alpha t}$: more to view than just ras. *Cell* 76, 201-204

26- Rens-Domiano, S., Hamm, H.E.: Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.* 9:1059-1066, 1995.

27- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., et al.: structure of the guanine-nucleotid-binding domain of the Ha-ras oncogen product p21 in the triphosphate conformation., *Nature* 341:209-214, 1989.

28- Conklin, B.R. and Bourne, H.R.: Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$, receptors and effectors., *Cell* 73: 631-641, 1993.

29- Jurnak, F., Heffron, S., Bergmann, E.: Conformational changes involved in the activation of ras p21 implication for related proteins., *Cell* 60:525-28, 1990.

30- Landis, C.A., Masters, S.B., Spada, A., Pace, A.M., Bourne, H.R., Vallar, L.: GTPase inhibiting mutations activate the α chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumors., *Nature* 340:692-96, 1989.

31- Jurnak, F.: Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science* 230:32-36, 1985.

32- Coleman D. E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Sprang, S.R.: Structure of active conformations of G α_1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 265: 1405-1412, 1994.

- 33- Osawa, S., Dhanasekaran, N., Woon, C.W., And Johnson, G.L.: $G\alpha_i$ $G\alpha_s$ chimeras define the function of α chain domains in control of G protein activation and $\beta\gamma$ subunit complex interaction. *Cell* 63: 697-706, 1990.
- 34- Simon MI, Strathmann MP and Gautam N: Diversity of G proteins in signal transduction *Science* 252 802-808., 1991.
- 35- Noel, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B.: The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with $GTP\gamma S$. *Nature.*, 654-663, 1993.
- 36- Masters, S.B., Stroud, R. M., Bourne, H.R.: Family of G protein α chains: amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Protein Engineering*, 1: 47-54, 1986.
- 37- Iiri, T., Ohoka, 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. *Eur. J. Biochem.* 202: 635-641, 1991.
- 38- Rhee, S.G., and Choi, K.D.: Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.*: 267: 12393-12396.
- 39-Conklin, B.R., Bourne, H.R. Structural elements of G_α subunits that interact with $G_{\beta\gamma}$, receptors, and effectors. *Cell*, 73: 631-641, 1993.
- 40- Berlot, C.H., Bourne, H.R.: Identification of effector-activating residues of G_{sq} . *Cell*, 68:911-922, 1992.

- 41- Itoh, H., Gilman, A.G.: Expression and Analysis of G_{sa} mutants with decreased ability to activate adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 266:16226-16231, 1991.
- 42- Neer E. J. G-proteins: critical points for transmembrane signalling *Prot. Sci.* 3, 3-14, 1994.
- 43- Whiteway, M., Clark, K.L., Leberer, E., Dignard, D., Thomas, D.Y.: Genetic identification of residues involved in association of alpha and beta G protein subunits. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 3223-3229, 1994.
- 44- Neer, E.J., Heterotrimeric G proteins –organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80:249-257, 1995.
- 45- Wilcox, M.D., Dingus, J., Balcueva, E.A.: Bovine brain G_0 isoforms have distinct γ subunit compositions. *J. Biol. Chem.*, 270:4189-4192, 1995.
- 46- Gautam, N., Baetscher, M., Aebersold, R., Simon, M.I.: A G protein gamma subunit shares homology with ras proteins. *Science*, 244:971-974, 1989.
- 47- Wieland, T., Nurnberg, B., Ulibarri, I., Kaldenberg-Stasch, S., Schultz, G., Jakobs, K.H.: Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein β -subunits. *J. Biol. Chem.*, 268: 18111-18118, 1993.
- 48- Raymond, J.R.: Hereditary and acquired defects in signaling through the hormone-receptor- G protein complex. *Amer. Phys. Soc.* 163-174, 1994.

- 49- Saggerson, D.: Thyroid disorders. In: G proteins: Signal transduction and Disease, edited by G. Milligan and M. Wakelam. London: Academic, 157-190, 1992
- 50- Spiegel, A.M., Weinstein, L.S., Shenker, A.: Abnormalities in Gprotein-coupled signal transduction pathways in human disease. J. Clin. Inves., 92: 1119-1125, 1993.
- 51- Shimon, I., Melmed, S.: Genetic basis of endocrine disease. vol.82, 6: 1675-81, 1997.
- 52- Clapham, D.E.: Mutation in G protein-linked receptors: Novel Insights on disease. Cell, 75: 1237-1239, 1993.
- 53- Barlier, A., Pellegrini-Bouiller, I., Caccavelli, L., Gunz, G., Morange-Ramso, I., Jaquet, P., Enjalbert, A.: Abnormal transduction mechanisms in pituitary adenoma. Horm. Res., 47: 227-234, 1997
- 54- Shenker, A.: Challenges of Modern Medicine: GTPase- controlled Molecular Machines.: Mutation in G proteins-coupled signaling pathways as a cause of human disease Ares-Serono Symposia Publication, 1993
- 55- Williamson, E.A., Johnson, S.J., Foster, S., Kendal-Taylor, P., Harris, P.E.: G protein gene mutations in patients with multiple endocrinopathies. J. Clin. Endocr. Metab., 80, 5: 1702-1705, 1995.
- 56- Shenker, A., Weinstein, L.S. ve ark.: Severe endocrine and nonendocrine manifestations of the McCune-Albright syndrome

associated with activating mutations of stimulatory G protein G_s : The Journal of pediatr. vol. 123, 4:509-518, 1993.

57- Weinstein, L.S., Shenker, A., Gejman, P.V., Merino, M.J., Friedman, E., Spiegel, A.M.: Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright Syndrome. N. Engl. J. Med., 325, 24: 1688-1695, 1991.

58- Birnbaumer, L.: Receptor-to-effector coupling through G proteins roles for $\beta\gamma$ dimers as well α subunits. Cell, 71:1069-1072, 1992.

59- Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.: Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β_2 -adrenergic receptor and rhodopsin systems. J. Biol. Chem, 267:8558-8564, 1992.

60- Nathans, J., Davenport, C.M., Maumenee, I.H., Lewis, R.A., Hejtmancik, J.F., Litt, M., Lovrien, E., Weleber, R., Bachynski, B., Zwas, F., Klingaman, R., Fishman, G. Molecular genetics of human blue cone monochromacy. Science, 245: 831-838, 1989

61- Min, K.C., Zvyaga, T.A., Cypess, A.M., Sakmar, T.P. Characterization of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. J Biol. Chem., 268, 13: 9400-9404, 1993.

62- Sung, C.H., Schneider, B.G., Agarwal, N., Papermaster, D.S., Nathans, J., Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8840-8844, 1991.

- 63- Robinson, P. R., Cohen, G.B., Zhukovsky, E.A., Oprian, D.D. Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron*. 9: 719-725, 1992.
- 64- Merendino, J. J., Spiegel, A.M., Crawford, J.D., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J., Lolait, S.J. Brief report: a mutation in the vasopressin V2-receptor gene in a kindred with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *N. Engl. J. Med.* 328:1538-1541, 1993.
- 65- Boltzman, E. J., Harris, H.W., Kolakowski, L.F., GuayWoodford, L.M., Botelho, B., Ausiello, D.A. Brief report: a molecular defect in the vasopressin V2-receptor gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *N. Engl. J. Med.* 328: 1534-1537, 1993.
- 66- Clark, A.J.L., Weber, A., Grossman, A. A point mutation of the ACTH receptor in familial glucocorticoid deficiency. *Pediatr. Res.* 33: 14, 1993.
- 67- Patten, J. L., Johns, D.R., Valle, D., Eil, C., Gruppuso, P.A., Steele, G., Smallwood, P.M., Levine, M.A. Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 322: 1412-1419, 1990.
- 68- Miric, A., Vechio, J.D., Levine, M.A. Heterogeneous mutations in the gene encoding the α -subunit of the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright hereditary osteodystrophy. *J. Clin. Endocrinol and Metab.* 76:1560-1568, 1993.
- 69- Levine, M.A., Spiegel, A.M. Pseudohypoparathyroidism. In *Endocrinology*. DeGroot, L.J., editor. Saunders, W.B.Co., Philadelphia, PA, 1993.

70- Nakamoto, J. M., Jones, E.A., Zimmerman, D., Scott, M.L., Donland, M.A., Van Dop, C. A missense mutation in the G_s -alpha gene is associated with Pseudohypoparathyroidism type I-A and gonadotropin-independent precocious puberty. Clin. Res. 41:40, 1993.

71- Mauras, N., Blizzard, R.M. The McCune-Albright Syndrome. Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh) 279:207-217, 1986.

72- Levis, M.J., Bourne, H.R., Activation of the subunit of G_s in intact cells alters its abundance, rate of degradation, and membrane avidity. J. Cell Biol. 119:1297-1307, 1992.

73- Schwindinger, W.F., Francomano, C.A., Levine, M.A.: Identification of a mutation in the gene encoding the α -subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase in McCune-Albright syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5152-6, 1992.

74- Spiegel, A.M., Shenker, A., Weinstein, L.S.: Receptor-effector coupling by G proteins: implication for normal and abnormal signal transduction. Endocr. Rev., 13: 536-565, 1992

75- Jouneaux, C., Audigier, Y., Goldsmith, P., Pecker, F., Lotersztajn, S.: G_s mediates hormonal inhibition of the calcium pump in liver plasma membranes. J. Biol. Chem., 268:2368-2373, 1993.

76- Wang, H., Watkins, D.C., Malbon, C.C.: Antisense oligodeoxynucleotides to G_s protein α -subunit sequence accelerated differentiation of fibroblasts to adipocytes. Nature, 358: 334-7, 1992.

77- Bomsel, M., Mostov, K.: Role of heterotrimeric G proteins in membrane traffic. *Mol. Biol. Cell*, 3: 1317-28, 1992.

78- Shenker, A., Laue, L., Kosugi, S., Merendino, J.J., Jr., Minegishi, T., Cutler, G.B., Jr.: Aconstitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature*, 365: 652-654, 1993.

79- Chen, J., Iyenger, R.: Suppression of Ras-induced transformation of NIH 3T3 cells by activated G_{α_s} . *Science*, 263:1278-81, 1994.

80- Pouyssegur, J., Seuwen, K.: Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu. Rev. Physiol.*, 54: 195-210, 1992.

81- Dumont J. E., Jauniaux, J.C., Roger, P.P.: The cAMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends in Biochem. Sci.*, 14:67-71, 1989.

82- Vallar, L., Spada, A., Giannattasio, G.: Altered G_s and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature*, 330:566-568, 1987.

83-Clementi, E., Malgaretti, N., Meldolesi, J., Taramelli, R.: Anew costitutively activating mutation of the G_s protein α subunit-gsp oncogene is found in human pituitary tumors *Oncogene* 5: 1059-1061, 1990.

84- Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G.: Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. 249:655-659, 1990.

85- Williamson, E.A., Daniels, M., Foster, S., Kelly, W.F., Kendall-Taylor, P., Harris, P.E.: $G_{s\alpha}$ and $G_{12\alpha}$ mutations in clinically non-functioning pituitary tumors. Clin. Endocri., 41: 815-820, 1994.

86- Harris, P.E.: G_s protein mutations and the pathogenesis and function of pituitary tumors. Metabolism, vol. 45, 8:120-122, 1996.

87- Bertherat, J., Chanson, P., Montminy, M.: The cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate-responsive factor: CREB is constitutively activated in human somatotroph adenoma. Mol. Endocrinol., 9: 777-783, 1995.

88- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S.: Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G protein $\beta\gamma$ subunits. Nature, 369: 418-420, 1994

89-Van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K.: Receptor-tyrosine-kinase- and $G_{\beta\gamma}$ mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. Nature, 376: 781-784, 1995.

90- Vallar L. Oncogenic role of heterotrimeric G proteins in Cancer Surveys.Vol 27, Parker PJ, Pawson T, Tooze J eds. CSHL Press New York , 1996 p.325-338.

91- Sager, R.: Tumor supressor genes in the cell cycle. Current Opinion in Cell Biology, 4: 155-160, 1992.

92- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C.: P53 mutations in human cancers. Science, 253: 49-53, 1991.

93- Asa, S.L., Somers, K., Ezzat, S.: The MEN-1 gene is rarely Down-regulaed in pituitary adenoma. *J. Clin. Endocr. Metab.* vol. 83, 9: 3210-3212, 1998

94- Harris, P.E., Alexander, J.M., Bikkal, H.A., Hsu, D.W., Hedley-Whyte, E.T., Klibanski, A.: Glycoprotein hormone α -subunit production in somatotroph adenoma with and without Gs α mutations. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 75: 918-23, 1992

95- Hosoi, E., Yokogoshi, Y., Hosoi, E., Horie, H., Sano, T., Yamada, S.: Analysis of the Gs α gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polymerase chain reaction-direct sequencing method using paraffin-embeded tissues. *Acta Endocr.* ,129: 301-6, 1993.

96- Yoshimoto, K., Iwahana, H., Fukuda, A., Sano, T., Itakura, M., Rare mutation of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. *Cancer*, 72: 1386-93, 1993

97- Adems, E.F., Brockmeier, S., Friedmann, E., Roth, M., Buchfelder, M., Fahlbusch, R.: Clinical and biochemical characteristics of acromegalic patients harboring gsp-positive and gsp-negative pituitary tumors. *Neurosurgery*, 33: 198-203, 1993

98- Yang, I., Park, S., Ryu, M., Woo, J., Kim, S., Kim, J., Kim, Y., Choi, Y.: Characteristics of gsp-positive growth hormon-secreting pituitary tumors in korean acromegalic patients. *Eur. J. of Endocr.*, 134, 720-6, 1996.

7. BİYOGRAFİ

Adı Soyadı : Tammam SİPAHİ
Doğum Yeri ve Tarihi : Douma 08/08/1963
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
Adresi : Fetih Mahallesi, Kenanpaşa Sok. No: 9 Daire 6
Üsküdar- İSTANBUL.

Eğitim Durumu ve Ünvanları :

1976-1982 Douma Lisesi
1985-1991 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Fizik Mühendisliği
Bölümü.
1991-1993 Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek
Lisans.
1993- Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora

Üzerinde Çalıştığı Konular:

1989-1990 Ultrasonik Test
1991-1993 G Proteinlerinin Çeşitli Dokulardaki Dağılımı.
1994-1996 Türk Hastalardan Elde Edilen Mycobacterium
Tuberculosis Suşlarının Southern Blot Hibridizasyon ile Karakterizasyonu.
1995-1996 Normal ve Anormal Koşullarda Lenfositlerde G
Protein Ekspresyonunun İncelenmesi
1996- Hipofiz Tümörlerinde Gsp Mutasyonları

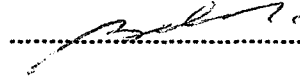
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Doktora öğrencisi Tammam SİPAHİ'nin çalışması jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Doktora tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Beki KAN

Üniversitesi : Marmara



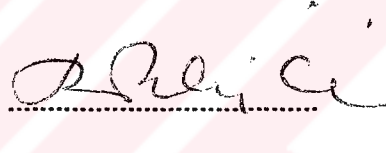
Üye : Prof.Dr.Nejat DALAY 4.

Üniversitesi : İstanbul
Doç. Dr. N. N. S. S.



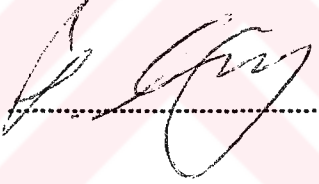
Üye : Prof.Dr.Fahir ÖZER

Üniversitesi : Koç Vakfı Amerikan Hastanesi



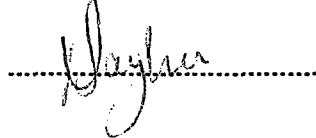
Üye : Yrd.Doç.Dr.İlter GÜNEY

Üniversitesi : Marmara



Üye : Yrd.Doç.Dr.Nur SAYHAN

Üniversitesi : İstanbul



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 15/02/1999 tarih ve 9... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü