



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLECEK ÇÖZÜNÜR HALDE
GLUKAGON RESEPTÖR PROTEİNİNİN GLUKAGONA OLAN
İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞULE İBİŞOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kadir Turan

2015-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLECEK ÇÖZÜNÜR HALDE
GLUKAGON RESEPTÖR PROTEİNİNİN GLUKAGONA OLAN
İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞULE İBİŞOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kadir Turan

2015-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : **Yüksek Lisans**
Anabilim Dalı : **Biyokimya (ECZ)**
Tez Sahibi : **Şule İBİŞOĞLU**
Tez Başlığı : **Rekombinant Olarak Üretilcek Çözünür Halde Glukagon Reseptör Proteininin Glukagona Olan İlgisinin Araştırılması**
Sınav Yeri : **Eczacılık Fakültesi – Biyokimya Anabilim Dalı**
Sınav Tarihi : **01.06.2015**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Kadir TURAN

Kurumu

M.Ü., Eczacılık Fakültesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Derya ÖZSAVCI

M.Ü., Eczacılık Fakültesi

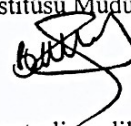
Doç. Dr. Pınar ATA

M.Ü. Tıp Fakültesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03.06.2015 tarih ve 39 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bedra Kaymakçıoğlu U.
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şule İBİŞOĞLU

I. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana bir eğitmenin önderlik vasfı ile ekip ruhunu harmanlayarak, ‘biz’ diyebildiğini her seferinde gösteren ve bu doğrultuda bana katkılarından dolayı başta sayın Prof. Dr. Kadir Turan hocama yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fikriye URAS başta olmak üzere Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, her biri benim için rol model olmuş sevgili ailem; başta annem Hatice İBİŞOĞLU ve babam Cemal İBİŞOĞLU’na bana kendimi her zaman şanslı hissettiren ablalarım, Zeynep KEFELİ ve Serap İBİŞOĞLU’na teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım. Ailem kadar yakın olmuş sevgili dostlarım; Nilay KAÇAR’a, Sinem ÜLÜŞ’e, Merve AKARLI ve Ayçin ERDENAY’a hep yanımda oldukları, özellikle tez çalışmamın psikolojik ayağında desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca yardımları dokunan bölüm arkadaşlarım Ayşegül PİRİNÇAL ve Elif ÇAĞLAYAN’a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeği olan herkese can-ı gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Şule İBİŞOĞLU

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Konu/No: Rekombinant Olarak Üretilen Çözünür Halde Glukagon Reseptör Proteininin Glukagona Olan İlgisinin Araştırılması / SAG-C-YLP-131113-0426, 2014) ve TÜBİTAK (Konu/No: İnfluenza Virüs Patogeneğinde Viral RNA Polimeraz Enzimi ve Konak Hücre Proteinlerinin Rolünün Araştırılması / 112S518) tarafından desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	iii
II. İÇİNDEKİLER	iv
III. KISALTMALAR	x
IV. ŞEKİL ve TABLOLARIN LİSTESİ	xii
i. Şekil Listesi.....	xii
ii. Tablo Listesi.....	xiv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Glukoz Metabolizmasının Regülasyonu ve Hormonlar	8
4.1.1. Glukagon ve glukagon benzeri peptidler (GLP-1 ve GLP-2)	12
4.1.2. GLP-1 ve GLP-2	18
4.1.3. İnsülin.....	20
4.1.4. Glukoz metabolizması ile ilgili diğer hormonlar	23
4.2. Glukagon Reseptör Antagonistleri	23
4.2.1. Peptid antagonistler	24
4.2.2. Peptid yapıda olmayan glukagon reseptör antagonistleri.....	24
4.2.3. Glukagon-glukagon reseptör etkileşimini bloke eden monoklonal antikorlar	25
4.3. Glukagon Reseptörü	25
4.3.1. Glukagon reseptörünün uyarılması ve sinyal iletim mekanizması	27
4.3.2. Hücrelerde glukagon reseptör ekspresyonunun düzenlenmesi	29
4.3.3. Glukagon reseptör endositozu ve fosforilasyonu	30
5. GEREÇ ve YÖNTEM	33
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
5.2. Enzimler	35

5.3.	Ticari Kitler	35
5.4.	Antikorlar	35
5.5.	Cihaz ve Gereçler	36
5.6.	Besiyerleri	37
5.6.1.	Luria Bertani (LB) besiyeri	37
5.6.2.	Luria Bertani agar (LBA) besiyeri	37
5.6.3.	Memeli hücre kültürleri için besiyerleri.....	37
5.7.	Çözeltiler	38
5.7.1.	Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid –a/h).....	38
5.7.2.	Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (% 10 – a/h)	38
5.7.3.	Bloklama çözeltisi (%5’lik yağsız süt tozu).....	38
5.7.4.	Etidyum bromür (10 mg/ml)	38
5.7.5.	%70 Etil alkol.....	38
5.7.6.	Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)	38
5.7.7.	Fenol : Kloroform : İzomil alkol (25:24:1)	39
5.7.8.	1x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)	39
5.7.9.	Glukoz çözeltisi (1M)	39
5.7.10.	Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)	39
5.7.11.	Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M).....	40
5.7.12.	Kapatma çözeltisi	40
5.7.13.	Mangan klorür çözeltisi (0.55M)	40
5.7.14.	%10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi	40
5.7.15.	Paraformaldehit çözeltisi (%3).....	40
5.7.16.	PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1M).....	40
5.7.17.	Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 –a/h).....	41
5.7.18.	Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)	41
5.7.19.	Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml)	41
5.7.20.	Potasyum asetat çözeltisi (3 M)	41
5.7.21.	Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M).....	41
5.7.22.	Sodyum bikarbonat çözeltisi (%7.5).....	41
5.7.23.	%10 Sodyum deoksikolat.....	41

5.7.24.	Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h).....	42
5.7.25.	Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)	42
5.7.26.	Sodyum klorür çözeltisi (2.5 M)	42
5.7.27.	%0.25 Tripsin çözeltisi.....	42
5.7.28.	Tripsin-EDTA çözeltisi (%0.05 Tripsin, %0.05 EDTA –a/h)	42
5.7.29.	% 10 Tween-20 (a/h).....	42
5.7.30.	%0.1 Gümüş nitrat çözeltisi (a/h).....	42
5.7.31.	Görüntüleme çözeltisi (%0.04 formaldehit, %2 sodyum karbonat, %0.0004 sodyum tiyosülfat)	43
5.7.32.	Metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi (%50 metanol, %10 glasiyel asetik asit).....	43
5.8.	Tamponlar	43
5.8.1.	5x Konsantre anod tamponu (0.1M Tris-Cl, pH:8.9).....	43
5.8.2.	4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8).....	43
5.8.3.	Bakteri transformasyon tamponu	43
5.8.4.	DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glukoz, 10 mM EDTA pH:8.0)	44
5.8.5.	DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS)	44
5.8.6.	DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum: 5 M Asetat).....	44
5.8.7.	6x Konsantre DNA yükleme tamponu.....	44
5.8.8.	Hücre liziz tamponu	44
5.8.9.	1x Konsantre katod tamponu (0.1M tris, 0.1M tricine, 0.1M SDS, pH:8.25).....	44
5.8.10.	10x Konsantre MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonik Asit] tamponu	45
5.8.11.	2x Konsantre NP-40 liziz tamponu	45
5.8.12.	4x Konsantre paketlenme jeli tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8).....	45
5.8.13.	Poliakrilamid jel elektroforez tamponu (0.025 M Tris, 0.25 M Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3).....	45
5.8.14.	Protein transfer tamponu	45

5.8.15. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; %8 SDS – a/h; %0.2 Bromofenol mavisi – a/h; %4 2-Merkaptoetanol – h/h; %40 Gliserin – h/h; pH:6.8).....	46
5.8.16. 2x Konsantre RIFA tamponu (50 mM Tris, pH:8 ; 5 mM EDTA, pH:8 ; 150 mM NaCl; %1 NP-40 a/h ; %0.5 Sodyum deoksikolat a/h, %10 SDS a/h).....	46
5.8.17. Sodyum asetat tamponu (3M)	46
5.8.18. 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu.....	46
5.8.19. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0)	46
5.8.20. Tris/ EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0)....	47
5.8.21. 5x Konsantre Tris-Glisin tamponu (0.125 M Tris, 1.25 M Glisin, pH:8.3).....	47
5.8.22. 20x Konsantre TBS tamponu	47
5.8.23. TBS ve TBS-T tamponu	47
5.9. Plazmit Vektörler	47
5.10. <i>Escherichia coli</i>	48
5.11. Memeli Hücre Hatları.....	48
5.12. Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektrophorez	48
5.13. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi.....	49
5.14. Transformasyon için <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi	49
5.15. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması	50
5.16. İnsan Glukagon Reseptör Geni cDNA'sının Hazırlanması.....	50
5.16.1. Hep G2 hücrelerinden total RNA'nın izole edilmesi.....	50
5.16.2. Formaldehit içeren agaroz jellerin hazırlanması ve elektrophorez.....	51
5.16.3. İnsan glukagon reseptör geni (GCGR) cDNA'sının hazırlanması ve cDNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması	51
5.16.4. PZR ile çoğaltılan GCGR Δ sp ve GCGR-ED DNA fragmentlerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve saflaştırılması	53
5.17. İnsan Glukagon Geni (GCG) cDNA'sının Hazırlanması ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması.....	54
5.17.1. İnsan GCG geni cDNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması.....	55
5.17.2. PZR ile çoğaltılan GCG cDNA'ların saflaştırılması.....	56

5.18. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	56
5.18.1. pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED vektörlerinin oluşturulması.....	56
5.18.2. pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED vektörlerinin oluşturulması .	59
5.18.3. pCAGGS-GCGflag vektörünün oluşturulması	59
5.18.4. pCAGGS-GST-GCG vektörünün oluşturulması	60
5.18.5. Plazmit DNA'larının PEG/NaCl ile saflaştırılması ve dizi analizleri..	61
5.19. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması.....	61
5.20. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu	62
5.21. Plazmit Vektörler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinde GCGR ve GCG Gen Ekspresyonlarının Western Melezleme Yöntemi İle Kontrolü	63
5.21.1. Plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatlarının hazırlanması	63
5.21.2. SDS/PAGE için poliakrilamid jellerin hazırlanması.....	64
5.21.3. Tris-Tricine/PAGE için poliakrilamid jellerin hazırlanması.....	64
5.21.4. Proteinlerin akrilamid jellerde yürütülmesi ve nitroselüloz membrana transfer edilmesi.....	65
5.21.5. Membran üzerinde rekombinant proteinlerin görüntülenmesi.....	65
5.21.6. Poliakrilamid jellerin gümüş boyama yöntemi boyanması	66
5.22. Ekspresyon Vektörleri Üzerinden Kodlanan Glukagon Reseptörü ve Glukagon Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmüno Floresans Yöntemle İncelenmesi	67
5.23. Glukagon ve Glukagon Reseptör Proteinleri Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması.....	68
5.23.1. GST ile çöktürme yöntemi	68
5.23.2. Birlikte immün çöktürme	69
6. BULGULAR.....	70
6.1. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Bulgular	70
6.1.1. İnsan Orijinli Hücrelerden Total RNA elde edilmesi ile ilgili veriler .	70
6.1.2. İnsan GCGR proteini kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması ile ilgili veriler	71
6.1.3. İnsan GCG peptidi kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması ile ilgili veriler.....	79

6.1.4.	Plazmit vektörlere klonlanan <i>GCGR</i> ve <i>GCG</i> genlerinin ekspresyonlarının western melezleme yöntemi ile analizi	83
6.1.5.	Ekspresyon vektörleri üzerinden kodlanan proteinlerin immünfloresans yöntemle görüntülenmesine ilişkin veriler	85
6.2.	<i>GCGR</i> ve <i>GCG</i> Proteinleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması ile İlgili Bulgular	87
6.2.1.	<i>GST</i> ile çöktürme testleriyle elde edilen sonuçlar	87
6.2.2.	Birlikte immün çöktürme testleriyle elde edilen sonuçlar	89
6.3.	Ticari Rekombinant <i>GCG</i> Peptidinin Elektroforetik Analizi ile İlgili Bulgular	91
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	92
8.	KAYNAKLAR	100
9.	ÖZGEÇMİŞ	114

III. KISALTMALAR

a/h	Ağırlık/hacim
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
APS	Amonyum persülfat
cAMP	Siklik-AMP
D'MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPP-IV	Dipeptidil-peptidaz IV
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
FCS	Fetal buzağı serumu
FITC	Floresan izosiyanat
GCG	İnsan glukagon geni
GCGR	İnsan glukagon reseptör geni
GCGR-ED	İnsan glukagon reseptör geninin hücre dışındaki bölgesi
GCGRΔsp	Sinyal dizisi kodlamayan insan glukagon reseptör geni
GLP1	Glukagon benzeri peptid 1
GLP2	Glukagon benzeri peptid 2
h/h	Hacim/hacim
HA	Hemaglutinin
HEK293	İnsan embrionik böbrek hücreleri
IGF	İnsülin benzeri büyüme hormonu
kD	Kilo dalton
LB	Luria bertani
LBA	Luria bertani agar
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonik asit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi

PANC-1	İnsan pankreas kanser hücreleri
PEG	Polietilenglikol
PEI	Polietilenimin
PIPES	1,4-piperazindietansülfonik asit
PK	Prohormon konvertaz
PKA	Protein kinaz A
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
T-FTS	Tamponlanmış fizyolojik tuzlu su
UV	Ultraviyole

IV. ŞEKİL ve TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1. Plazma glukoz kullanımı ve regülasyonunda rol alan organlar.....	8
Şekil 2. Karaciğer hücrelerinde glikojen sentezi (glikojenez-glikoneojenez) ve yıkımı (glikojenoliz).....	10
Şekil 3. Plazma glukoz düzeyinin kontrolünde rolü olan organ ve dokuların fonksiyonları.....	12
Şekil 4. GCG geninin genom lokalizasyonu ve ekson-intron yapıları.....	13
Şekil 5. Farklı organlarda proglukagonun glukagon ve glukagon benzeri peptidlere (GLP-1 ve GLP-2) dönüştürülmesi.....	14
Şekil 6. Glukagonun endozomal yıkımı ve glukagon reseptörü endositoz döngüsü ..	18
Şekil 7. İnsan proinsülin (A) ve insülin (B) yapısı.....	21
Şekil 8. İnsan GCGR geninin genom lokalizasyonu ve ekson-intron yapıları.....	26
Şekil 9. Memeli organizmalara ait glukagon reseptör proteinlerinin şematik yapısı ..	27
Şekil 10. Glukagon hormonunun glukagon reseptörün eksternal bölgesine bağlanması sonucu hücre içerisinde gerçekleşen reaksiyonlar.....	28
Şekil 11. HepG2 ve PANC-1 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın formaldehit jel elektroforezi ile analizi.....	71
Şekil 13. Hep G2 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılan GCGR Δ sp ve GCGR-ED DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi.....	73
Şekil 14. İnsan glukagon reseptör geni fragmentleri taşıyan pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörleri.....	74
Şekil 15. pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi.....	75
Şekil 16. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GCGR Δ sp (A) ve pCAGGS-GCGR-ED (B) DNA fragmentlerinin dizi analizi kromatogramları.....	76
Şekil 17. EcoRI restriksiyon endonükleazları ile kesilen pCAGGS-GCGR Δ sp (1) ve pCAGGS-GCGR-ED (2) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntüsü..	77

Şekil 18. İnsan glukagon reseptör geni fragmentleri taşıyan pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmit vektörleri.....	78
Şekil 19. BstXI restriksiyon endonükleazı ile kesilen PCHA-GCGR Δ sp ve PCHA-GCGR-ED plazmit vektörlerinin agaroz jel görüntüleri.....	78
Şekil 20. GCG cDNA'sının PZR ile çoğaltılması	80
Şekil 21. GST-GCG fragmenti taşıyan pCAGGS-GST-GCG plazmit vektörü.....	80
Şekil 22. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GST-GCG DNA fragmentlerinin dizi analizi kromatogramı	81
Şekil 23. GCGflag fragmentini taşıyan pCAGGS-GCGflag plazmit vektörü.....	82
Şekil 24. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GCGflag DNA fragmentlerinin dizi analizi kromatogramı	82
Şekil 25. pCAGGS ve pCHA plazmit vektörleri üzerinden kodlanan GCGR proteinlerinin Western melezleme ile analiz edilmesi..	83
Şekil 26. pCAGGS-GST-GCG plazmit vektörü üzerinden kodlanan proteinlerin Western melezleme ile analiz edilmesi.....	84
Şekil 27. pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmit vektörleri üzerinden kodlanan HA uzantılı GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinlerinin HeLa hücrelerindeki lokalizasyonu.....	86
Şekil 28. HeLa hücrelerinde sentez edilen GCGflag ve GST-GCG proteinlerinin immünfloresans yöntemle işaretlenmesi.....	87
Şekil 29. GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinleri ile GCG arasındaki olası fiziksel etkileşimin GST ile çöktürme yöntemi ile analiz edilmesi	88
Şekil 30. pCAGGS-GCGflag plazmiti, GCGR Δ sp ya da GCGR-ED kodlayan plazmit ile birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edilmesi.....	90
Şekil 31. Ticari GCG peptidlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi.....	91

ii. Tablo Listesi

Tablo 1. İnsan GCGR geni cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında ve bu genin DNA dizi analizlerinde kullanılan oligonükleotid primerler52

Tablo 2. İnsan GCG geni cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında ve bu genin memeli ekspresyon vektörüne klonlanmasında kullanılan oligonükleotid primerler55

Tablo 3. Jellerin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları.....64

Tablo 4. Jellerin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları.....65

1. ÖZET

Rekombinant Olarak Üretilen Çözünür Halde Glukagon Reseptör Proteininin Glukagona Olan İlgisinin Araştırılması

Öğrencinin Adı : Şule İbişoğlu
Danışmanı : Prof. Dr. Kadir Turan
Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı

Amaç: Glukagon reseptörü, G-proteini ile eşleşmiş reseptörler ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Glukagon tarafından aktive olan bu reseptör kan glukoz düzeyinin belirli değerler arasında korunmasında büyük önem taşır. Vücutta normal değerlerin üzerinde sentez edilen glukagonun yol açacağı anormalliklerin tedavisinde kullanılabilecek glukagon reseptör antagonistleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında da membrana bağlı olmayan, fakat glukagonu bağlayabilecek glukagon reseptör proteininin üretilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: İnsan glukagon reseptör geninin, sinyal peptidi kodlamayan ve sadece hücre dışı bölgesini kodlayan bölgeleri, HEPG2 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılarak pCAGGS ve pCHA plazmitlerine klonlandı. Benzer şekilde glukagon peptidini kodlayan cDNA Panc1 hücrelerinden RT-PZR tekniği ile çoğaltılarak, pCAGGS-GST ve pCAGGS-Flag vektörlerine klonlandı. Klonlanan cDNA'lar DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. Rekombinant plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinin glukagon ve glukagon reseptör proteinlerini sentez edilip edilmediği Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Rekombinant proteinlerin hücre içi lokalizasyonları, immünfluoresan boyama teknikleri ile saptandı. HEK293 hücrelerinde aynı anda sentez edilen GCGR Δ sp ya da GCGR-ED proteinleri ile glukagon arasındaki olası etkileşim GST ile çöktürme ve birlikte immün çöktürme teknikleri ile değerlendirildi.

Bulgular ve Sonuç: Elde edilen veriler, GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinlerinin hücrelerde sitoplazmada lokalize olduğunu ortaya koydu. GST ile çöktürme deneyleri, GCGR-ED proteininin glukagon peptidinden bağımsız olarak çökeldiğini gösterdi. Birlikte immün çöktürme deneylerinde, glukagon peptidinin düşük molekül ağırlıkta olmasına bağlı olarak Western melezleme deneylerinde karşılaşılan zorluklar nedeniyle istenilen sonuç alınamadı. Bu nedenle, sitoplazmik glukagon reseptör proteinleri ile glukagon arasındaki olası fiziksel etkileşimi ortaya koymaya yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glukagon Reseptörü, Glukagon, Diyabet, Antagonis

2. SUMMARY

Investigation of the affinity of recombinant soluble form of human glucagon receptor protein to glucagon

Student's name : Şule İbişoğlu
Supervisor : Prof. Dr. Kadir Turan
Department : Department of Biochemistry

Aim: Glucagon receptor is classified within the G-protein coupled receptors family. The receptor activated by glucagon has a vital importance for maintaining of blood glucose level in the normal values. There are extensive studies on glucagon receptor antagonists that can be used for treatment of abnormalities caused by the hyperglucagonemia. In this study, it was aimed to produce the non-membranous glucagon receptor proteins that capable of binding to glucagon.

Material and Methods: Human glucagon receptor gene cDNA without leader sequence and a part of gene encoding extracellular domain of receptor protein were prepared from HEPG2 cells with RT-PCR and cloned into pCAGGS and pCHA plasmids. Similarly, the cDNA encoding glucagon peptide was amplified with RT-PCR from Panc1 cells, and cloned into pCAGGS-GST and pCAGGS-Flag vectors. Cloned cDNAs were verified by DNA sequencing. The synthesis of glucagon and glucagon receptor protein in HEK293 cells transfected with plasmids were analyzed by Western blotting. Intracellular localization of recombinant proteins were detected by immunofluorescent techniques. The possible interactions between glucagon and GCGR Δ sp or GCGR-ED proteins were evaluated by co-immunoprecipitation and GST pull down assay.

Results and Discussion: The results showed that GCGR Δ sp and GCGR-ED are localized in cytoplasm of the cells. GCGR-ED was independently precipitated from glucagon with GST pull down assay. It could not get the desired results with co-immunoprecipitation experiments because of the low molecular weight of glucagon and stringency faced in Western blotting. Therefore, the studies to reveal possible interaction between cytoplasmic glucagon receptor proteins and glucagon is going on.

Keywords: Glucagon Receptor, Glucagon, Diabetes, Glucagon Antagonist

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Glukagon, proglukagon üzerinde sentez edilen 29 amino asit bakiyesinden oluşan bir peptid hormondur. Bu hormonun keşfi 1920'li yıllara kadar uzanır. Kimball ve Murlin 1923 yılında (Kimball, 1923) pankreastan hazırladıkları özütte hiperglisemiye neden olan maddelerin varlığını saptamış ve bu maddeye glukagon adını vermişlerdir. Fakat bu molekülün fizyolojik rolü ve önemi ancak 1970'li yıllarda anlaşılabilmiştir. İnsan glukagon hormonu 1971 yılında izole edilerek kristalleştirilmiştir (Sundby and Markussen, 1971). Günümüzde glukagonun serum glukoz düzeyinin regülasyonunda çok büyük önem taşıdığı bilinmektedir.

Vücudumuzda sentez edilen birçok enzim ve hormonda olduğu gibi glukagon da inaktif polipeptid halinde sentez edilir, daha sonra proteolitik kesimler sonucunda aktif forma dönüştürülür. Glukagonun da öncül maddesi olan proglukagon başta pankreas olmak üzere beyin ve bağırsak gibi çeşitli dokularda sentez edilir ve proteolitik kesimler sonucunda dokuya özgü bir şekilde farklı peptid hormonlara dönüştürülür. Örneğin bağırsakta L hücrelerinde subtilizin benzeri proprotein konvertazlar (PK1-3) tarafından glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve peptid-2 (GLP-2)'ye işlenir (Rouille ark. , 1997b). Pankreas hücrelerinde ise PK2 enzimi tarafından aktif glukagon peptidine dönüştürülür (Furuta ark. , 2001, Rouille ark. , 1997a, Rouille ark. , 1994).

Glukagon ile aynı öncül polipeptid üzerinden sentez edilen glukagon benzeri peptidler de vücutta önemli işlevlere sahiptirler. Bu peptidlerden GLP-1 30 amino asitten oluşan bir hormondur. GLP-1 pankreas alfa hücreleri, bağırsak L hücreleri ve santral sinir sistemi hücrelerinde üretilerek salınmaktadır. GLP-1 pankreasta adacık hücrelerine etki ederek insülin sekresyonunu artırır, beta hücre proliferasyonu ve yenilenmesini sağlar. Buna karşın, glukagon sekresyonunu da inhibe eder (Drucker, 2001, Fehmann and Habener, 1992). GLP-2 ise bağırsaklarda epitelyal büyümeyi sağlar. GLP-2'nin kemik rezorpsiyonunu inhibe edici etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Güçlü ark. , 2007)

Glukagon sekresyonu kan glukoz seviyesi ile ayarlanır. Kan serumunda glukoz seviyesi düştüğü zaman glukagon salımı gerçekleşir. Glukagonun temel fizyolojik rolü karaciğerde glukoneojenezi ve glukojenolizi uyararak glukoz üretimini

arttırmasıdır. Buna karşın hiperglisemi durumunda glukagon salımı inhibe olur. Genellikle insüline antagonist etki göstermektedir. Bu iki hormonun birbirine karşı oranı kan glukoz seviyesini düzenler (Unger, 1985). Glukagon eş zamanlı olarak glikoliz ve glikojen sentezini inhibe eder (Unger and Orci, 1977).

Glukagon etkisini hedef hücrelerde plazma membranında yer alan glukagon reseptörü aracılığıyla gösterir. Glukagon reseptörü ekstraselüler bölgesine glukagonun bağlanması, molekülün konformasyonel yapısında değişikliğe neden olur. Bu konformasyonel değişim, reseptörle eşleşmiş G proteinlerini aktive eder. En az iki farklı G-protein sınıfının glukagon sinyal iletimi ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bunlardan G_{α} 'nın aktivasyonu, cAMP düzeyinin artmasını sağlayan adenilat siklazı aktifleştirir. Hücre içi cAMP düzeyindeki artış ise protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder. Gq proteinlerinin aktivasyonu ise fosfolipaz C aktivasyonuna, buna bağlı olarak inositol 1,4,5-trifosfat üretimine ve hücre içi kalsiyum serbestleşmesine yol açar (Burcelin ark. , 1996, Christophe, 1995). G_{α} sinyal yolağında aktive olan PKA glikojen fosforilaz kinaz enzimini fosforile eder. Aktif glikojen fosforilaz kinaz, glikojen yıkımını sağlayan glikojen fosforilaz enzimine fosfat ekleyerek aktif hale dönüştürür. Glikojen yıkımı ile oluşan glukoz-6-fosfat, glukoz-6-fosfataz enzimi ile glukozla dönüştürülerek karaciğer hücrelerinden (hepatositler) glukoz serbestleşmesini sağlar (Johnson ark. , 1997, Krebs, 1981).

Hormonların sinyal iletiminde işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için, hedef hücreler de bağlandıkları reseptörler de büyük bir önem taşır. Glukagon hormonunun bağlandığı glukagon reseptörü yedi transmembran bölgesi taşıyan bir membran proteindir (Christophe, 1995, Martin, 1981). Bu protein farklı memeli türlerinde önemli ölçüde korunmuştur. İnsan glukagon reseptörü 477 amino asit bakiyesinden, fare ve sıçan glukagon reseptörleri ise 485 amino asit bakiyesinden oluşmaktadır. İnsan ve fare glukagon reseptörleri % 80 oranında identik yapı gösterir. Bu oran sıçanlarda % 93'tür (Lok ark. , 1994).

Kan glukoz düzeyinin regüle edilmesinde glukagon miktarı kadar glukagon/glukagon reseptörü arasındaki ilişki de büyük önem taşımaktadır. Değişik etkenler ligant/reseptör bağlanmasını etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, insanda glukagon reseptöründe Asp63, Arg116 ve Lys98 amino asit bakiyelerinin reseptörün

amino-terminal bölgesinin yapısı ve/veya ligand bağlanmasında önemli olduğunu göstermiştir (Prevost ark. , 2010). Karboksi-terminal bölgesi ligand bağlanması, cAMP sentezi veya kalsiyum salımında önemli olmamakla beraber hücre yüzey ekspresyonunun uygunluğu için gerekli ve bu domainin fosforilasyonu glukagonla stimüle edilmiş reseptörün endositozu için zorunludur (Cho ark. , 2012). Glukagon reseptör grubu içerisinde, sekretin, GLP-1, vazoaaktif intestinal peptid (VIP) ve büyüme hormonu salım faktörü reseptörleri de yer alır. Bu reseptörler de hormon/reseptör etkileşimiyle ilgili olduğu düşünülen kısmen büyük ekstraselüler bölgeye sahiptirler (Unson ark. , 1996).

Glukagon düzeyi ve glukagon/glukagon reseptörü etkileşiminden kaynaklanan kan şekeri düzensizliklerini ortadan kaldırmak amacıyla değişik yaklaşımlar ortaya konmaktadır. Glukagonun aktivitesini inhibe etmek için; peptid antagonistler (Unson ark. , 1987), peptid olmayan oral yoldan aktif olan antagonistler (Madsen ark. , 1998) ve glukagon ya da glukagon reseptörüne karşı monoklonal antikolarlar (Brand ark. , 1994) denenmektedir. Glukagonun amino-terminalinde yer alan ilk amino asit bakiyesi (His¹), agonistik aktivite için kritik öneme sahiptir (Unson ark. , 1993). 1972'de sadece His¹'den yoksun des-His-glukagon'un in vitro ortamda glukagon reseptörünün antagonisti olduğu bulunmuştur (Goldfine ark. , 1972). Glukagon reseptörü antagonisti olarak His¹ ve Arg¹²'nin modifiye edilmesiyle çeşitli modifiye glukagon analogları ([1-N α -trinitrofenilhistidin, 12-homoarginin]-glukagon) (THG), tanımlanmıştır (Bregman ark. , 1980).

Terapötik monoklonal antikolar, kanser ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde geniş çaplı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, glukagon veya glukagon reseptörüne karşı nötralize edici antikoların aşırı glukagon etkilerini azaltacağı ileri sürülmektedir. Glukagon monoklonal antikolarlarının sıçanlarda glukagonun hiperglisemik etkisini ortadan kaldırdığı ve streptozotosin tedavisinde olan diyabetik sıçanlarda insülinin olduğu durumlarda dahi yemek sonrası kan glukoz düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (Cho, Merchant, 2012).

Glukagon reseptörünün özellikle ekstraselüler amino-terminal bölgesinin membrana bağlı olmaksızın işlevini koruyabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada rekombinant DNA tekniklerinden yararlanarak, membrana bağlı olmayan,

fakat glukagonu bağlayabilecek protein üretmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, protein trafiği ve protein lokalizasyonunda rol alan sinyal peptidini kodlamayan insan glukagon reseptör geni ve glukagon reseptör proteininin sadece hücre dışı (eksternal) bölümünü kodlayan gen bölgesi, HepG2 hücrelerinden hazırlanan cDNA üzerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak memeli ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. Klonlanan genler üzerinden sentez edilen rekombinant proteinlerin, glukagon hormonuna olan afinitesi araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

Vücudumuzda lipidler enerji deposu olarak işlev görürken, glukoz temel enerji kaynağı olarak kullanılır. Glukoz bağırsak ya da karaciğer hücrelerinden kan yoluyla diğer vücut hücrelerine ulaştırılır. İnsanlarda açlık kan glukoz düzeyi ortalama 70-120 mg/dL'dir (American Diabetes, 2014). Beslenmeye bağlı olarak gün içerisinde glukoz düzeyinde dalgalanmalar olur. Buna karşın kan glukoz düzeyinin belirli değerler arasında korunması hayati önem taşır. Özellikle beyin hücreleri kan glukoz düzeyinden en fazla etkilenen hücrelerdir. İnsan beyni, ortalama vücut ağırlığının % 2'sini oluşturmakla birlikte, kullandığı total glukoz miktarı vücudun kullandığı glukozun ortalama % 25'i kadardır. Öte yandan beyin glukoz sentez edemez ve glikojen halinde depolayamazlar (Tunalı, 1983). Dolayısıyla hem beyin hücreleri hem de diğer organlarımız bakımından kan glukoz düzeyi belirli değerler arasında korunmak zorundadır.

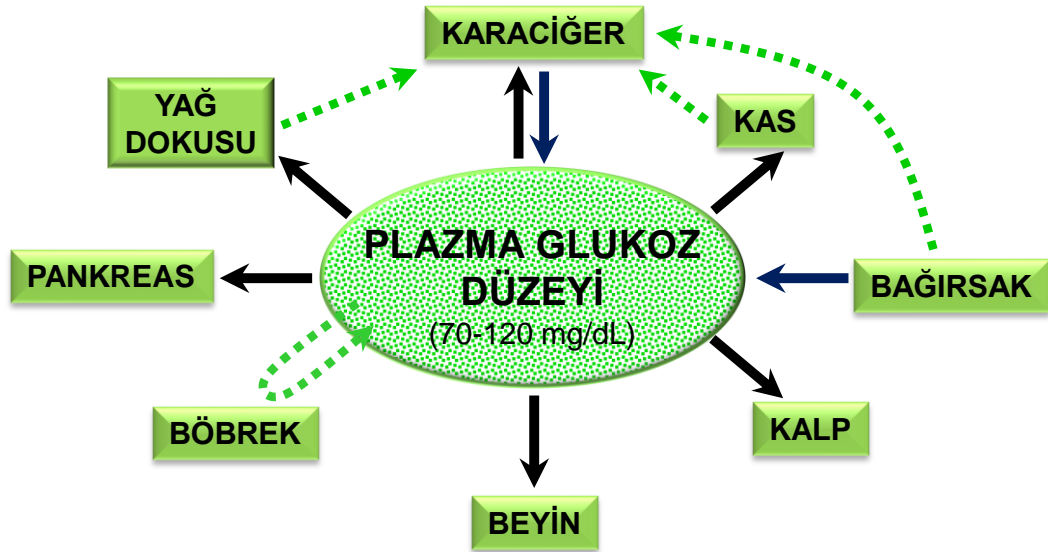
Vücudumuzda kan glukoz düzeyinin regülasyonu çok sayıda hormonun rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte rol alan hormonların başında insülin ve glukagon gelmektedir. Birbirine zıt yönde etki gösteren bu iki hormon kan glukoz düzeyini ayarlar. Kan şeker düzeyi yükseldiğinde pankreas Langerhans adacıklarında β -hücreleri tarafından salgılanan insülin, özellikle karaciğer ve kas hücrelerinde glikojen sentezini hızlandırarak kan glukoz düzeyini düşürür. Bunun aksine kan glukoz düzeyinin düşük olması durumunda pankreasta α -hücreleri tarafından salgılanan glukagon hormonu karaciğer ve kas dokularında glikojen halinde depolanan glukozun plazmaya verilmesini sağlayarak, plazma glukoz düzeyini arttırıcı etki yapar (Baron ark. , 1987, Nelson DL, 2005). Bu iki hormonun vücutta yeterli miktarlarda sentezlenmemesi ya da bu hormonların etkileşime girdikleri hücre reseptörlerle ilgili sorunlar, kan glukoz dengesinde bozulmalara ve sonuçta tip I ya da tip II diyabetin ortaya çıkmasına neden olurlar (Jiang and Zhang, 2003, Muller ark. , 1973, Nelson DL, 2005, Reaven ark. , 1987).

Diyabetin ortaya çıkmasında insülin hormonu büyük önem taşımakla birlikte, glukagon hormonunu ve bu hormonun reseptörü olan glukagon reseptörü ile ilişkisinin büyük önem taşıdığı bilinmektedir (Unger and Cherrington, 2012). Diyabetin oluşumunda insülin yetersizliği kadar glukagon fazlalığı da önem

taşımaktadır. Bu nedenle özellikle glukagon reseptörünün işlevini bloke edecek glukagon reseptör antagonistleri üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmekte ve bu antagonistlerin diyabet tedavisinde kullanım potansiyelleri üzerinde durulmaktadır (Johnson ark. , 1982, Larsen ark. , 2007, Ling ark. , 2002, Unson, Andreu, 1987, Zhang and Moller, 2000). Diğer taraftan glukagona özgü monoklonal antikolar kullanılarak, vücutta normalden yüksek düzeylerde sentez edilen glukagonun bloke edilmesine yönelik çalışmalara da rastlanmaktadır (Brand, Rolin, 1994).

4.1. Glukoz Metabolizmasının Regülasyonu ve Hormonlar

Glukoz metabolizması vücut hücrelerinin normal fizyolojik işleyişi için hayati önem taşır. Glukoz hem enerji kaynağı hem de birçok biyosentez reaksiyonunda prekürsör olarak kullanılan moleküllerin kaynağını oluşturur. Şekil 1’de plazma glukozunun kullanımı ve düzenlenmesinde rol oynayan ana aktörler şematize edilmiştir.

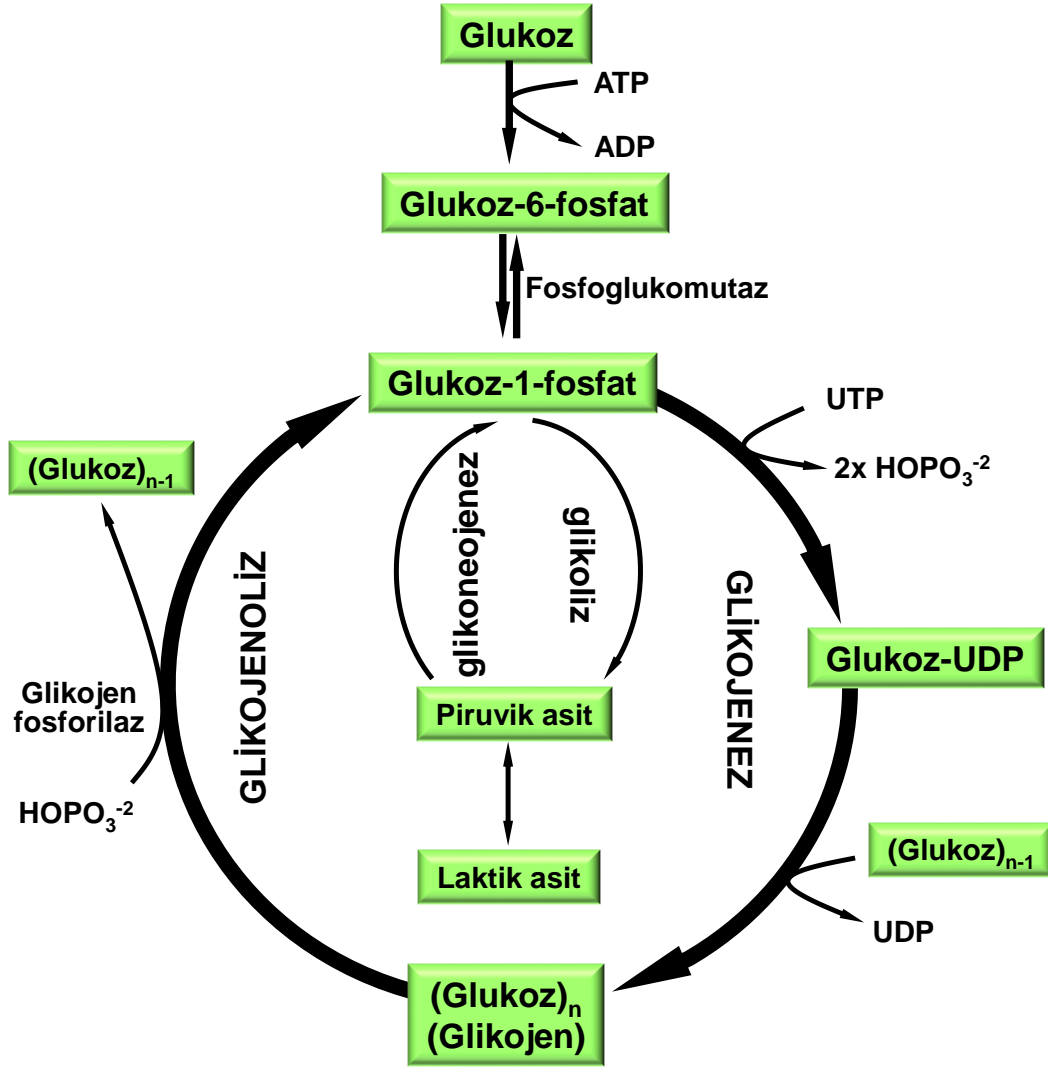


Şekil 1. Plazma glukoz kullanımı ve regülasyonunda rol alan organlar.

Plazma glukozundan en çok etkilenen organ beyindir. Yetişkin bir insan beyni günde ortalama 120 gr glukoz tüketir. Bu miktar toplam plazma glukozunun yaklaşık % 60-70'i kadardır (Andreone ark. , 2015). Yağ asitleri kan-beyin bariyerlerini geçemediğinden beyin hücreleri tarafından enerji kaynağı olarak kullanılamaz.

Dolayısıyla normal şartlarda beyin hücreleri enerji kaynağı olarak sadece glukozu kullanır (Maher ark. , 1994). Açlık durumunda ise keton cisimleri (asetoasetat ve hidroksibütrat) beyin hücreleri tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Paoli ark. , 2015). Glukoz düzeyinin yaklaşık 40 mg/dL değerlerine düşmesi beyin fonksiyonlarını önemli ölçüde zayıflatır. Bunun altındaki değerlerde beyinde kalıcı hasarlar meydana gelir ve ölüme sonuçlanabilir (Patet ark. , 2015).

Karaciğer glukoz düzeyini regüle eden en önemli organdır. Dolaşımdaki glukozun yaklaşık % 90'ı, direkt olarak sindirimle alınan besinlerden değil karaciğer kaynaklıdır. Besinlerle alınan glukoz karaciğer tarafından glikojenez sonucunda glikojene dönüştürülerek depolanır. Karaciğerin diğer dokulardan gelen gliserol, amino asitler ve laktik asit gibi moleküllerden de glikoneojenez reaksiyonları ile glukoz sentez ederek glikojene dönüştürme yeteneği vardır. Kan glukoz düzeyinin düşmesi durumunda, karaciğerde depolanan glikojen glikojenoliz ile hızla yıkılarak plazmaya glukoz verilir (Şekil 2) (Hers, 1976, Nelson DL, 2005).



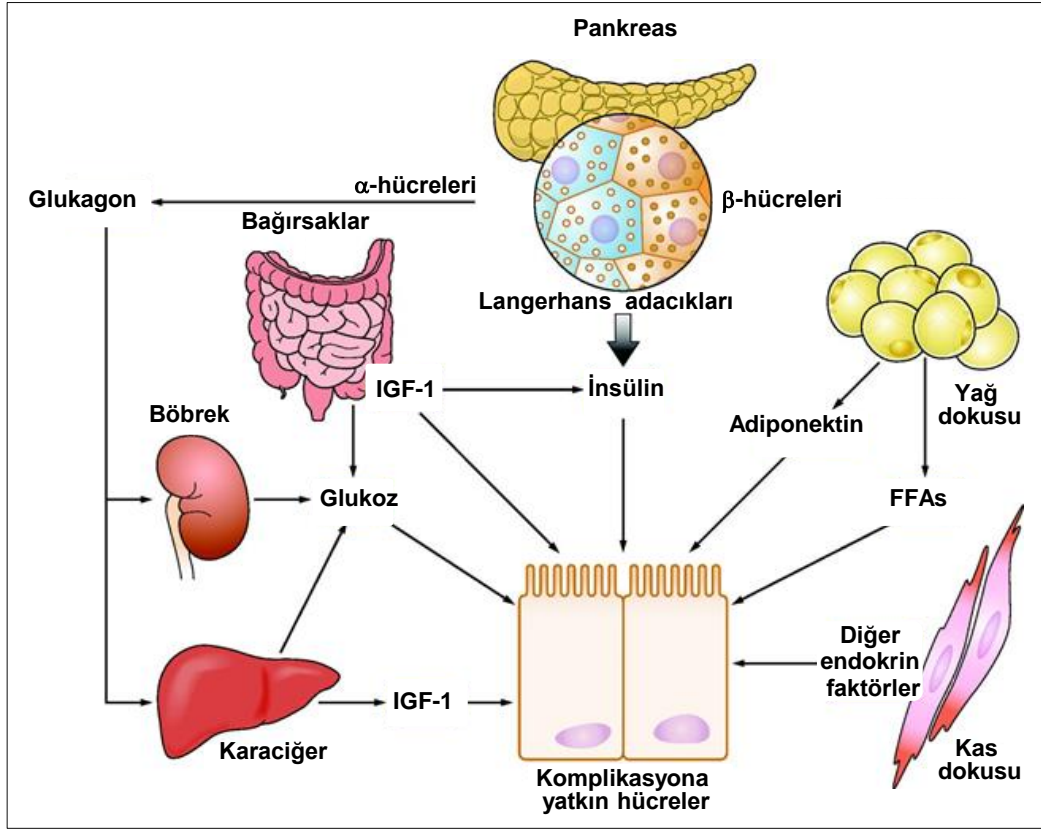
Şekil 2. Karaciğer hücrelerinde glikojen sentezi (glikojenoz-glikoneojenez) ve yıkımı (glikojenoliz).

Uzun süren açlık durumunda karaciğer diğer dokular için sadece glukoz kaynağı değil, aynı zamanda beyin hücreleri tarafından glukoz yerine kullanılabilen keton cisimlerinin de kaynağıdır (Cotter ark. , 2014). Böbrekler de karaciğer gibi glukoneojenezle sentez edilen glukozu kana vermektedir. Fakat normal koşullarda böbrekler tarafından kan dolaşımına verilen glukoz oranı çok düşüktür. Bununla birlikte uzun süren açlık durumunda, böbreklerin bu işlevi önem kazanır. Böbreklerin glukoz regülasyonundaki asıl işlevi, böbreklerde süzülen plazmada sürekli ve etkin bir şekilde kayıplara neden olmadan glukozun geri emilimini sağlamasıdır.

Kan glukoz düzeyinin kontrolünde rolü olan önemli aktörlerden biri de kaslardır. Kas hücreleri, glukoz düzeyinin artması durumunda plazmadan hızla glukoz çeker ve gerektiğinde glikojen halinde depolar. Bununla birlikte, kas hücrelerinde glukoz-6-fosfataz enzimi bulunmadığı için glikojeni glukozla dönüştürerek plazmaya glukoz takviyesi yapamaz. Bununla birlikte dolaşıma verdiği amino asitler, hepatositlerde glukozla dönüştürülür (Coppari, 2015).

Yağ dokuları, yağ asitlerinin trigliseridler halinde depolandığı dokulardır. Trigliseridlerin temel yapı taşları yağ asitleri ve gliserolfosfattır. Yağ dokusu hücreleri ihtiyaç duydukları gliserolfosfatı glukoz üzerinden glikolizis reaksiyonu ile sağlamak durumundadır. Bunun en önemli nedeni yağ hücrelerinde serbest gliserolü fosforile edecek ilgili kinaz enziminin bulunmamasıdır. Dolayısıyla yağ dokusunu oluşturan hücreler plazmadan glukoz alır. Diğer taraftan, hepatositlerde glikoneojenez reaksiyonlarında substrat olarak kullanılan serbest yağ asitleri ve gliserol yağ dokusu tarafından dolaşıma verilir.

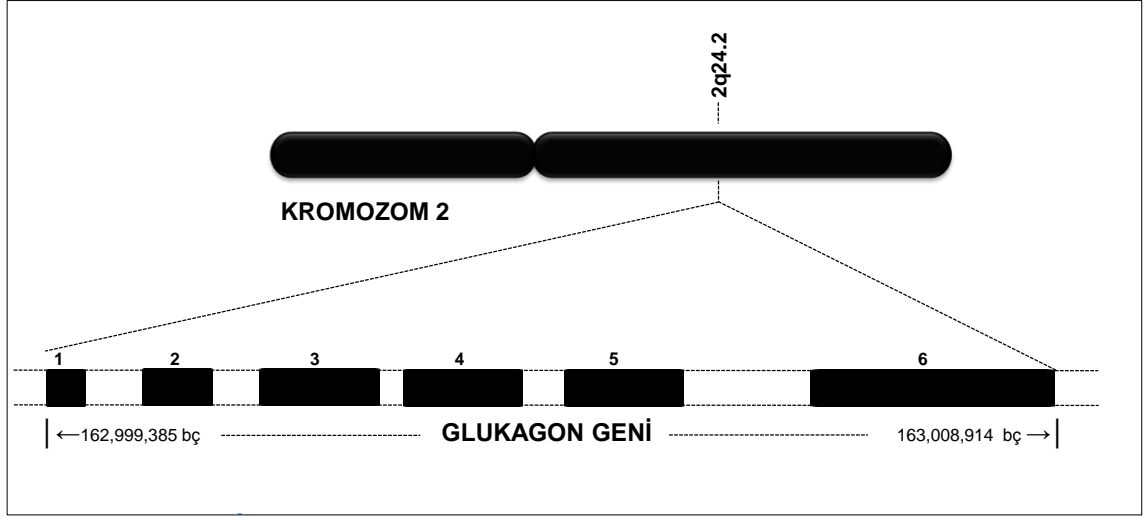
Plazma glukoz düzeyinin kontrolünde rolü olan organ ve dokuların fonksiyonları, başta insülin ve glukagon olmak üzere çok sayıda hormon tarafından kontrol altında tutulur. Bunlar; epinefrin, kortizol, büyüme hormonu, IGF-1 ve ACTH (Adrenokortikotropik hormon)'dır. Bu hormonların hedef organlar üzerindeki etkileri Şekil 3'de şematik olarak verilmektedir.



Şekil 3. Plazma glukoz düzeyinin kontrolünde rolü olan organ ve dokuların fonksiyonları (Forbes and Cooper, 2013).

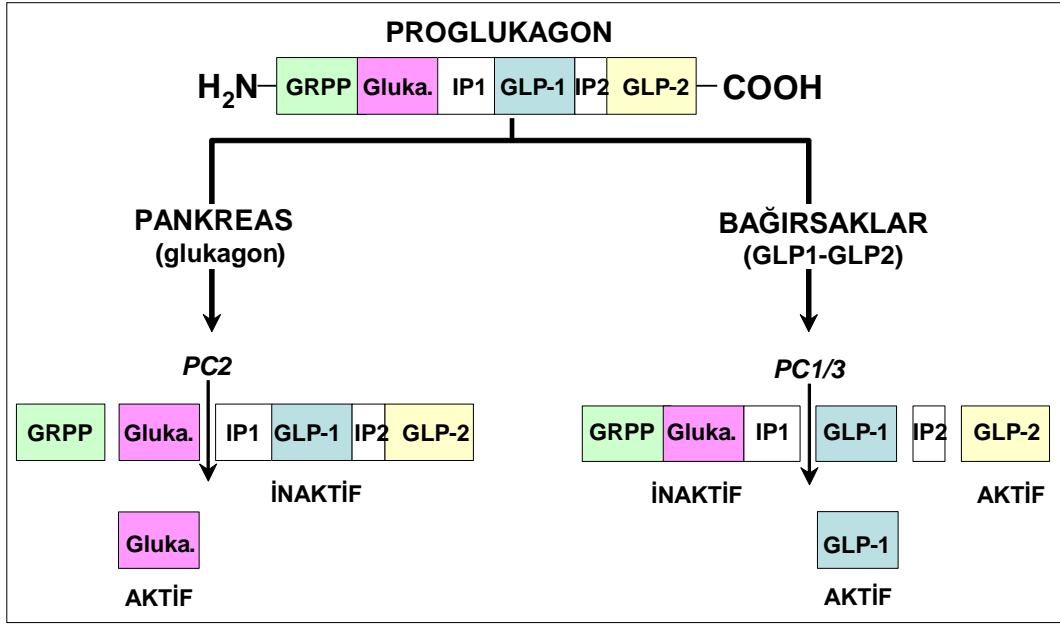
4.1.1. Glukagon ve glukagon benzeri peptidler (GLP-1 ve GLP-2)

Glukagon endokrin pankreasın α -hücrelerinden salgılanan 29 amino asitten oluşan peptid hormondur. Glukagon ve glukagon benzeri peptidlerin (GLP-1 ve GLP-2) öncüsü olan proglukagon insanda 2. kromozom üzerinde (2q36-q37) lokalize olan GCG geni tarafından kodlanır. Yaklaşık 9.5 kbç büyüklüğünde olan GCG geni altı ekzon taşır (Şekil 4).



Şekil 4. GCG geninin genom lokalizasyonu ve ekzon-intron yapıları (Gen lokasyonu 'LocuID-NCBI' a göre verilmiştir).

GCG geni üzerinden yaklaşık 2 kbç'lik bir mRNA sentez edilir. Bu mRNA'nın translasyonu sonucunda amino-terminalinde glisentin, karboksi-terminalinde ise GLP-1 ve GLP-2 dizileri içeren 160 amino asit bakiyesinden oluşan proglukagon sentez edilir. Proglukagon üzerindeki glukagon, GLP-1 ve GLP-2 peptidleri, kısa ara peptid dizileri (*ing.* intervening peptide sequence - IP) ile birbirinden ayrılmıştır. Amino terminal sinyal dizisi, birçok öncül-hormonlar için tipiktir ve sentezi sırasında proteinin endoplazmik retikuluma kanalize olmasında rol oynar (Walter and Johnson, 1994). Altı ekzondan oluşan GCG geninde her ekzon dikkat çekici bir şekilde proglukagonun farklı bölgelerinin kodlanmasından sorumludur. GCG geninin bu ekzon kompozisyonu, modüler ekzon dizilerinin çoğunlukla proteinlerin spesifik bölgelerini kodladığını gösteren güzel bir örnektir (Gilbert ark. , 1997). Glukagonu oluşturan tüm amino asit bakiyeleri molekülün biyolojik aktiviteleri açısından son derece önemlidir. Molekülün 22-27. ve 5-10. amino asitleri glukagonun reseptörüne bağlanmasıyla ilgilidir. GCG geninin ekspresyonu ile sentez edilen proglukagon proteini, translasyon sonrası işlemler sonucunda aktif glukagon, GLP-1 ve/veya GLP-2'ye dönüştürülür. Pankreasın Langerhans adacıklarındaki α -hücrelerinde sentez edilen proglukagonun işlenmesi sonucunda glukagon oluşturulur. Bu süreç bağırsak L hücreleri ve sinir hücrelerinde GLP-1 ve GPL-2 oluşumuyla sonuçlanır (Şekil 5).



Şekil 5. Farklı organlarda proglukagonun glukagon ve glukagon benzeri peptidlere (GLP-1 ve GLP-2) dönüştürülmesi (Yazbeck ark. , 2010).

Glukagon sentezi insüline benzer bir şekilde kandaki glukoz seviyesine bağlı olarak düzenlenmektedir. Glukagon salgısı, kandaki glukoz değerleri ile doğrudan bağlantılıdır. Kandaki glukoz değeri düşüklüğünde (hipoglisemi) azalan insülin salgısına zıt olarak, pankreastaki α hücreleri uyarılarak glukagon salgılanmasını sağlamaktadır (Nelson DL, 2005, Quesada ark. , 2006). Proteinli besinlerden kaynaklanan amino asitler hem insülin hem glukagon salınımını uyarır ve artan insülin sonucu oluşan hipoglisemiyi önler. Düşük glukoz durumlarında glukagonun salgılanması voltaj kapılı Na^+ ve Ca^{2+} kanalları vasıtası ile gerçekleşir. Voltaj kapılı sodyum (Na^+) ve kalsiyumun (Ca^{2+}) etkisi ile glukagon salgılanması artar (Gromada ark. , 1997). Düşük glukoz seviyesinde aksiyon potansiyelini bu kanallar oluşturur. Depolarizasyon Ca^{2+} 'un hücre içerisine girmesiyle glukagon salgılanmasını artırır. Bu olay sırasında ATP duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanalları da görev alır. Kanda glukoz seviyesindeki artışa bağlı olarak sitosolik ATP miktarının yükseltilmesi glukagon salınımını engeller. K_{ATP} kanallarının blokajı Na^+ ve Ca^{2+} 'un oluşturduğu aksiyon potansiyelinin sona ermesi ile gerçekleşir. Bu olay Ca^{2+} 'un hücre içine girişini engeller ve glukagon salgısı sonlanır (MacDonald ark. , 2007). Glukagon salgılanmasını ayarlayan hücresel sinyaller oldukça iyi tanımlanmış olsa da glukozun

direk veya β hücrelerinin aktive edilmesi ile dolaylı etkisi halen tartışılmaktadır. Fareler üzerinde yapılan deneyler, yüksek glukoz seviyelerinde β hücrelerince başlatılan parakrin sinyalin glukagon salgılanması için temel etken olduğunu göstermiştir (Franklin ark. , 2005, Olsen ark. , 2005). Tip 1 diyabet hastalarında yapılan bir araştırmaya göre insülin insanlarda glukagon salgılanmasını önleyen temel sinyaldir (Cooperberg and Cryer, 2009). Glukoza ek olarak, GLP-1 (Dunning ark. , 2005), GLP-2 (Meier ark. , 2006), yağ asitleri, otonom sinir sistemi (Ahren, 2000) ve dolaşımdaki amino asitler (Dumonteil ark. , 2000) gibi diğer fizyolojik parametrelerin glukagon salgısı için regülatör olduğu bilinmektedir.

4.1.1.1. Dolaşımdaki glukagonun yıkılması

Kan dolaşımına katılan glukagon peptidlerinin, diğer birçok peptid ve proteinlerde olduğu gibi belirli bir etki süresi ve yarılanma ömrü vardır. Belirli bir süre sonra glukagon peptidleri kan ya da çeşitli organlarda metabolize edilir. Glukagon yıkımının plazmada başladığı fakat organdaki yıkıma göre plazmadaki proteoliz seviyesinin daha düşük olduğunu gösteren veriler vardır (Pospisilik ark. , 2001). Çalışmalar, dolaşımdaki serin proteaz dipeptidil-peptidaz IV (DPP-IV)'ün kandaki glukagon yıkımı için birincil enzim olduğunu göstermektedir. DPP-IV'ün spesifik inhibitörü olan izolosil-tiazolidin (Ile-Thia), serumdaki glukagon yıkımını tamamıyla bloke etmektedir. Glukagon DPP-IV ile glukagon-(3–29) ve glukagon-(5–29) şeklinde hidroliz edilir. Kan dolaşımındaki glukagonun proteolitik yıkımı daha çok membrana bağlı endotelial DPP-IV tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle glukagonun in vivo yıkılması plazma matriksinden ziyade kan damarlarında gerçekleşir (Mentlein, 1999). Glukagonun yıkılmasında DPP-IV enziminin rolü amino-terminali modifiye edilmiş glukagon analogları ile araştırılmıştır. Bu amaçla DPP-IV enzime dirençli [D-Ser²]-glukagon, [(P)-Ser²]-glukagon, [Gly²]-glukagon ve [D-Gln³]-glukagon gibi glukagon analogları denenmiştir. In vitro çalışmalar [D-Ser²]-glukagonun DPP-IV'e yüksek afinite göstermekle birlikte proteolitik yıkıma dirençli olduğunu göstermiştir. [Gly²]-glukagon ve [D-Ser²]-glukagon DPP-IV tarafından normal glukagona göre daha yavaş yıkılmaktadır. In vivo denemelerde sadece [D-Ser²]-glukagon analogunun normal glukagona göre plazma glukoz seviyesini daha fazla arttırdığı saptanmıştır. Buna karşın [D-Ser²]-glukagonun in

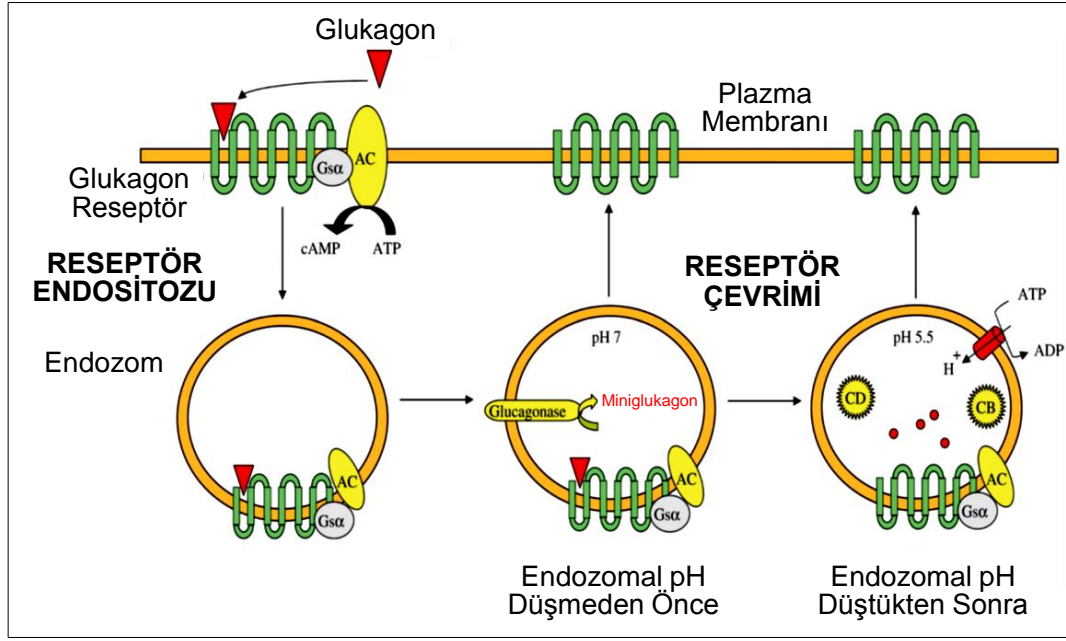
vitro etkisinin daha az olduğu bulunmuştur (Hinke ark. , 2000). Bu durum [D-Ser²]-glukagon analogunun in vivo koşullarda DPP-IV ile proteolitik yıkıma daha direçli olması ile ilişkilendirilmektedir. Kanda dolaşım halinde olan glukagonun dokularda yıkılması ile ilişkilili tam bir mutabakat olmamakla birlikte karaciğer ve böbreklerin glukagonun yıkımında işlev gören temel organlar olduğu konusunda fikir birliği vardır. Özellikle karaciğer, plazmanın glukagondan arındırılmasında işlev gören önemli bir organdır (Authier and Desbuquois, 2008). Karaciğer hücrelerinde glukagon farklı mekanizmalarla yıkıma uğratılır. Bunlardan birinde glukagonun reseptörüne bağlanması gerekirken, diğerinde glukagon-reseptör bağlanmasına gereksinim duyulmaz (Jaspan ark. , 1981).

Farklı gruplar tarafından yapılan çalışmalar, böbreklerde glukagonun, glomerüler filtrasyondan sonra renal proksimal tübüllerin apikal yüzeyinde hidroliz edildiğini göstermiştir. Renal tübüllerin silli bölgelerinde glukagon yıkımında iş gören DPP-IV enzimi aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Mentlein, 1999). Sıçanlara enjekte edilen radyoaktif işaretili [¹²⁵I]iodoglukagonun beklendiği şekilde hızla karaciğer ve böbrek hücrelerinde yoğunlaştığı, daha düşük düzeylerde kalp, akciğer, dalak, yağ dokusu, ince bağırsak ve böbreküstü bezinde toplandığı saptanmıştır. Doğal glukagonun, [¹²⁵I]iodoglukagon ile eş zamanlı enjeksiyonunun [¹²⁵I]iodoglukagonun karaciğer hücrelerinde toplanmasını %90 oranında azalttığı saptanmıştır. Bunun aksine, doğal glukagon, [¹²⁵I]iodoglukagon'un böbrek zarında toplanmasını sadece %30 oranında diğer organlarda ise %30-60 arasında engellemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, karaciğer hücrelerinde glukagon yıkım mekanizmasının ağırlıklı olarak glukagon-reseptör bağlı mekanizma olduğu, diğer organlarda ise kısmen reseptör bağımlı mekanizma ile yıkımın gerçekteştiği ileri sürülmektedir. Çok sayıda çalışmada plazma zarının glukagon yıkımında ana fizyolojik bölge olduğu ve karaciğer hücre yüzeyinde en az 3 nötral proteolitik kesim işleminin gerçekteştiği belirtilmektedir.

4.1.1.2. Endositoz ve glukagonun hücre içi proteolizi

Yukarıda da değinildiği gibi dolaşımdaki glukagonun önemli bir bölümü karaciğer hücrelerinde (hepatositler) glukagon reseptörü ile ilişkilili bir mekanizma ile

yıkıma uğratılır. Karaciğer hücrelerine alınan radyoaktif işaretli [¹²⁵I]iodoglukagonun hücre içi lokalizasyonu biyokimyasal ve morfolojik olarak araştırılmıştır. Taze izole edilmiş hepatositler belirli bir süre [¹²⁵I]iodoglukagon ile inkübe edildikten sonra kantitatif elektron mikroskop otoradyografisi ile incelendiğinde radyoaktif işaretli hormonların ilk aşamada (10 dk) hücrenin plazma membranında biriktiği, daha sonra hücre içine geçerek tercihen lizozom benzeri yapılara tutunduğu saptanmıştır (Barazzone ark. , 1980). Bu sonuçlar, izole edilmiş hepatositlerle glukagonun glukagon reseptörüne bağlı endositoz yoluyla hücre içerisine alındığını, epidermal büyüme faktörü (*İng. Epidermal Growth Factor: EGF*) ve insülinin hücre içerisinde metabolize edilmesinde izlenen işlemlerle benzer bir yolakla yıkıma uğradığını göstermiştir. Bununla birlikte radyoaktif glukagonun hücre içerisine alınması [¹²⁵I]iodoinsülin ve [¹²⁵I]iodoEGF'e göre daha düşük hızda gerçekleşmektedir (De Diego ark. , 1991). İzole edilmiş hepatositlerde yapılan biyokimyasal çalışmalarda zamanla hücrelere tutunan [¹²⁵I]iodoglukagon'un asit muamelesi ile daha düşük düzeylerde glukagonun serbestleştiği saptanmış ve bu durumun reseptöre bağlı glukagonun hücre içine alınmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Horwitz and Gurd, 1988). Düşük sıcaklıkta fenilarsin oksitin glukagonun endositoz ile hücre içerisine alınmasına etkileri bu düşünceyi desteklemektedir (Horwitz and Gurd, 1988). Glukagonun hepatositlerde reseptör bağımlı endositoz ile alınması ve metabolize edilmesinde izlenen yolak sıçanlara periferal yolla enjekte edilen radyoaktif işaretli doğal glukagonun izlenmesi ile de ortaya konmuştur (Authier ark. , 1990). Hücre içine alınan [¹²⁵I]iodoglukagonun endo-lizozomal transferi sıcaklığa (optimum 37°C) ve enerjiye (ATP ve ATP-tazeleyen sistem) bağımlıdır (Chauvet ark. , 1998). Bununla birlikte insülin yıkımında olduğu gibi endozomal asidik pH glukagonun enzimatik yıkımı için gereklidir (Şekil 6).



Şekil 6. Glukagonun endozomal yıkımı ve glukagon reseptörü endositoz döngüsü (Merlen ark. , 2006).

Glukagonun hepatositlerde endozomal proteolizi maksimum pH 4'te gerçekleşir ve bu olayda fonksiyonel olarak ATP-bağımlı endozomal asidifikasyona gereksinim duyulur. Ortama zayıf baz, proton iyonofor veya vaküolar H⁺-ATPaz inhibitörü ilave edilmesi endozomlarda glukagon yıkımını engeller (Fuchs ark. , 1989).

4.1.2. GLP-1 ve GLP-2

Glukagon benzeri peptidler (*İng. glucagon like peptides 1 and 2*: GLP1 ve GLP2) glukagonun da kaynağı olan proglukagon üzerinde farklı işlemler sonucu sentez edilirler (bk. Şekil 5). Glukagon benzeri peptidler de 1980ler'in başında klonlanan ve nükleotid dizisi saptanan GCG geni üzerinden proglukagon şeklinde kodlanır (Mojsov ark. , 1986). Proglukagon üzerinden oluşturulan GLP-1 30 amino asitten oluşan bir peptid hormondur (Holst and Gromada, 2004). GLP-1 sadece pankreas adacık alfa hücrelerinden değil, aynı zamanda bağırsak L hücrelerinden ve merkezi sinir sisteminden de salınmaktadır. Bu bölgelerde; proglukagondan, 29 amino asitli glukagon ve diğer proglukagon blokları oluşur. Bu işlemler pankreas alfa hücrelerinde sentez edilen prohormon konvertaz (PK) enzimi katalizörlüğünde gerçekleşir (Furuta ark. , 1997). Bağırsak L hücrelerinde de PK enzimi içeriği,

pankreas alfa hücrelerinde bulunan miktarın yaklaşık 1/3'ü kadardır ve proglukagondan, GLP-1 ve GLP-2 oluşumunu katalizlemektedir (Ugleholdt ark. , 2004). Preproglukagon mRNA ekspresyonu ve sonrasında proglukagondan GLP-1'in sentez edilmesi, sadece bağırsak L hücrelerinde değil beyin kökünde soliter traktus nükleuslarının (NTS) nöronlarında da gerçekleşir (Larsen ark. , 1997).

GLP-1'in vücuttaki ana kaynağı bağırsak L hücreleridir. GLP-1'in sekresyonu bağırsak lümeninde besinlerin varlığına bağlıdır. Salgılandıktan sonra yarılanma ömrü oldukça kısadır. İki dakikadan daha kısa sürede dipeptidil peptidaz-4 tarafından hızla yıkılır. GLP-1 anti-hiperglisemik aktiviteye sahiptir. Glukagon sekresyonunu baskılayıcı etki gösterirken, insülinin glukoza bağımlı stimülasyonunda rol alır. Glukagon glukoza varlığında, pankreas beta hücresinde bulunan spesifik reseptörüne bağlanır (Mayo ark. , 2003). Bu bağlanma, adenil siklaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak siklik-AMP (c-AMP) sentezini artırır. c-AMP, guanin nükleotid değiştirici faktör II'yi uyarır ve bunu takiben iyon kanallarının aktivasyonu ve intraselüler kalsiyum iyonunun artması ve ekzositoz yoluyla insülin salgılanması gerçekleşir (Holst and Gromada, 2004). GLP-1, insülin sekresyonu ile birlikte, glukokinaz ve GLUT-2 gen anlatımını da uyarmaktadır (Buteau ark. , 1999). Bunun sonucunda glukoza kullanımı ve glukozun hücrelere geçişi artar (Egan ark. , 2003). GLP-1 hormonunun pankreas β hücrelerinin apoptoza uğramasını inhibe ettiği, insülin salgılayan bu hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonu pozitif yönde etkilediği de bilinmektedir (Drucker, 2001, Holst, 2000).

GLP-1'in β hücrelerinden insülin salgılanmasındaki uyarıcı rolü hayvan deneyleriyle de gösterilmiştir (Fehmann ark. , 1995). Bu deneylerde GLP-1 reseptörü bloke edildiğinde, glukoza olan toleransın azaldığı ve hiperglisemi olduğu görülmüştür (Scrocchi ark. , 1996). Benzer şekilde, insanlarda yapılan çalışmalarında da GLP-1 antagonisti (Eksendin 9-39) verilmesinin, glukoz intoleransı ve hiperglisemiye yol açtığı saptanmıştır (Edwards ark. , 1999).

Doğada bulunan en iyi GLP-1 agonisti eksendin-4 molekülüdür. Eksendin bir sürüngen türü olan *Gilia Monster*'in tükürüğünden elde edilmiştir. GLP-1 ile amino asit dizilimi %52 oranında homoloji göstermektedir. Eksendin-4 molekülünün amino

asit dizilimi değiştirilerek sentetik analogu elde edilmiştir ki, buna exenatide® ismi verilmiştir. Exenatide, reseptör agonistidir (Buse ark. , 2004, Gallwitz, 2005).

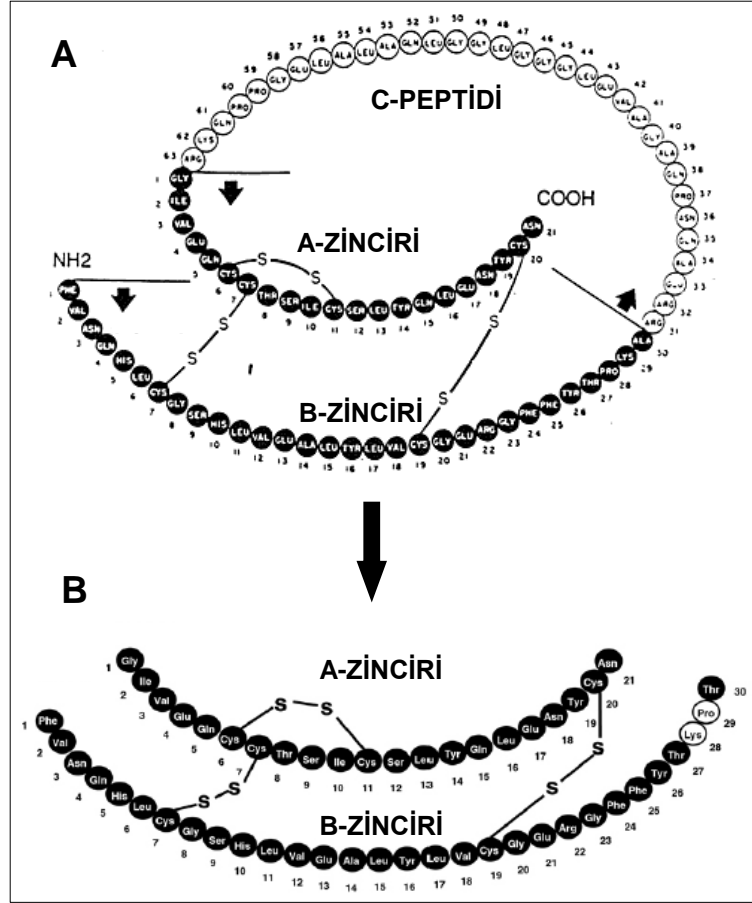
İnsanda proglukagon üzerinden sentez edilen bir diğer peptid olan GLP-2 33 amino asit bakiyesinden oluşur (Brubaker ark. , 1997, DaCabra ark. , 2000). GLP-2 hormonu da GLP-1 gibi bağırsak endokrin L hücreleri ve bir kısım nöron hücrelerinde üretilir. Bağırsak hücrelerinde sentez edilen GLP-2, besin alımıyla GLP-1 ile birlikte salgılanır (Orskov and Holst, 1987). Dışarıdan alındığında GLP-2'nin insan ve kemirgenlerde bağırsakta büyüme, bağırsak fonksiyonlarında artış, kemik yıkımında azalma gibi etkiler saptanmıştır. Bu nedenle GLP-2 ve analogları, kısa kolon sendromu, osteoporoz ve Crohn hastalığının tedavisinde kullanım potansiyeline sahiptir (Blonski ark. , 2013, Haderslev ark. , 2002).

4.1.3. İnsülin

İnsülin 51 amino asit bakiyesinden oluşan ortalama 5.8 kilo dalton (kDa) ağırlığında vücudun karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan en önemli hormonlardan biridir. 1869 yılında Berlin Patoloji Enstitüsünde Doktora çalışması yapan Paul Langerhans, pankreasın mikroskobik yapısını incelerken, pankreasın dış salgı dokusunda yayılmış, daha sonra kendi adıyla anılacak olan hücre kümelerine rastlamıştır (Rosenfeld, 2002). Fransız patolog Eduard Laguesse ise bu hücre kümelerinin sindirimde rolü olan çeşitli salgılar ürettiği fikrini ortaya atmıştır. 1921 yılında Charles Best ve Friedrich Grant Banting total pankreotektomi yapılmış köpeklere intravenöz pankreas ekstresi vermiş ve bu ekstrenin kan şekerini düşürmede etkili olduğunu gözlemlemişlerdir (Roth ark. , 2012).

İnsülin, pankreasın endokrin kısmında kümelenmiş hücreler halinde bulunan Langerhans adacıklarında beta hücreleri tarafında sentez edilir ve salgılanır (Evans ark. , 2011). Glukagonda olduğu gibi insülin de pankreatik beta hücrelerinde inaktif preproinsülin halinde sentez edilir ve daha sonra proteolitik kesim işlemlerinden sonra aktif insüline dönüştürülür. Preproinsülinin sinyal peptidi, translasyon sırasında endoplazmik retikulumda kesilerek proinsülin oluşur. Proinsülin beta hücrelerindeki salgı vesiküllerinde parçalanarak aktif insülin ve C-peptid açığa çıkar. Aktif insülin molekülleri disülfid bağları ile bağlı A ve B zincirlerinden oluşur. İnsülin

molekülünün A zincirinde de molekül içi bir disülfid köprüsü bulunmaktadır (Joshi ark. , 2007) (Şekil 7).



Şekil 7. İnsan proinsülin (A) ve insülin (B) yapısı.
(<http://diabetesmanager.pbworks.com>, Erişim tarihi: 15 Nisan 2015)

İnsülin pankreas hücrelerinde salgı vezikülleri içerisinde çinko ile kompleks halde bulunur ve bu kompleks yapı insülinin salgı veziküllerinden salınması için gereklidir. Vücutta kan şekerinin yükselmesi ile oluşan uyarı sonucunda insülin ve C-peptidleri birlikte kana salınır. C-peptid düzeyinin ölçülmesi endojen insülin salınımını gösterir. Anti-insülin antikorlarının insülin tayinini engellediği durumlarda insülin miktarı tayininde kullanılır (Tong ark. , 2005). Salınan insülin karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi birçok dokuda hücre membranlarında bulunan özgün reseptörlerine bağlanırlar. İnsülinin reseptörüne bağlanabilmesi için krom iyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Krom ayrıca glukoz tolerans faktörü olarak da adlandırılır.

İnsülinin bağlanması sonucu oluşan en erken yanıt bağlanmadan saniyeler sonra glukozun iskelet kas hücreleri ve adipositler içine girişinin artmasıdır (Ryysy ark. , 2000). İnsülin karaciğerde ve daha az miktarda böbreklerde bulunan insülinaz enzimi tarafından yıkılır (Tundo ark. , 2013).

İnsanlarda insülin eksikliği ya da insüline yanıtta direnç oluşması, diyabet olarak tanımlanan kan glukoz düzeyinin regülasyonunda bozulmalara neden olur. Pankreas beta hücrelerinde yeteri kadar insülin üretilmemesi Tip I diyabet ile sonuçlanır (Katuchova ark. , 2015). Tip I diyabet, sıklıkla çocukluk ve gençlik çağında ortaya çıktığı için ‘Juvenil Diyabet’ olarak da adlandırılmaktadır (Sildorf ark. , 2014). Bu gibi durumlarda vücutta hiç insülin üretilmediği ya da düşük düzeyde üretilmediği için hastalar ömür boyu insülin hormonunu dışarıdan almak durumundadır (Morgan ark. , 2014).

Beslenme ile de ilişkilendirilen bir diğer diyabet türü Tip 2 diyabettir. Tip 2 diyabet nispeten düşük düzeyde insülin sentezi ile birlikte, hedef dokularda insüline karşı yanıtta direnç ile karakterize edilir (Arslanian ark. , 1993).

İnsülin ilk yıllarda insan ve hayvan pankreas ekstraktlarından elde edilmiştir. Daha sonra protamin ve çinkonun insülinin yapısına eklenmesiyle orta ve uzun etkili insülinler elde edilmiştir. 1982 yılında rekombinant DNA teknolojisi ile insan insülini üretilmiştir (Johnson, 1983). Sığır insülini insan insülininden 3, domuz insülini ise yalnızca 1 amino asidin pozisyon farklılığı sonucu ayrılır. 1990lar’da ise kısa ve uzun etkili analog insülinler tedavi sistemine eklenmiştir (Hirsch, 2004, Rakatzi ark. , 2003).

Günümüzde diyabetin başlıca tedavi şekli, hastalara dışarıdan insülin verilmesidir. İlk yıllarda insülin insan ve hayvan pankreas ekstraktlarından elde edilmiştir. Günümüzde ise insülin rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak bakteri ya da maya hücrelerinde üretilmektedir. Bu insülinler insan insülini ile aynı ya da bazı küçük değişikliklere sahip analog insülinlerdir. Rekombinant olarak üretilen insülinler farmakokinetik etkilerine göre, kısa, orta ve uzun etkili insülinler olarak ayrılırlar (Riddle, 2004, Yki-Jarvinen, 2004). Analog insülinlerin kullanıma girmesi ile hastalarda endojen insülinin etkisine ve dinamiğine benzer sonuçlar

alınmıştır. Özellikle analog kısa ve uzun etkili insülinlerin kullanıma girmesi ile hipoglisemi riskinde azalma, daha az kilo alımı ve gün boyunca devam eden bazal insülin ihtiyacının karşılanabilmesi esnekliği sağlanmıştır (Hirsch, 2005).

Farklı ticari isimler ile piyasaya sürülen kısa etkili insülin analogları arasında Lispro (Humalog), Aspartat (Novarapid, Novomix) ve Glulisin (Apidra) sayılabilir. İnsan insülininde bazı amino asit bakiyeleri değiştirilerek orta ve daha uzun süre etkili olan insülin analogları elde edilmiştir. Orta etkili insülin analogları Lispro insülin protamin, aspartat insülin protamindir. Bunların etkileri 2.5-3 saatte başlamakta ve 13-16 saat süreyle devam etmektedir (Joshi, Parikh, 2007). Uzun etkili olan insülin analogları ise Glargin (Lantus) ve Detemir (Levemir)'dir. Etkileri 2-3 saatte başlamakta ve 24 saat boyunca sürmektedir (Hermansen ark. , 2004, Yki-Jarvinen, 2004).

4.1.4. Glukoz metabolizması ile ilgili diğer hormonlar

Plazma glukoz düzeyinin kontrolünde rolü olan organ ve dokuların fonksiyonları, başta insülin ve glukagon olmak üzere çok sayıda hormon tarafından kontrol altında tutulur. Bu hormonlar; epinefrin, kortizol, büyüme hormonu, IGF-1 ve ACTH (Adrenokortikotropik hormon)'dır. Glukagon, epinefrin, kortizol ve büyüme hormonu ile birlikte insüline ters etki gösterirler. Glukagon ve epinefrin, kan glukoz düzeylerinin akut ve kısa sürede düzenlenmesinde önemli hormonlardır. Glukagon karaciğerde glukojenoliz ve glukoneojenezi uyarırken, epinefrin glikojenolizin yanında lipolize yol açar ve insülin salgılanmasını, periferik dokular tarafından insülin aracılı glukagon alınımını inhibe eder. Kortizol ve büyüme hormonu ise glukoz metabolizmasında uzun süreli düzenlemede görev alırlar. ACTH kortizol üretimini uyararak glukoz metabolizmasında dolaylı etkiye sahip olur (Cho, Merchant, 2012).

4.2. Glukagon Reseptör Antagonistleri

Vücutta normal değerlerin dışında glukagon sentezi veya glukagon/glukagon reseptörü etkileşimindeki anormalliklere bağlı ortaya çıkan kan glukoz düzeyindeki

bozulmaların önüne geçmek için alternatif yaklaşımlar ortaya konmaktadır. Bu amaçla glukagonun aktivitesini inhibe eden peptid antagonistler (Unson, Andreu, 1987), oral yolla alınan peptid yapıda olmayan antagonistler (Madsen, Knudsen, 1998) ya da glukagon/glukagon reseptör etkileşimini bloke edecek monoklonal antikolar (Brand, Rolin, 1994) denenmektedir.

4.2.1. Peptid antagonistler

Glukagonun amino-terminalinde yer alan histidin amino asidinin molekülün aktivitesi açısından kritik öneme sahip olduğu saptanmıştır (Unson, Macdonald, 1993). 1972’de sadece amino terminaldeki histidin amino asidi taşımayan glukagon peptidinin (des-His-glukagon) in vitro ortamda glukagon reseptörü antagonisti olarak davrandığı bulunmuştur (Goldfine, Roth, 1972). Glukagon peptidinde yapılan değişik modifikasyonlar ile [1-N α -trinitrofenilhistidin, 12-homoarginin]-glukagon (THG) gibi antagonist etkili glukagon analogları elde edilmiştir (Bregman, Trivedi, 1980). THG’nin, kan glukoz seviyesini düşürdüğü diyabet tedavisinde GCGR’nin bloke edilmesi için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Johnson, Goebel, 1982). THG’nin keşfinden itibaren 20’den fazla peptid antagonistleri geliştirilmiştir (Ahn ark. , 2001, Gysin ark. , 1987, Gysin ark. , 1986, Unson, Andreu, 1987, Zechel ark. , 1991).

4.2.2. Peptid yapıda olmayan glukagon reseptör antagonistleri

Glukagon peptidinde yapılan modifikasyonlar ile elde edilen antagonistler dışında, peptid yapıda olmayan, fakat glukagon reseptörünü bloke eden moleküller üzerinde de önemli çalışmalar yapılmıştır. 1998 yılında Novo Nordisk, ilk peptid yapıda olmayan insan glukagon reseptör antagonisti, NNC-92-1687’yi geliştirmiştir (Madsen, Knudsen, 1998). Son yıllarda aynı şirket tiyazol (5-aminotiyazoller) ile insan GCGR antagonist serileri elde etmiştir (Brand ark. , 1996).

4.2.3. Glukagon-glukagon reseptör etkileşimini bloke eden monoklonal antikorlar

Günümüzde birçok monoklonal antikor çeşitli kanser türleri ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Brekke and Sandlie, 2003). Benzer şekilde glukagon veya GCGR karşı nötralize edici monoklonal antikorlar aşırı glukagon etkilerini bloke etmek amacıyla kullanım potansiyeline sahiptir. Bu amaca yönelik yapılan çalışmalarda, anti-glukagon antikorlarının, normal farelerde glukagonun hiperglisemik etkilerini ortadan kaldırdığı ve streptozotosin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda insülin varlığında, kan glukoz seviyelerindeki yemek sonrası artışlarda azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Brand, Rolin, 1994). Alloksan ile diyabetik hale getirilen tavşanlarda yemek sonrası kan şekerindeki artışın, monoklonal antikorlar ile indirgendiği belirlenmiştir (Brand, Jorgensen, 1996). İnsan glukagon reseptörüne yüksek afinite ile bağlanan insan monoklonal antikorları da glukoz dengesini iyileştirme konusunda benzer sonuçlar ortaya koymuştur.

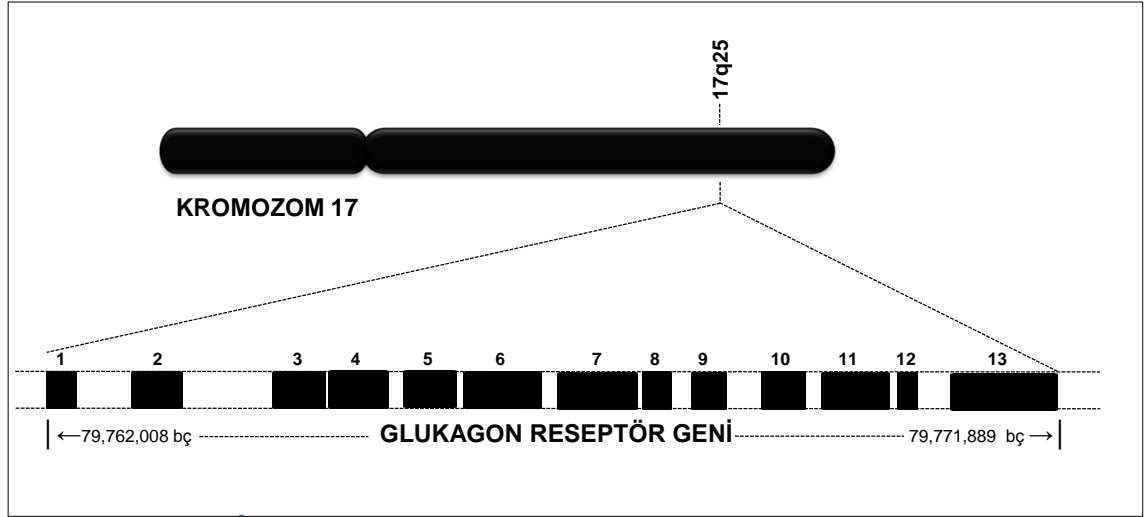
4.3. Glukagon Reseptörü

Bu tez çalışmasına konu olan glukagon reseptörü ilk kez 1971 yılında Rodbel ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Rodbell ark. , 1971b). Glukagon reseptörü karaciğerde ve glukagonun diğer hedef hücrelerinde membrana bağlı olarak bulunur (Desbuquois, 1983). Rodbel ve arkadaşları aynı zamanda glukagon reseptörünün adenil siklaz aktivasyonuna katıldığını ve GTP bağlayan G proteinleri vasıtasıyla intraselüler sinyal iletimini sağladığını saptamışlardır (Rodbell ark. , 1971a, Rodbell, Krans, 1971b).

Glukagon reseptörünü kodlayan GCGR geni cDNA'sı ilk kez sıçanlarda 1993 yılında birbirinden bağımsız olarak Jelinek (Jelinek ark. , 1993) ve Svoboda (Svoboda ark. , 1993a, Svoboda ark. , 1993b) tarafından reverz transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) teknikleri ile hazırlanarak klonlanmıştır. Bundan kısa süre sonra insan (MacNeil ark. , 1994), fare (Burcelin ark. , 1995), maymun (McNally ark. , 2004), köpek (Yang ark. , 2007), kurbağa (Ngan ark. ,

1999, Sivarajah ark. , 2001) ve japon balığı (Chow ark. , 2004) GCGR genleri klonlanarak karakterize edilmiştir.

İnsana özgü glukagon reseptör geni (GCGR) 1994 yılında karaciğer hücrelerinde izole edilerek karakterize edilmiştir (MacNeil, Occi, 1994). İnsan glukagon reseptör geni 17. kromozom üzerinde (17q25) yer almakta ve 13 ekzon içermektedir (Şekil 8).

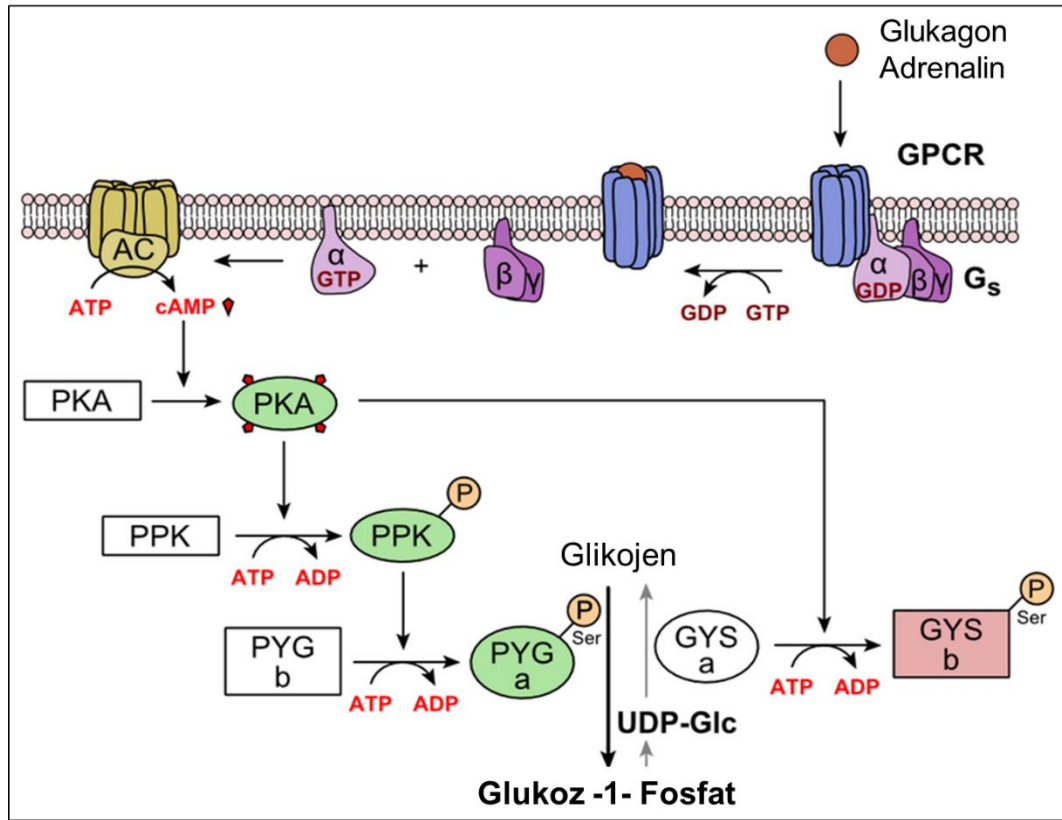


Şekil 8. İnsan GCGR geninin genom lokalizasyonu ve ekson-intron yapıları. (Gen lokasyonu 'LocuID-NCBI' a göre verilmiştir).

İnsan GCGR geni üzerinden 477 amino asit bakiyesinden oluşan, 62 kDa büyüklüğünde membrana bağlı glukagon reseptör proteini kodlanır. Glukagon reseptör proteini, glukagon hormonunun bağlanması ile aktive olan ve G proteini ile eşleşmiş reseptörler (GPCR) ailesi içerisinde sınıflandırılır. Reseptörün uyarılması adenilat siklazın aktive olmasına ve buna bağlı olarak hücre içi cAMP miktarında artışa neden olur. Glukagon reseptörleri vücutta başlıca karaciğer ve böbrek hücrelerinde sentez edilir. Bununla birlikte kalp, yağ dokusu, dalak, timus, böbrek üstü bezleri, pankreas, serebral korteks ve mide bağırsak dokularında glukagon reseptör proteininin düşük düzeyde sentez edildiği saptanmıştır (Dunphy ark. , 1998).

Sıçan glukagon reseptör iyi analiz edilmiş bir proteindir. Bu protein insan glukagon proteini ile % 82 oranında homoloji gösterir. Sıçan glukagon reseptör proteini 485 amino asit bakiyesinden oluşur ve hücre membranında yedi kez geçiş yapan alfa heliks bölgelerine sahiptir. Şekil 9'da memeli organizmalara ait glukagon

proteinleri ile adenil siklaz enziminin aktive edilmesi ve bunun sonucunda hücre içi cAMP konsantrasyonunun artmasıdır. Birçok çalışmanın sonucunda elde edilen bilgilere göre glukagonun adenil siklazı aktive etmesi heterotrimerik protein vasıtasıyla olmaktadır (Birnbaumer, 2007) (Şekil 10). Adenil siklaz sistemleri diğer Gs ile birleştiği zaman şu olaylar gerçekleşir: 1) Gs proteininin alfa alt biriminde GTP için GDP'nin değiştirilmesi; 2) Gs alfa biriminin beta gama kompleksine dönüşmesini tetikleyen GTP bağlı Gs alfa yapılarının konformasyonel olarak değişimi ve bu değişimin sonucu olarak adenil siklaz ile etkileşime girilmesi; 3) GTPaz ve Gs alfa ile Gs alfa bağlı GTP'nin GDP'ye hidrosilinin aktivasyonu sonlandırması; 4) Gs alfa-GDP'nin tekrar beta gama kompleksi oluşturarak yeni döngü aktivasyonunu sağlaması (Sunahara ark. , 1996).



Şekil 10. Glukagon hormonunun glukagon reseptörün eksternal bölgesine bağlanması sonucu hücre içerisinde gerçekleşen reaksiyonlar. PKA: Protein Kinaz A, PPK: Fosforilaz Kinaz, PYG:Glikojen Fosforilaz, GYS:Glikojen Sentaz (<https://en.wiki2.org/wiki/Glucagon> - Erişim tarihi: 15 Nisan 2015)

Hücre içerisinde cAMP konsantrasyonundaki artış, protein kinaz A (cAMP bağımlı protein kinaz)'nın aktive olmasını sağlamaktadır. Aktif protein kinaz enzimi, ATP kullanarak fosforilaz kinaz enzimini fosforile eder. Fosforile edilerek aktive olan fosforilaz kinaz enzimi ise glikojen fosforilazı glukoz-1-fosfatın serbestleşmesinden sorumlu olan glikojen fosforilaz A'ya dönüştürür. Buna ek olarak karaciğer hücrelerinde glikoliz ve glukoneojenezin koordineli işleyişi, glikoliz için potansiyel aktivatör işlevi gören moleküllerin sentezini kataliz eden fruktoz-2,6-bifosfataz gibi enzimlerin fosforilasyon durumlarının ayarlanmasıyla da sağlanır (Hue and Rider, 1987). Glukagon uyarısı sonucu aktive olan protein kinaz A aynı zamanda fruktoz-2,6-bifosfataz, ve fosfofruktokinaz-2 enzimlerinde önemli bir pozisyondaki tek serin amino asit bakiyesini fosforile eder. Glukagon ile başlatılan bu kovalent fosforilasyon olayı fruktoz-2,6-bifosfatazın aktive olmasına, fosfofruktokinaz-2 enziminin ise inhibe olmasına yol açar. Bu durum glikoliz reaksiyonlarının önemli bir basamağını kataliz eden fosfofruktokinaz-1 enzimi için aktivatör görevi gören fruktoz-2,6-bisfosfat sentezi reaksiyonu düzenler. Fruktoz-2,6-bisfosfat'ın sentez hızındaki yavaşlama, glikoliz yolağında bir inhibisyona yol açarken glukoneojenez yolağının etkin işleyişine olanak sağlar (Claus ark. , 1984). Bu süreç glukagon yokluğunda (dolayısıyla insülin varlığı) ters yönde işler.

4.3.2. Hücrelerde glukagon reseptör ekspresyonunun düzenlenmesi

Çeşitli hücre içi ve hücre dışı faktörler genlerin ekspresyonunu etkilerler. Bu durum GCGR geni ekspresyonu için de geçerlidir. Yapılan çalışmalar, hücrelerde sentez edilen glukagon reseptör proteini miktarının koşullara göre değiştiğini göstermiştir. Yirmi dört saat boyunca glukoz etkisinde bırakılan hepatositlerde GCGR mRNA miktarının uygulanan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı, benzer bir sonucun fruktoz ve mannoz gibi monosakkarit ve gliserol ve dihidroksiaseton gibi glukojenik substrat uygulamalarında da görüldüğü belirtilmektedir. Buna karşın, metabolize olmayan L-glukoz ve glukozamin GCGR mRNA düzeyini etkilememektedir (Abrahamsen ark. , 1995). Hepatositlerin 24 saat süre ile farklı dozlarda glukagon etkisinde bırakılmasının doza bağlı olarak GCGR mRNA miktarında azalmaya yol açtığı saptanmıştır. GCGR geni ekspresyon düzeyindeki azalmanın 1 nM glukagon uygulanmasında yaklaşık %30; 100 nM

dozda ise %70 olduğu rapor edilmektedir (Abrahamsen, Lundgren, 1995). Pankreatik adacık hücreleri ile yapılan benzer çalışmalarda glukozun gen anlatımını arttırıcı, cAMP'nin ise azaltan etki yaptığı görülmüştür (Abrahamsen and Nishimura, 1995). Farelerde yapılan deneylerde karaciğer GCGR ekspresyon düzeyinin doğumdan sonra kademeli bir şekilde yetişkinliğe kadar arttığı gösterilmiştir (Burcelin ark. , 1998). Sıçanlarda hiperglisemi, glukoz infizyonu veya streptozotosin uygulaması GCGR ekspresyonunu etkilemektedir.

Streptozotosin ilk kez 1960 yılında *Streptomyces achromogenes*'den izole edilen bir metabolittir. İlk yıllarda antibakteriyal, antitümöral ve karsinolojik özellikleriyle bilinen ajan, 1963' te köpek, kedi ve sıçanlarda diyabetojenik etkili bir madde olarak tanımlanmıştır (Bell and Hye, 1983). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin oksidan maddeler meydana getirerek Langerhans adacıklarını seçici olarak tahrip ederek diyabete yol açtığı belirlenmiştir (Atlan, 2006). Streptozotosin'nin tetiklediği diyabet çalışmalarında hepatositlerdeki GCGR ekspresyon düzeyinde genellikle bir düşüş olduğu belirtilmektedir. Bu verilerden yola çıkarak glukagonun karaciğer GCGR geni ekspresyonu için negatif etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Desbuquois, 1983). Taze hazırlanmış sıçan hepatositleri, primer sıçan kültürleri ve tavuk hepatositlerinin glukagon etkisinde bırakılmasının GCGR ekspresyonunu negatif yönde etkilediği ve bunun da GCGR ekspresyonunda glukagon hormonun direkt etkili olduğu belirtilmektedir (Authier and Desbuquois, 2008).

4.3.3. Glukagon reseptör endositozu ve fosforilasyonu

4.1.1.1'de dolaşımdaki glukagonun karaciğer hücrelerinde parçalanması bahsinde de belirtildiği gibi, hücre membranına bağlı GCGR'lerin endozomal çevrimleri söz konusudur (bk. Şekil 6). GCGR'lerinin endositoz ile hücre içersine alınarak yer değiştirmesi sıçan karaciğer hücrelerinde biyokimyasal yöntemler kullanarak gösterilmiştir (Authier ark. , 1992). Geçici bir süre için radyoaktif işaretili glukagon etkisinde bırakılan sıçanlardan hazırlanan karaciğer homojenatlarında faklı hücre içi fraksiyonlarında [¹²⁵I]iodoglukagon değerleri ölçülmüş ve ölçümler

sonucunda GCGR'nin hücre içi yer değiştirmesinin uygulamadan sonra ilk 12-24 dk içinde maksimuma ulaştığı, %10-20 arasında plazma membranında glukagon bağlanmasında azalmaya sebep olduğu ve iki saat içinde geri dönüşümün gerçekleştiğini göstermiştir (Authier, Desbuquois, 1992). Endozomal fraksiyonlardaki ve plazma membranındaki glukagon bağlanmasında olan değişiklik reseptör afinitesi değişmeksizin reseptör sayısındaki değişiklikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Burcelin, Mrejen, 1998). Glukagon enjeksiyonundan sonra hepatosit hücre endozomlarda 5. ve 45. dakika arasındaki zamana bağlı GCGR içeriği artışı da GCGR'nin hücre içi karboksi terminal bölgesine özgü antikorlar kullanılarak gösterilmiştir (Abrahamsen, Lundgren, 1995, Merlen, Fabrega, 2006, Pospisilik, Hinke, 2001, Unson, Cypess, 1996). Glukagonun bağlanması ile gerçekleşen GCGR endositoz olayında, GCGR proteininin hangi bölgelerinin önemli olduğunu saptamak için doğal ve delesyonlu GCGR genleri ile transfekte edilen CHO hücreleri ile çalışılmıştır (Buggy ark. , 1997). Doğal ve delesyonlu GCGR eksprese edilen hücrelere [¹²⁵I]iodoglukagon uygulanmış, doğal glukagon sentez eden hücrelerde, radyoaktif ligandın yaklaşık %45-50'sinin ilk 10 dakikada hücre içerisine alındığı 45 dakika sonra glukagon endositozunun azaldığı saptanmıştır. Karbosi terminalinde 24 amino asitlik delesyon taşıyan GCGR proteininin hücre içine alım kapasitesinde 10 dakika sonra doğal reseptöre göre %10 azalma saptanmıştır (Buggy, Heurich, 1997). Buna ek olarak, karboksi terminalindeki 47 amino asitten 7 tane Serin bakiyesi Alanine dönüştürülen mutant GCGR'lerinin ligand bağlı hücre içine alımlarda ve fosforilasyonda dramatik bir azalma göstermiştir. Bu da karboksi terminal bölgenin fosforilasyonunun GCGR endositozunda önemli bir role sahip olduğunu gösterir (Buggy, Heurich, 1997).

Yukarıda ayrıntılı olarak ele alındığı gibi, glukoz hücrelerin enerji metabolizmasının merkezinde yer alan önemli bir moleküldür. Dolayısıyla, kan plazmasında glukoz düzeyinin belirli değerler arasında korunması yaşamsal öneme sahiptir. Başta pankreas hücreleri tarafından üretilen insülin ve glukagon olmak üzere çok sayıda hormon kan glukoz düzeyini regüle eder. Vücutta bu hormonların yeteri kadar üretilmemesi, normalden fazla üretilmesi ya da ligand ve reseptörlerinin etkileşimleri ile ilgili olumsuzluklar, glukoz homeostazında bozulmaya ve bunun sonucunda diyabetin ortaya çıkmasına neden olur. Diyabet çoğunlukla insülin

yetersizliği ve glukagon fazlalığı ile karakterize edilen bihormonal bir hastalık olarak değerlendirilir (Cho, Merchant, 2012). Gerek insülin gerekse glukagon hormonu, hedef hücre membranlarında yer alan kendilerine özgü reseptöre bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu tez çalışması kapsamında, kan glukoz homeostazının önemli aktörlerinden olan glukagonun bağlandığı glukagon reseptörü ve glukagon reseptör etkileşimi konusu ele alınmıştır. İnsan glukagon reseptöründeki amino terminal ekstraselüler ligand bağlanma bölgesindeki bazı mutasyonların Tip II diyabet ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir (Hager ark. , 1995). Diyabetin oluşmasında insülin yetersizliği kadar glukagon fazlalığının da önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Unger and Cherrington, 2012). Bu nedenle, rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılarak, özellikle yüksek glukagon seviyesi ve hiperglisemiye sebep olan glukagonoma vakalarında (Cho, Merchant, 2012) kullanım potansiyeline sahip çözünür formda glukagon reseptör proteinleri üretilmiş ve bu proteinlerin glukagon hormonuna olan ilgileri değerlendirilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Agaroz type II: Medium EEO	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Bovin serum albümin	Sigma Aldrich, ABD
Coomassie brilliant blue G-250	Sigma Aldrich, ABD
Dekstroz	Sigma Aldrich, ABD
Dulbecco's modified eagle medium	Difco, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Fetal calf serum	Gibco, Life Technologies
Formaldehit	Merck, Almanya
Fosforik asit	Merck, Almanya
Glasiyel asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Glisin	Sigma Aldrich, ABD
Glukagon	Sigma Aldrich, ABD
Glukagon	Novo Nordisk, Danimarka
Glutation Sepharose	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD

Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
Magnezyum klorür	Merck, Almanya
Magnezyum sülfat	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Maya özütü	Difco, ABD
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD
Opti-MEM	Gibco, Life Technologies
Paraformaldehit	Santa Cruz, ABD
Penisilin/Streptomisin	Sigma Aldrich, ABD
Pipes	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenglikol (PEG)	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin (PEI)	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Protein A Sepharose	Life Technologies
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid (NaN ₃)	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tetrametiletildiamin	Sigma Aldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	Sigma Aldrich, ABD
Tripton	Difco, ABD
Tween 20	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
2-β- Merkaptotetanol (2-ME)	Sigma Aldrich, ABD
293 Fectin	Invitrogen, ABD

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonükleazları:

BamHI, EcoRI, BstXI, Kpn1, EcoRV, EcoO109I (Thermo Scientific Fermentas, Roche veya New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları genlerin klonlanması çalışmalarında ve elde edilen plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri:

T4 polinükleotid kinaz, Alkalen fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase), Klenow Enzimi, T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific Fermentas, Roche veya New England Biolabs), RNaz.

Termostabil DNA polimerazları:

Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, New England Biolabs veya Intron Biotechnology), KOD plus DNA Polimeraz (Toyobo, Japonya) .

5.3. Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, genomik DNA izolasyon kiti (Roche Cat. No.1 814 770), RNA izolasyon kiti (Roche Cat. No. 11 828 665 001), revers (ters) transkripsiyon kiti (Roche Cat. No. 04 379 012 001), orta ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Primer antikorlar: fare orijinli monoklonal anti-HA (Millipore:05-904), tavşan orijinli poliklonal anti-glukagon reseptör (Santa Cruz :H57sc 66912), tavşan orijinli poliklonal anti-glukagon (FL-180 Santa cruz sc-13091), fare orijinli anti-flag (Millipore, MAB3118), fare orijinli anti-Aktin (Millipore:MAB-1501), fare orijinli anti GST (Thermo Sci.- 8-326)

Sekonder antikorlar: keçi anti-fare IgG-biotin konjuge (MilliporeAP124B), keçi anti-tavşan IgG-biotin konjuge (Thermo scintific,31823), keçi anti-fare IgG-FITC

konjuge (Chemican: AB308F), keçi anti-tavşan IgG-FITC konjuge (Millipore: AP307F)

5.5. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Çalkalayıcı Su Banyosu	GFL 1083, Almanya
Çalkalayıcı İnkübatör	N-Biotek, Kore
Bakteriyolojik Etüv	Memmert, Almanya
Su Banyosu	GFL, Almanya
Sterilizatör	Thermo Scientific, Heraeus, Almanya
Dikey Karıştırıcı	Dynal, ABD
Etüv	Binder, Almanya
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Labnet, ABD
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Otoklav	Kermanlar, Türkiye
Sonikasyon Cihazı	Bandelin, Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, ABD
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter, ABD
Steril Çalışma Kabini	Holten, Danimarka
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Ters/Inverted Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Dikey Jel Elektroforez Cihazı	Cleaver Scientific, İngiltere,
pH metre	Sigma, ABD
Flüoresan Mikroskop	Sigma, ABD
Hassas Terazî	Shimadzu, Japonya
PZR Cihazı	Applied Biosystems, ABD
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Steril Çalışma Kabini	Sigma, ABD
Floresan Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Derin dondurucu (-80 °C)	Panasonic, Japonya

Tüp karıştırıcı (Vorteks)
CO₂ Etüv

Heidolph, Almanya
Sanyo, Japonya

5.6. Besiyerleri

5.6.1. Luria Bertani (LB) besiyeri

10 gr tripton, 5 gr maya özütü ve 10 gr sodyum klorür distile su içerisinde çözüldürülerek 1 litreye tamamlandı.

5.6.2. Luria Bertani agar (LBA) besiyeri

LB besiyerine %1.5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

LB ve LBA besiyeri 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 25 dakika otoklavda tutularak steril edildi. İhtiyaç halinde besiyerine 100 µg/ml final konsantrasyonda ampisilin eklendi.

5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde besiyeri olarak glukoz konsantrasyonu 1g/L veya 4.5g/L olan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-LG ve DMEM-HG) (Gibco, ABD) kullanıldı. Önce 4x konsantre stok besiyerleri hazırlandı. Bunun için 10g DMEM-LG ya da 13.4g DMEM-HG deiyonize distile su içerisinde çözüldürülerek 250 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtre ile steril edildi. Hücre üretme besiyerleri, 100 ml 4x konsantre DMEM üzerine 252 ml steril deiyonize distile su, 40 ml FCS (fetal calf serum), 4 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin ve 4 ml % 7.5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.7. Çözeltiler

5.7.1. Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid –a/h)

29.0 g akrilamid ve 1 g bis-akrilamid deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirildi.

5.7.2. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (% 10 – a/h)

1 g amonyum persülfat, deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 10 ml'ye tamamlandı.

5.7.3. Bloklama çözeltisi (%5'lik yağsız süt tozu)

25 g yağsız süt tozu, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x konsantre TBS ve 1 ml %10 sodyum azid (NaN_3) eklendi.

5.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml)

0.1 g etidyum bromür, 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

5.7.5. %70 Etil alkol

70 ml saf etil alkol deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)

73.06 gr EDTA 400 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 500 ml ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi. (EDTA Mw = 292.24)

5.7.7. Fenol : Kloroform : İzoamil alkol (25:24:1)

Kristal halde fenol, 65 °C'da çözüldürüldü ve oksidasyonu önlemek için ortama % 0.1 (a/h) konsantrasyonda 8-hidroksikinolin katıldı. Fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-Cl tamponu (pH 8) eklendi ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, emülsiyon 4 °C'da 60 dakika bekletildi ve üst faz bir su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri >7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık % 90'ı uzaklaştırıldı ve 4 °C'da saklandı (Maniatis, 1989). Yaklaşık pH değeri 8 olan doyurulmuş fenol, 25:24:1 oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanıldı.

5.7.8. 1x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄ ve 4.32 g Na₂HPO₄.7H₂O, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözüldürüldü. pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan T-FTS 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavlandı.

5.7.9. Glukoz çözeltisi (1M)

45 g glukoz, deiyonize distile su içerisinde çözüldürüldükten sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Glukoz Mw:180.16)

5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

75 ml deiyonize distile suya 29.56 g (25 ml) %37'lik (w/w) HCl çözeltisi eklenerek hazırlandı. (Hidroklorik asit. Mw=36.46; 1.186 g/ml)

5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)

69.36 g kalsiyum klorür 100 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti daha sonra otoklavda steril edildi. (Kalsiyum Klorür Mw=110.98)

5.7.12. Kapatma çözeltisi

10 mg parafenilindiamin 1 ml 20 mM Tris tamponunda (pH:8.8) çözündürüldü ve saf gliserin ile 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti karanlıkta -20 °C'da saklandı.

5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0.55M)

27.21 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 250 ml'ye tamamlandı. ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$ Mw=197.9)

5.7.14. %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi

5 g (4.72ml) NP-40, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 50 ml'ye tamamlandı.(NP-40 d=1.06 g/ml)

5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi (%3)

1.5 g paraformaldehit 65 °C'da 10 ml 0.1 N sodyum hidroksit içerisinde çözündürüldü. 3N HCl çözeltisi ile pH'sı 7-7.5 olarak ayarlandı ve hacmi deiyonize distile su ile 40 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 10 ml 5x konsantre PBS eklendi.

5.7.16. PIPES (1,4-piperazindietansülfonik asit) çözeltisi (1M)

15.12 g PIPES, 30 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, NaOH ile pH'sı 7.5'e ayarlandı ve hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı. (PIPES Mw= 302.37)

5.7.17. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 –a/h)

20 g PEG 4000 30 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.45 µm filtreden geçirildi.

5.7.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)

% 40 PEG çözeltisi ve 2.5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

5.7.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml)

50 mg polietilenimin, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 25 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtre ile steril edildi.

5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)

14.72 g potasyum asetat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 50 ml'ye tamamlandı. (Potasyum asetat Mw= 98.14)

5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M)

46.59 g potasyum klorür çözeltisi 100 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 250 ml'ye tamamlandı. (Potasyum Klorür Mw= 74.55)

5.7.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (%7.5)

18.75 g NaHCO₃, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacim 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

5.7.23. %10 Sodyum deoksikolat

10 g sodyum deoksikolat, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h)

25 g SDS deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 250 ml' ye tamamlandı.

5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

40 g sodyum hidroksit deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. (Sodyum hidroksit Mw=39.99)

5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2.5 M)

14.61 g sodyum klorür 50 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı. (Sodyum Klorür Mw=58.44)

5.7.27. %0.25 Tripsin çözeltisi

0.25 g tripsin, 100 ml T-FTS içerisinde çözündürüldü ve 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Çözelti 10 ml'lik hacimler halinde -20 °C'de saklandı.

5.7.28. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0.05 Tripsin, %0.05 EDTA –a/h)

10 ml %0.25 tripsin, 39.5 ml steril T-FTS ve 0.5 ml %5 EDTA karıştırılarak hazırlandı.

5.7.29. %10 Tween-20 (a/h)

5 g (4.5ml) Tween-20, deiyonize distile su ile karıştırılarak hacmi 50 ml'ye tamamlandı. (Tween-20 d=1.11g/ml)

5.7.30. %0.1 Gümüş nitrat çözeltisi (a/h)

2 ml %5'lik gümüş nitrat çözeltisinin hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.31. Görüntüleme çözeltisi (%0.04 formaldehit, %2 sodyum karbonat, %0.0004 sodyum tiyosülfat)

100 µl %37'lik formaldehit, 6.7 ml sodyum karbonat ve 40 µl sodyum tiyosülfat karıştırılarak deiyonize distile su ile hacmi 100 ml olacak şekilde hazırlandı.

5.7.32. Metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi (%50 metanol, %10 glasiyel asetik asit)

50 ml metanol ve 10 ml glasiyel asetik asit deiyonize distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.8. Tamponlar

5.8.1. 5x Konsantre anod tamponu (0.1M Tris-Cl, pH:8.9)

30.25 gr tris 200 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 3M HCl ile 8.9'a ayarlandı. Çözeltinin son hacmi deiyonize distile su ile 250 ml'te tamamlandı.

5.8.2. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8)

45.43 g tris ve 1 g SDS 200 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 3 N HCl ile 8.8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

5.8.3. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M Pipes, 2 ml 2.5 M CaCl₂ ve 20 ml 2.5 M KCl 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M MnCl₂ eklendi, hacmi su ile 200 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm fitreden geçirilerek steril edildi.

5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glukoz, 10 mM EDTA pH:8.0)

6.25 ml 1 M Tris-Cl, 12.5 ml 1 M glukoz ve 5 ml 0.5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

5.8.5. DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS)

Bir hacim 2 N NaOH, bir hacim % 10 SDS çözeltisi ve 8 hacim deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı.

5.8.6. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum: 5 M Asetat)

150 ml 5 M potasyum asetat ve 28.75 ml glasiyel asetik asit deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. (Potasyum Asetat Mw = 98.14)

5.8.7. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6.55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 3.45 ml %87'lik gliserin eklenerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan 6x konsantre DNA yükleme tamponu -20 °C' da saklandı.

5.8.8. Hücre liziz tamponu

2.5 ml 1M Tris-HCl (pH:8), 3 ml 2.5M NaCl ve 1 ml %10'luk NP 40 çözeltisi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Deneylerde kullanımdan hemen önce tampon çözeltisine 1 mM final konsantrasyon olacak şekilde 1M DTT eklendi.

5.8.9. 1x Konsantre katod tamponu (0.1M tris, 0.1M tricine, 0.1M SDS, pH:8.25)

12.1 g tris, 17.92 g tricine ve 1 g SDS 500 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 3M HCl ile 8.25'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

5.8.10. 10x Konsantre MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonik Asit] tamponu

20.9 g MOPS, 250 ml deiyonize distile su içerisinde çözüldürüldü ve pH'sı NaOH ile 7.0'ye ayarlandı. Üzerine 10 ml 1 M sodyum asetat, 10 ml 0.5 M EDTA (pH: 8) eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.45 µm filtreden geçirildi. Çözelti oda sıcaklığında, koyu renkli şişe içerisinde karanlıkta saklandı.

5.8.11. 2x Konsantre NP-40 liziz tamponu

10 ml %10 NP-40 çözeltisi, 10 ml 0.5M tris-HCl tamponu (pH: 8.0) ve 6 ml 2.5M sodyum klorür çözeltisi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı

5.8.12. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8)

6.05 g Tris ve 0.4 g SDS 80 ml deiyonize distile su içinde çözüldürüldü, çözeltinin pH'sı 3 N HCl ile 6.8'e ayarlandı. Son hacim deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5.8.13. Poliakrilamid jel elektroforez tamponu (0.025 M Tris, 0.25 M Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3)

200 ml 5x konsantre Tris Glisin tamponu deiyonize distile su ile 990 ml'ye tamamlandı, üzerine 10 ml % 10 SDS eklendi.

5.8.14. Protein transfer tamponu

200 ml 5x konsantre Tris Glisin tamponu, 100 ml metanol deiyonize distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.15. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; %8 SDS – a/h; %0.2 Bromofenol mavisi – a/h; %4 2-Merkaptoetanol – h/h; %40 Gliserin – h/h; pH:6.8)

0.61 g Tris, 2 g SDS ve 0.05 g bromofenol mavisi, 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve üzerine 1 ml 2-merkaptoetanol ile 11.5 ml %87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandıktan sonra deiyonize distile su ile hacim 25 ml'ye tamamlandı.

5.8.16. 2x Konsantre RIFA tamponu (50 mM Tris, pH:8 ; 5 mM EDTA, pH:8 ; 150 mM NaCl; %1 NP-40 a/h ; %0.5 Sodyum deoksikolat a/h, %10 SDS a/h)

2.5 ml 1M Tris-HCl (pH: 8.0), 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0), 3 ml 2.5M sodyum klorür, 5 ml %10'luk NP-40, 0.5 ml % 10'luk SDS ve 2.5 ml %10'luk sodyum deoksikolat çözeltileri deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.17. Sodyum asetat tamponu (3M)

12.3 g sodyum asetat, 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. pH'sı 5.2'ye ayarlandıktan sonra 50 ml'ye tamamlandı. (Sodyum Asetat Mw:82.03)

5.8.18. 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu

121 g Tris deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 421.5 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 28.5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH:8.0) eklendi. Elektroforez tamponu olarak ya da agaroz jellerin hazırlanmasında 1:50 oranında sulandırılarak kullanıldı.

5.8.19. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0)

60.55 g Tris 400 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 5 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Tris-HCl

tamponu otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Tris Mw=121.1)

5.8.20. Tris/ EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0)

2.5 ml 1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8.0) ve 0.5 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.21. 5x Konsantre Tris-Glisin tamponu (0.125 M Tris, 1.25 M Glisin, pH:8.3)

93.84 g Glisin ve 15.15 g Tris 800 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü. pH'sı 8.3'e ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı. (Glisin Mw:75.07)

5.8.22. 20x Konsantre TBS tamponu

160 gr NaCl, 4 gr KCl ve 60 gr Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml tamamlandı. Tampon 121 °C'da, 1 atmosfer basınç altında, 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.8.23. TBS ve TBS-T tamponu

TBS 50 ml 20x konsantre TBS tamponu, deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. TBS-T tamponu için ortalama 10 ml %10 Tween-20 eklendi.

5.9. Plazmit Vektörler

Çalışmanın farklı aşamalarında pCAGGS, pCHA, pCAGGS-GST ve pCAGGS-p16 plazmit vektörlerinden yararlanıldı. Bu vektörlerden pCAGGS plazmiti (Niwa et al. , 1991) ve bu plazmitten türetilen pCHA (Nagata ark. , 1998) plazmit vektörleri Prof. Dr. Kyosuke Nagata (Tsukuba/Japonya) tarafından verildi. Parazitik bir helmit olan *Schistosoma japonicum*'a ait glutatyon S transferaz (GST) cDNA'sının (Smith and Johnson, 1988) pCAGGS plazmitine klonlanması ile oluşturulmuş pCAGGS-

GST plazmiti Dr. Nagatan'nın laboratuvarında çalışan Dr. Sugiyama Kenji'nin hediyesidir. pCAGGS-p16 plazmit vektörü Turan ve Ata tarafından farklı bir çalışma kapsamında (Turan and Ata, 2011) oluşturulmuştur. Transfeksiyon koşullarının belirlenmesi ve normalizasyonunda pEGFP-N1 (Clontech, ABD) plazmitinden yararlanıldı.

5.10. *Escherichia coli*

Plazmit DNA'ların çoğaltılmasında *E. coli* DH5α bakteri ırkı kullanıldı.

5.11. Memeli Hücre Hatları

Çalışmada HeLa, HEK 293 (insan embriyonik böbrek hücreleri), HepG2 ve PANC-1 (insan pankreas kanser hücreleri) hücre hatları kullanıldı. HeLa hücreleri rahim ağzı kanseri olan Henrietta Lacks'in kanser hücrelerinden George Gey tarafından türetilmiştir (Jones ark. , 1971). İsmi hastanın adı ve soyadından almıştır. Diğer hücre hatlarına nazaran daha uzun süre canlı kalmaları sebebiyle önemli olmuşlardır. PANC-1 hücreleri insan pankreasından elde edilen bir epitelioid karsinom hücre hattıdır (Lieber ark. , 1975). İnsan embriyonik böbrek hücreleri ise, 1970'li yılların başlarında Alex Van der Eb (Graham and van der Eb, 1973) tarafından kültüre edilmiştir. Hızlı çoğalmaları ve transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olması nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır.

5.12. Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada DNA moleküllerinin analizinde % 1-1.5' lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Analiz edilecek DNA moleküllerinin boyutuna göre 1 ya da 1.5 g agar 100 ml 1x konsantre TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 °C'a düştüğünde 0.1-0.2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x konsantre yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit gerilim

altında 20-25 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.13. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalite tayinlerinde spektrofotometrik yöntemlerden yararlanıldı. Örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri, aşağıda verilen formüller uygulanarak miktarları saptandı.

$$DNA \text{ konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \cdot D \cdot K_d$$

$$RNA \text{ konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \cdot D \cdot K_r$$

[OD, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; K_d , (50 $\mu\text{g/ml}$); K_r , (40 $\mu\text{g/ml}$)].

DNA ya da RNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranından yararlanılarak saptandı. (Bu oran kaliteli DNA için ~1.8; RNA için ise ~2.0'dir).

5.14. Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *E. coli* DH5a ırkı kullanıldı. Bu amaçla, -80 °C'da saklanan bakteri stoğundan LBA katı besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 °C'da bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan kültürden tek bir koloni alındı ve 5 ml sıvı LB besiyerine ekim yapıldı. Kültür 37 °C'da 150 dev./dk. çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik doymuş kültür 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 23-25 °C'da 150 dev./dk. çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültür, $OD_{600} = 0.25 - 0.3$ değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C'da 10 dakika, 4.000 dev./dk. hızda santrifüj edilerek bakteriler çöktü. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspansiyon edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 4.000 dev./dk. hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika

ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı.

5.15. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması

Hücreler 10 ml besiyeri içeren 10 cm'lik petri kutularında 37 °C'da, % 5 CO₂ ve % 95 nispi nem içeren etüvde inkübe edildi ve 3-4 gün aralıklarla pasajları yapıldı. Doygun kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve 37 °C'da 5-10 dakika Tripsin:EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler 5 ml besiyerinde süspanse edildi. 0.25-0.5 ml hücre süspanسیونu 10 ml taze besiyeri içeren petrilere aktarıldı ve üremeye bırakıldı. HEK293 hücreleri için yüksek glukozlu besiyeri (D'MEM HG), HeLa, Hep G2 ve PANC-1 hücreleri için ise düşük glukozlu besiyeri (D'MEM LG) kullanıldı.

5.16. İnsan Glukagon Reseptör Geni cDNA'sının Hazırlanması

İnsan glukagon reseptör geni cDNA'sı, Hep G2 hücrelerinden izole edilen total RNA üzerinden reverz transkripsiyon ile elde edildi.

5.16.1. Hep G2 hücrelerinden total RNA'nın izole edilmesi

Hep G2 hücreleri D'MEM besiyeri içeren 6 cm'lik petri kutusuna ortalama 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler standart kültür koşullarında (37 °C, % 5 CO₂ ve % 95 nispi nem) 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelere 5-10 dakika Tripsin:EDTA uygulandı. Hücreler 3 ml besiyerine süspanse edildi. 1.000 dev./dk. hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktüldü. Total RNA'nın izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Roche) kullanıldı. Yöntem olarak üretici firma tarafından önerilen yöntem izlendi. 200 µl PBS (Phosphate buffered saline) içerisinde hazırlanan hücre süspanسیونu ($\sim 5 \times 10^5$ hücre) üzerine 400 µl lizis çözeltisi eklendi ve tüp karıştırıcıda 5-10 saniye karıştırıldı. Elde edilen hücre lizatı kolonlu bir tüpe aktarıldı ve 8.000 dev./dk. hızda 15 saniye santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. DNA kontaminasyonunu önlemek için kolon üzerine DNaz (10 µl DNaz + 90 µl reaksiyon tamponu) eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. RNA bağlı kolon 500 µl yıkama çözeltisi I ve yıkama çözeltisi II ile yıkandı. Son

aşamada kolona 100 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10.000 dev./dk. hızda 1 dakika santrifüj edilerek RNA molekülleri elüe edildi. Elde edilen total RNA, formaldehit içeren agaroz jel ile kontrol edildi ve -80 °C'da saklandı.

5.16.2. Formaldehit içeren agaroz jellerin hazırlanması ve elektroforez

RNA analizlerinde %1.5'lik formaldehitli jeller kullanıldı. Jel hazırlamak için 1.5 g agaroz, 80 ml deiyonize distile su içerisinde kaynatıldı. Üzerine 10 ml 10x konsantre MOPS tamponu eklendi. Çözelti 55-60 °C'a soğutuldu ve 9 ml % 37'lik formaldehit eklendikten sonra yatay jel kasetlerine dökülerek donması sağlandı. Elektroforez işlemi 1x konsantre MOPS tamponu içerisinde gerçekleştirildi. RNA örnekleri eşit hacimlerde 2x konsantre RNA jel yükleme tamponuyla karıştırıldı ve 65 °C'da 10 dakika bekletildikten sonra jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 30 dakikada tamamlandı. RNA moleküllerini görüntülemek için, jeller 0.2 µg/ml konsantrasyon etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 45-60 dakika bekletildi. EtBr kalıntılarını uzaklaştırmak için jeller distile su içerisinde 30 dakika hafifçe karıştırılarak yıkandı ve UV transillüminatör ile analiz edildi.

5.16.3. İnsan glukagon reseptör geni (GCGR) cDNA'sının hazırlanması ve cDNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

Hep G2 hücrelerinden elde edilen total RNA üzerinden oligo dT primeler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA hazırlandı. Reverz transkripsiyon için ticari kit (Roche) kullanıldı. Reaksiyon 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 0.2 ml'lik PZR tüpüne 500 ng total RNA, 50 pikomol oligo dT primer eklendi ve hacim 24 µl'ye tamamlandı. Ortam 65 °C'da 10 dakika tutularak RNA moleküllerinin denatürasyonu sağlandı ve sonrasında buz üzerine alındı. Reaksiyon ortamına sırasıyla 8 µl 5x konsantre reaksiyon tamponu, 2 µl (40U/µl) RNaz inhibitörü, 4 µl (10 mM) dNTP karışımı, 2.2 µl (20U) reverz transkriptaz enzimi eklendi. Reaksiyon karışımı cDNA sentezi için 45 °C'da 60 dakika bekletildi. Daha sonra 10 dakika 80 °C'da tutularak enzimler inaktive edildi. Elde edilen cDNA insan GCGR geninin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı. İnsan GCGR geninin PZR ile

çoğaltılmasında ve dizi analizlerinde kullanılan primerlerin (Tablo 1) oluşturulmasında, NCBI Genom Data Bankası'nda yer alan referans gen dizilerinden yararlanıldı.(*GCGR* / NCBI Ref. No: NM_000160.3)

Tablo 1 İnsan GCGR geni cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında ve bu genin DNA dizi analizlerinde kullanılan oligonükleotid primerler

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
GCGR-For	5'-TTGAATTCCATGCCCCCCTGCCAGCCAC-3'
GCGR-Rev	5'-TTGAATTCTCAGAAGGGGCTCTCAGCCAATC-3'
GCGRsp-For	5'-TTGAATTCATGGCTCAGGTGATGGACTTCCTG-3'
GCGR-ED-Rev	5'-TTGAATTCTCACTGGCACTGGGAGGCATCAC-3'
pCA seq For	5'-GTTCGGCTTCTGGCGTGTGA-3'
pCA seq Rev	5'-CACACCAGCCACCACCTTCT-3'

PZR reaksiyonları 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

Miktar (µl)	Final konsantrasyonları
2 µl cDNA	-
2 µl İleri primer (10 pmol/µl)	0.5 pmol/µl
2 µl Geri primer (10 pmol µl)	0.5 pmol/µl
4 µl dNTP karışımı (2 mM)	0.2 mM
4 µl KOD plus tamponu (x10)	x1
2 µl MgSO ₄ (25 mM)	1.25 mM
Deiyonize distile su	-
0.75 µl KOD plus (1U/µl)	-

Sinyal dizisi kodlamayan GCGR cDNA'sının (GCGR Δ sp) PZR ile çoğaltılmasında GCGRsp-For ve GCGR-Rev primer çifti; glukagon reseptörünün

eksternal bölgesini kodlayan DNA fragmenti'nin (GCGR-ED) çoğaltılmasında ise GCGRsp-For ve GCGR-ED-Rev primer çifti kullanıldı. Sinyal peptidini de kapsayacak şekilde tam boyutta glukagon reseptörü cDNA'sını (GCGR) PZR ile çoğaltmak amacıyla GCGR-For ve GCGR-Rev primer çifti kullanıldı, fakat başarılı sonuç alınamadı. Reaksiyon koşulları; 97 °C'da 3 dakika ön denatürasyon sonrası 30 döngü, 97 °C'da 15 saniye/ 55-60 °C'da 15 saniye/ 68 °C'da 30-60 saniye ve bir döngü 68 °C'da 10 dakika olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.16.4. PZR ile çoğaltılan GCGR Δ sp ve GCGR-ED DNA fragmentlerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve saflaştırılması

PZR ile elde edilen ürünler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktüldü. Bu amaçla, PZR ürünlerinin hacmi 100 μ l'ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol karışımı eklendi ve karıştırıldı. Ortam 14.000 dev./dk. hızda, 20 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi ve -20 °C'da 15-20 dakika bekletildi. DNA molekülleri 4 °C'da 10 dakika 14.000 dev./dk. hızda santrifüj edilerek çöktüldü. DNA çöktüleri 500 μ l % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 90 μ l deiyonize distile suda çözündürüldü. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GCGR cDNA'ları EcoRI restriksiyon endonükleazı ile kesilerek ligasyonda kullanıldı. pCHA plazmit vektörlerine klonlanan cDNA'lar ise EcoRI restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirildi. Bu amaçla DNA örnekleri, üzerine 10 μ l 10x konsantre EcoRI tamponu ve 3 μ l (30U) EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi eklendikten sonra 2-3 saat 37 °C'da su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon sonrası DNA örnekleri yukarıda belirtildiği şekilde tekrar fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktüldü. Çöktü 20 μ l TE tamponu içerisinde çözündürüldü ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Küt uçlu cDNA gerektiren durumlarda DNA çöktüsü 25 μ l deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Örneğin üzerine 3 μ l NEB2 tamponu, 1.5 μ l 2 mM dNTP ve 1 μ l (1U) Klenow enzimi (NEB) eklendi ve 37 °C'da su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra Klenow enzimini inaktive etmek için örnekler 80 °C'da 20 dakika bekletildi.

İnaktivasyon sonrası DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Bunun için DNA örnekleri 1/5 oranında 6x konsantre DNA yükleme tamponu eklendikten sonra % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, 1x konsantre TAE tamponu içerisinde 100 volt sabit dirençte 20-25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası DNA bandı UV ışık altında bir bisturi yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. DNA moleküllerinin jelden kurtarılmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) kullanıldı. İşlemler kit için önerilen yönteme uygun olarak gerçekleştirildi. EcoRI enzimi ile kesilmiş halde DNA fragmentleri 30 µl elüsyon tamponu ile elüe edildikten sonra, ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.17. İnsan Glukagon Geni (GCG) cDNA'sının Hazırlanması ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

İnsan GCG geni cDNA'sının hazırlanmasında, insan pankreas orijinli PANC-1 hücreleri kullanıldı. Glukagon hormonunun pankreas bezinin özelleşmiş bölgesi olan Langerhans adacıklarındaki alfa hücreleri tarafından sentez edilmesi nedeniyle, HeLa, HEK293 ve Hep G2 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden glukagon geninin çoğaltılmasında başarı sağlanamadı. Huang ve arkadaşları (Huang et al. , 2008) uzun süre serum içermeyen besi ortamında inkübe edilen PANC-1 hücrelerinde glukagon transkripsiyonunun belirgin bir şekilde arttığını rapor etmişlerdir. Bu nedenle total RNA izolasyonundan önce PANC-1 hücreleri serum açlığına bırakıldı. PANC-1 hücreleri serumlu DMEM (LG) içeren 6 cm çapında petriye (5×10^5 hücre/petri) ekildi ve 48 saat süre ile standart kültür koşullarında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 30-40 saniye kadar Tripsin-EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler serum içermeyen OPTI-MEM içerisinde 6 gün boyunca 37 °C'da inkübe edildi ve sonrasında total RNA izolasyonunda kullanıldı. Total RNA izolasyonu ve reverz transkripsiyon deneylerinde **5.16.1** ve **5.16.3** 'de belirtilen yöntem izlendi. Elde edilen cDNA GCG geninin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı.

5.17.1. İnsan GCG geni cDNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

İnsan GCG geni PANC-1 hücrelerinden hazırlanan cDNA üzerinden PZR ile çoğaltıldı. Bunun için Tablo 2'de verilen primerler kullanıldı. Primerlerin oluşturulmasında NCBI Genom Data Bankası'nda yer alan referans gen dizilerinden (GCG/NBCI Ref. No:NM_002054.4) yararlanıldı.

Tablo 2 İnsan GCG geni cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında ve bu genin memeli ekspresyon vektörüne klonlanmasında kullanılan oligonükleotid primerler

<u>Primer Adı</u>	<u>Nükleotid Dizisi</u>
Glu-For	5'-ATGCATTCACAGGGCACATTCA-3'
Glu-Rev-plus	5'-TTAGGTATTCATCAACCACTGCA-3'
Glu-Rev-min	5'-GGTATTCATCAACCACTGCA-3'
Flag-For	5'-GATTATAAAGATGATGATAAATGAGAATTC-3'
pCA-Vec-Rev	5'-GGTGGCGGCGAATTCTTTG-3'
pCA-Vec-For	5'-AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATG-3'
GST(gly)-Rev	5'-TCCAGATCCTCCAGATCCGATTTTGGAGGATGGTC-3'

GCG geni cDNA'sının çoğaltılmasında kullanılan primerler PZR öncesinde T4-polinükleotid kinaz enzimi ile fosforile edildi. Bunun için PZR tüpüne 200 pMol (2 µl) primer, 1 µl x10 konsante T4 polinükleotid kinaz tamponu, 0.4 µl 100 mM ATP, 6.2 µl deiyonize distile su ve 1 µl (1U) T4 polinükleotid kinaz enzimi eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Ortam 37 °C'da 1 saat bekletilerek primerlerin fosforile olmaları sağlandı. Enzim inaktivasyonu için reaksiyon ortamı 20 dakika 65 °C'da bekletildi. Fosforile edilen primerler PZR için kullanıldı.

PZR reaksiyonları 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 5.16.3'de verildiği şekilde hazırlandı. Stop kodonu taşıyan GCG cDNA'sının çoğaltılmasında Glu-For ve Glu-Rev-plus primer çifti; stop kodonu taşımayan GCG cDNA'sının çoğaltılmasında ise Glu-For ve Glu-Rev-minus primer çifti kullanıldı. Reaksiyon koşulları; 97 °C'da 3 dakika ön

denatürasyon sonrası 30 döngü, 97 °C'da 15 saniye / 55-60 °C'da 15 saniye/ 68 °C'da 15 saniye ve bir döngü 68 °C'da 5 dakika olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.17.2. PZR ile çoğaltılan GCG cDNA'ların saflaştırılması

PZR ürünleri fenol:kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltileri kurutulduktan sonra 20 µl TE tamponunda çözündürüldü ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bk.5.16.4)

5.18. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Tez çalışması kapsamında, GCGR ve GCG genleri memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pCAGGS veya pCAGGS'den türetilen plazmit vektörlere klonlanarak pCAGGS-GCGRΔsp, pCAGGS-GCGR-ED, pCHA-GCGRΔsp, pCHA-GCGR-ED, pCAGGS-GCGflag ve pCAGGS-GST-GCG vektörleri elde edildi.

5.18.1. pCAGGS-GCGRΔsp ve pCAGGS-GCGR-ED vektörlerinin oluşturulması

Sinyal peptidi taşımayan glukagon reseptör proteini ve bu proteinin sadece eksternal bölgesini kodlayacak vektörleri oluşturmak amacıyla PZR ile çoğaltılan GCGRΔsp ve GCGR-ED DNA fragmentleri pCAGGS vektörüne klonlandı.

5.18.1.1. pCAGGS plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

pCAGGS plazmit DNA'sı EcoRI restriksiyon endonükleazı ile kesilerek doğrusal hale getirildi ve SAP (Shrimp Alkalene Phosphatase) enzimi ile defosforile edildi. Bu işlem için 5 µg DNA deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı. Üzerine 10 µl 10x konsantre EcoRI tamponu, 5U EcoRI enzimi (10U/µl) eklendi. 37 °C'deki su banyosunda 2-3 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'ların kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Kesilen DNA örneği fenol:kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktüldü. Çökelti 45 µl TE içerisinde çözündürülüp, SAP ile defosforile edildi. Bu işlem için örnek üzerine 5 µl 10x konsantre SAP tamponu ve

2U SAP enzimi (1U/ μ l -Fermentas) eklendikten sonra 1 saat 37 °C'da inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA'sı tekrar fenol:kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökteldi. DNA çöktelisi 25 μ l TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanıldı.

5.18.1.2. Doğrusal hale getirilen pCAGGS plazmit DNA'nın GCGR cDNA'ları ile ligasyonu ve transformasyon

5.16.4 ve **5.18.1.1** 'da belirtildiği şekilde hazırlanan pCAGGS, GCGR Δ sp ve GCGR-ED DNA örneklerinin yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon işlemi 10 μ l hacim içerisinde T4-DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 20 ng EcoRI enzimi ile kesilmiş pCAGGS DNA'sı ve yine EcoRI enzimi ile kesilmiş 30 ng GCGR Δ sp veya GCGR-ED cDNA, 2 μ l 10x konsantre T4-ligaz tamponu ve 1U T4-DNA ligaz (invitrogen) karıştırılarak deiyonize distile su ile 10 μ l'ye tamamlandı. Ligasyon 15-16 saat süre ile 15 °C'da PZR cihazında gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Üzerine daha önce **5.14**'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 100 μ l kompetent hücre eklendi ve sırasıyla 15 dakika buz üzerinde, 90 saniye 42 °C'da su banyosunda, 3 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücrelerin üzerine 500 μ l antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. Hücre süspansiyonundan 150 μ l, antibiyotikli LBA besiyerine cam bagetle yayılarak ekildi ve 37 °C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmit alan, transformant bakterilerin oluşturduğu koloniler, koloni-PZR yöntemi rekombinant plazmit bakımından analiz edildi. Doğru plazmit taşıyan kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlandı ve bu kültürlerden küçük ölçekte plazmit DNA'lar izole edildi.

5.18.1.3. pCAGGS-GCGR Δ sp veya pCAGGS-GCGR-ED plazmiti taşıyan bakteri kolonilerinin Koloni-PZR yöntemi ile saptanması

Ligasyon ürünleri ile transformasyon sonucu katı besi yerinde oluşan bakteri kolonilerinden ortalama 8-12 koloni steril kürdan yardımıyla alınıp 5 μ l deiyonize distile su içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin parçalanması için örnekler 95 °C'de 5 dakika bekletildi ve sonrasında buz üzerine alındı. Örneklerin üzerine örnek sayısıyla

orantılı olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımından her bir PZR tüpüne 15 µl eklendi. Reaksiyon karışımı her bir örnek için, 2 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 1 µl hedef bölgesi vektör içerisinde olan ileri primer (pCA seq For), 1 µl hedef bölgesi cDNA içerisinde olan geri primer (GCGR-Rev veya GCGR-ED-Rev), 1 µl dNTP (2mM), 0.2 µl (1U) Taq DNA Polimeraz, 2 µl MgCl₂ (25 mM) ve 8 µl deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı. PZR koşulları 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyon sonra 30 döngü 95 °C'da 15 saniye/ 54 °C'da 15 saniye/ 72 °C'da 60 saniye ve son olarak 1 döngü 72 °C'da 1 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

5.18.1.4. pCAGGS-GCGRΔsp veya pCAGGS-GCGR-ED plazmiti taşıyan bakterilerden küçük ölçekte DNA izolasyonu

Koloni-PZR'de pozitif sonuç veren bakteri kolonilerinden 5 ml doymuş kültür hazırlandı. Bu amaçla bakteriler ampisilin içeren LB besiyerlerine ekildi ve 37 °C'da 180 dev./dk. çalkalama hızındaki çalkalayıcı etüvde 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Hazırlanan doymuş kültürler 4.000 dev./dk. hızda 5 dakika 20 °C'de santrifüj edildi. Çökelti üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde vorteks yardımıyla süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 300 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi, hafifçe karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanmış hücrelerin üzerine 225 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi. Buzda 10-15 dakika bekletildi. İstenmeyen hücre artıkları ve genomik DNA, 4 °C'da 15.000 dev./dk. hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'sı içeren üst sıvı üzerine 600 µl 2-izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 3-5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15.000 dev./dk. hızda 15 °C'da 10 dakika santrifüj edildi. Çökelti 750 µl %70 etil alkol ile yıkandı ve kurutuldu. Kuruduktan sonra 50-100 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri kontrol amaçlı, plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Ön kontrolleri tamamlanan DNA örnekleri PEG/NaCl çözeltilisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.18.2. pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED vektörlerinin oluşturulması

Birlikte immün çöktürme (ing. co-immunoprecipitation) ve Western melezleme çalışmalarında kolaylık sağlayacağı düşüncesi ile hemaglutinin (HA) uzantılı (YPYDVDPDYA) GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinleri kodlayacak plazmit vektörler oluşturuldu. Bu amaçla HA peptidini kodlayan pCHA plazmit vektöründen yararlanıldı.

5.18.2.1. pCHA plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

pCHA plazmit DNA'sı küt uç oluşturan EcoRV restriksiyon endonükleazı ile kesilerek doğrusal hale getirildi ve SAP ile defosforile edildi. Bu deneylerde pCAGGS plazmit vektörünün hazırlanmasında uygulanan yöntem izlendi (bk.5.18.1.1).

5.18.2.2. Doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'nın GCGR cDNA'ları ile ligasyonu ve transformasyon

EcoRV restriksiyon endonükleazı ile doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sı 5.16.4.'de belirtildiği şekilde hazırlanan GCGR Δ sp veya GCGR-ED DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ve transformasyon deneylerinde 5.18.1.2'de ayrıntılı olarak verilen yöntem izlendi. Arzulanan rekombinant plazmitleri taşıyan bakteri kolonileri ilk aşamada koloni-PZR ile belirlendi. Doğru plazmit vektör taşıdıkları saptanan bakteri kolonileri 5 ml sıvı besiyerinde üretildi ve küçük ölçeklerde plazmit DNA'lar hazırlandı (bk.5.18.1.4). Plazmit DNA'lar uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildi ve DNA dizi analizlerinde kullanılmak üzere PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı.

5.18.3. pCAGGS-GCGflag vektörünün oluşturulması

Birlikte immün çöktürme deneylerinde kullanılmak üzere, karboksil ucunda yedi amino asitden oluşan flag uzantılı (DYKDDDK) glukagon peptidi kodlayan plazmit vektörü oluşturuldu. Bunun için daha önce Turan ve Ata (Turan and Ata, 2011)

tarafından oluşturulan ve p16 ile füzyon halinde flag peptidi kodlayan pCAGGS-p16 plazmitinden yararlanıldı.

5.18.3.1. pCAGGS-p16 plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

pCAGGS-p16 plazmit vektörünün doğrusal hale getirilmesinde rutin olarak uygulanan restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi yerine PZR tekniğinden yararlanıldı. pCAGGS-p16 plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, p16 proteinini kodlayan bölgesi dışında kalan plazmit DNA'sı PZR ile çoğaltıldı. Primer olarak Tablo 2'de dizisi verilen Flag-For ve pCA-Vec-Rev primer çifti kullanıldı. PZR reaksiyonları 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 50 ng kalıp DNA kullanılarak **5.16.3**'de verildiği şekilde hazırlandı. Reaksiyon koşulları; 97 °C'da 3 dakika ön denatürasyon sonrası 28 döngü, 97 °C'da 25 saniye / 58 °C'da 15 saniye / 68 °C'da 5 dakika ve bir döngü 68 °C'da 10 dakika olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR ürünü fenol:kloroform ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltisi 20 µl TE içerisinde çözündürüldü ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bk.**5.16.4**).

5.18.3.2. Doğrusal hale getirilen pCAGGS-flag plazmit DNA'nın GCG cDNA'ları ile ligasyonu ve transformasyon

Füzyon halinde GCG-flag kodlayan vektör oluşturmak için PZR ile çoğaltılan pCAGGS-flag plazmiti, stop kodunu taşımayan GCG DNA fragmenti ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ürünleri kompetant *E. coli* hücrelerine transforme edildi ve doğru plazmit vektör taşıyan kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izole edildi (bk.**5.18.1.4**).

5.18.4. pCAGGS-GST-GCG vektörünün oluşturulması

Glutasyon S-transferaz (GST) ile çöktürme deneylerinde kullanılmak üzere glutasyon S-transferaz-glukagon füzyon proteini kodlayan vektör oluşturuldu. Bunun için pCAGGS-GST plazmit vektöründen yararlanıldı.

5.18.4.1. pCAGGS-GST plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

pCAGGS-GST plazmit vektörü de pCAGGS-Flag plazmitinin hazırlanmasında olduğu gibi tüm plazmit DNA'nın PZR ile çoğaltılması ile doğrusal hale getirildi. PZR'da primer olarak pCA-Vec-For ve GST(gly)-Rev (Tablo 2) primerleri kullanıldı. Yöntem olarak **5.18.1.1**'de ayrıntılı olarak verilen yol izlendi.

5.18.4.2. Doğrusal hale getirilen pCAGGS-GST plazmit DNA'nın GCG cDNA'ları ile ligasyonu ve transformasyon

Füzyon halinde GST-GCG kodlayan vektör oluşturmak için PZR ile çoğaltılan pCAGGS-GST plazmiti stop kodonu taşıyan GCG DNA fragmenti ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ürünleri kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi ve doğru plazmit vektör taşıyan kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izole edildi (bk.**5.18.1.4**).

5.18.5. Plazmit DNA'larının PEG/NaCl ile saflaştırılması ve dizi analizleri

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile doğrulukları gösterilen plazmit DNA'ları PEG/NaCl ile çöktürme yöntemiyle kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizine tabi tutuldu. Dizi analizleri ücret karşılığı ticari bir şirkete yaptırıldı. Plazmit DNA'ları saflaştırmak için, deiyonize distile su içerisinde çözüldürülen örnekler üzerine 5 hacim PEG/NaCl (%20/ 1.25M) çözeltisi eklendi ve vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. DNA örnekleri 1 saat buz üzerinde tutuldu. Sonrasında 15.000 dev./dk. hızda 4 °C'da 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve çökelti üzerine 750 µl %70 etanol eklenip karıştırıldı. Örnekler 15.000 dev./dk. hızda 4 °C'da 5 dakika süre ile tekrar santrifüj edildi. DNA çökeltileri kurutuldu ve 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözüldürüldü.

5.19. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucunda doğrulukları kesinleşen plazmit DNA örnekleri orta ölçekte çoğaltıldı ve ileriki deneylerde memeli hücre kültürlerinde kullanılacak kalitede saflaştırıldı. Bu amaçla plazmitler kompetent *E. coli* DH5α

hücrelerine transforme edildi. Plazmit taşıyan bakteri kolonilerinden biri steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 37 °C'da bir gece inkübe edilerek doygun kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 200 ml ampisilin içeren taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C'da 120 dev./dk. çalkalama hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Hazırlanan bakteri kültürleri plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırmasında kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonu ve saflaştırmasında Qiagen orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA 500 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA miktarı ve kalitesi, **5.13**'de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Elde edilen plazmit vektörler, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildi. DNA örnekleri deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.20. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu

GCGR ve GCG cDNA'ları klonlanarak hazırlanan ekspresyon vektörleri veya pEGFP-N1 plazmiti, tezin amacı doğrultusunda gerçekleştirilen deneylerde HEK293 ve/veya HeLa hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyon etkinliği yüksek olan HEK293 hücre hattında transfeksiyon ajanı olarak ticari olarak geliştirilen 293fectin (Invitrogene, Cat. No. 948289) kullanılırken, HeLa hücrelerinin transfeksiyonunda katyonik bir polimer olan polietileniminden (PEI) yararlanıldı. Hücreler deneyin amacına göre 24-kuyulu (5×10^4 hücre/kuyu), 12-kuyulu ($1-2 \times 10^5$ hücre/kuyu) veya 6-kuyulu (5×10^5 hücre/kuyu) plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında (37 °C - %5 CO₂ - %95 nispi nem) 16-24 saat süre ile üremeye bırakıldı. Transfeksiyon deneylerinde 24- kuyulu plaklar için 0.5-1.0 µg; 12-kuyulu plaklar için 1.0-1.5 µg; 6-kuyulu plaklar için ise 2-3 µg plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'lar 20 ng/µl olacak şekilde OPTI-MEM (Gibco, ABD) içerisinde sulandırıldı. 293fectin'i kullandığımız deneylerde 1 µg DNA başına 3 µl 293fectin kullanıldı. 293fectin 1/20 – 1/30 oranında OPTI-MEM içerisinde sulandırıldıktan sonra uygun hacimlerde DNA örnekleri ile karıştırıldı. Karışım yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve besiyerine eklendi. PEI ile gerçekleştirilen transfeksiyon deneylerinde, optimal koşulları belirlemek amacıyla farklı oranlarda DNA/PEI (DNA/PEI oranları: 1/1-5)

karışımları denendi. Bu deneylerde canlı hücrelerde izlenebilen yeşil floresan protein kodlayan pEGFP-N1 plazmitinden yararlanıldı. Plazmit DNA'ları 20 ng/μl konsantrasyonda OPTI-MEM içerisinde sulandırıldı ve yine OPTI-MEM içerisinde sulandırılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlarda PEI çözeltileri ile eşit hacimlerde karıştırıldı. Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücre kültürlerine eklendi. Kùltürler standart kültür koşullarında inkübe edildi. İnkübasyondan 6-8 saat sonra kùltürlerin besiyerleri değıştirildi ve inkübasyona devam edildi. Gerek 293fectin ve gerekse PEI kullanılarak plazmit DNA'lar ile transfekte edilen hücreler, 44-48 saat kùltüre edildikten sonra deney sonuçlarının analizinde kullanıldı.

5.21. Plazmit Vektörler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinde GCGR ve GCG Gen Ekspresyonlarının Western Melezleme Yöntemi İle Kontrolü

pCAGGS ve bu plazmitten türetilen vektörlere klonlanan GCGR ve GCG genlerinin anlatım yapıp yapmadıklarını Western melezleme yöntemiyle incelendi. Bu amaçla plazmit vektörler 12-kuyulu plaklarda üretilen HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Bu hücrelerden hazırlanan protein örnekleri SDS-PAGE veya Tris-Tricine PAGE ile ayrıştırıldı ve Western melezleme yöntemi ile analiz edildi.

5.21.1. Plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatlarının hazırlanması

HEK293 hücreleri D'MEM-HG içeren 12 kuyulu plaklara (2.0×10^5 /kuyu) ekildi ve 24 saat inkübasyondan sonra, her bir kuyudaki hücelere 1,5 μg plazmit DNA'sı ile transfekte edildi (bk. 5.20). 48 saat süre ile standart kültür koşullarında inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve T-FTS ile yıkandı. Hücreler 200 μl RIFA veya NP-40 Tamponu içerisinde silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Toplanan hücre lizatları 15-20 kez insülin enjektöründen geçirildi ve 14.000 dev./dk. hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı ve çökelti ayrıldı ve poliakrilamid jel elektroforezi deneylerinde kullanıldı.

5.21.2. SDS/PAGE için poliakrilamid jellerin hazırlanması

Protein elektroforezi için 100x100x0.8 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller ayırma jeli (%12 veya %15 akrilamid/bis-akrilamid) ve paketleme jeli (%6 akrilamid/bis-akrilamid) olmak üzere iki kısım halinde hazırlandı. Her bir kaset için **Tablo 3**'de verilen karışımlar hazırlandı.

Tablo 3. Jellerin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

	Ayırma Jeli		Paketleme Jeli
	%12'lik Jel	%15'lik Jel	%6'lık Jel
Akrilamid/bis-Akrilamid(%29-%1)	2.0 ml	2.5 ml	0.6 ml
4x Konsantre Ayırma Jeli Tamponu	1.25 ml	1.25 ml	-
4x Konsantre Paketleme Jeli Tamponu	-	-	0.75 ml
Deiyonize Distile Su	1.75 ml	1.25 ml	1.65 ml
APS	25 µl	25 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	4 µl

Kasetlere önce ayırma jelleri döküldü ve üzerine 300-400 µl deiyonize distile su ilave edilerek jel yüzeyinin düzgün polimerize olması sağlandı. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra deiyonize distile su şırınga yardımıyla uzaklaştırıldı. Ayırma jeli üzerine paketleme jeli döküldü ve taraklar yerleştirildi. Bu şekilde üst jelin oda sıcaklığında polimerize olması sağlandı.

5.21.3. Tris-Tricine/PAGE için poliakrilamid jellerin hazırlanması

Küçük molekül ağırlıklı proteinler Tris-Tricine/PAGE ile analiz edildi. Jeller 100x100x0.8 mm kasetlerde (%12 veya %15 akrilamid/bis-akrilamid) ayırma jeli ve paketleme jeli (%6 akrilamid/bis-akrilamid) olarak iki kısım halinde hazırlandı. Her bir kaset için **Tablo 4**'de verilen karışımlar hazırlandı. Kasetlere önce ayırma jeli, daha sonra paketleme jeli döküldü ve polimerize olmaları sağlandı.

Tablo 4. Jellerin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

	Ayrırma Jeli		Paketleme Jeli
	%12'lik Jel	%15'lik Jel	%7.5'lik Jel
Akrilamid/bis-Akrilamid(%29-%1)	2.0 ml	2.5 ml	1.25 ml
3x Konsantre Tris-Cl/SDS Jel Tamponu	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml
Deiyonize Distile Su	1.3 ml	0.8 ml	2.05 ml
APS	25 µl	25 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	4 µl

5.21.4. Proteinlerin akrilamid jellerde yürütülmesi ve nitroselüloz membrana transfer edilmesi

Protein örnekleri SDS/PAGE ile analiz için 1:3 oranında 4x konsantre SDS-örnek yükleme tamponu ile; Tris-Tricine/PAGE için ise 1:1 oranında 2x konsantre Tris-örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 5 dakika 95 °C'da tutularak denatüre edildi. Daha sonra örnekler 7.5 ila 15µl arasında değişen miktarlarda jele yüklendi. Elektroforez tamponu olarak SDS/PAGE için 1x konsantre Tris-Glisin (**3.8.14**) tamponu kullanıldı. Tris-Tricine/PAGE ise **5.8.2** ve **5.8.10**'da içerikleri verilen anod ve katod tamponları içerisinde gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi, her bir jel için 20 dakika 30 volt, daha sonra 75 volt gerilim altında 1-2 saatte tamamlandı. Elektroforez sonrası, jel üzerinde ayrılan proteinler 0.2 µm veya 0.45 µm por çapına sahip nitroselüloz membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "sünger-filtre kağıdı-nitroselüloz membran-jel-filtre kağıdı-sünger" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve ısınmayı önlemek için buz aküleri ile soğutulan ortamda 45 dk 45 voltta ve 60 dk 90 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi.

5.21.5. Membran üzerinde rekombinant proteinlerin görüntülenmesi

Protein transferi işleminden sonra nitroselüloz membranlar, oluşabilecek non-spesifik bağlanmaları önlemek için 2-3 saat bloklama solüsyonunda bekletildi.

Ardından 2-3 saat süre ile 1/250 -1/1000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılarak hazırlanan primer antikorların etkisinde bırakıldı. Primer antikor olarak görüntülenecek proteine bağlı olarak anti-HA (Millipore, 05-904), anti-glukagon reseptör (H57sc Santa cruz,66912), anti-glukagon (FL-180 Santa cruz sc-13091) ya da anti-flag (Millipore, MAB3118) kullanıldı. Membranlar en az 20 dakika üç kez 1x konsantre TBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar 30 dakika süre ile 1/3500 oranında TBS ile sulandırılan biyotinlenmiş keçi anti-tavşan IgG (Thermo scientific, 31823) veya biyotinlenmiş keçi anti-fare IgG antikorları ile (Millipore, AP124B) işleme kondu. Sekonder antikor kalıntılarını uzaklaştırmak için membranlar TBS-T ile 3 kez 20 dakika süre ile yıkandı. Membranlar 20 dakika 20 ml TBS içerisinde 1/3500 oranında sulandırılan SA-HRP ile işleme kondu ve TBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra protein bantları kemilüminesens substrat (Invitrogen, WP20005) ile görüntüledi. Görüntüleme yüksek performanslı jel dokümantasyon sistemleri (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) cihazı kullanıldı.

5.21.6. Poliakrilamid jellerin gümüş boyama yöntemi ile boyanması

Ticari olarak satın alınan glukagon peptidleri (Sigma G2044) %15'lik Tris-Tricine/PAGE ile analiz edildi. Deiyonize distile su içerisinde 2.5 µg/µl konsantrasyonda çözündürülen glukagon eşit hacimde 2x konsantre Trisin örnek tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 30 voltta 20 dakika daha sonra 60 voltta 1 saat sürede tamamlandı. Elektroforez işleminden sonra jel gümüş boyama ile boyandı. Bunun için jel metanol:glasiyel asetik asit çözeltisi (%50:%10) içerisinde 2 saat, daha sonra %50'lik metanol içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Jel 100 ml deiyonize distile su içerisinde hafifçe karıştırılarak 20 dakika süre ile 2 kez yıkandı. Yıkamanın ardından %0.02'lik sodyum tiyosülfat ile 2 dakika muamele edildi ve 100 ml deiyonize distile su ile 2 kez yıkandı. Jel karanlıkta %0.1 gümüş nitrat/%0.074 formaldehit çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi ve deiyoniz distile su içerisinde 2-3 dakika süre ile tekrar yıkandı. Jeller görüntüleme çözeltisinde (%0.04 formaldehit, %2 sodyum karbonat, %0.0004 sodyum tiyosülfat) bekletilerek protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlandı. Jel metanol:glasiyel

asetik asit çözeltisine alınarak reaksiyon durduruldu ve dijital kamera ile görüntüsü alındı.

5.22. Ekspresyon Vektörleri Üzerinden Kodlanan Glukagon Reseptörü ve Glukagon Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmü Floresans Yöntemle İncelenmesi

Tez çalışması kapsamında oluşturulan ekspresyon vektörleri üzerinden kodlanan proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarının saptanmasında HeLa hücreleri kullanıldı. Hücreler 12-kuyulu plaklarda 9 mm çapında yuvarlak lameller üzerinde üretildi. Daha sonra hücreler 5.20'de verildiği gibi PEI kullanılarak plazmit DNA'lar ile transfekte edildi ve 44-48 saat sonra fikse edilerek immü floresan yöntem ile analiz edildi. Lameller üzerinde üretilen plazmit DNA'lar ile transfekte hücreler T-FTS ile 2 kez 10'ar dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra hücreler %3 paraformaldehit içerisinde 15 dakika bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon işleminin sonunda hücreler T-FTS ile 2 kez yıkandı ve 10 dakika oda sıcaklığında T-FTS içerisinde hazırlanan % 0.1' lik Tween-20 etkisinde bırakılarak hücre zarları geçirgen hale getirildi. Sonrasında antikorların istenmeyen bağlanmalarını minimum düzeye indirmek için hücreler T-FTS içerisinde hazırlanmış %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda hücreler %1'lik yağsız süt proteini içerisinde 1/250 oranında sulandırılarak hazırlanan primer antikorlar ile 1 saat muamele edildi. Primer antikor olarak tavşan orijinli poliklonal anti-glukagon antikorları (FL-180 Santa cruz sc-13091) ve anti-glukagon reseptör antikorları (Santa Cruz: H57sc 66912); fare orijinli monoklonal anti-HA ve anti-flag antikorları kullanıldı. Hücreler 3'er kez 5 dakika boyunca T-FTS ile yıkandı. İkinci kez 20 dakika %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde bekletildi ve 1/250 oranında %1'lik yağsız süt proteini içerisinde sulandırılan Alexa-488 (anti fare IgG: MilliporeAP124B) ya da FITC (Fluorescein Isothiocyanate) bağlı sekonder antikor (FITC-anti tavşan IgG – Millipore, AP307F) ile karanlıkta 1 saat muamele edildi. Lamellerin üzerindeki hücreler T-FTS ile 3 kez tekrar yıkandı. Lameller temiz lamlar üzerine damlatılan 2-3 µl kapatma solüsyonu üzerine kapatıldı. Lamellerin çevrelerine şeffaf oje sürüldü. Hazırlanan hücre preparatları DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskopta (Olimpus, Japonya) analiz edildi.

5.23. Glukagon ve Glukagon Reseptör Proteinleri Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması

Memeli hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan sinyal peptidi taşımayan glukagon reseptörü ve glukagon reseptörünün amino-terminal hücre dışı uzantısı ile glukagon peptidi arasındaki olası fiziksel etkileşim glutatyon S-transferaz (GST) ile çöktürme (ing. GST pull down) ve birlikte immün çöktürme (ing. co-immunoprecipitation) yöntemleri ile test edildi.

5.23.1. GST ile çöktürme yöntemi

Bu yöntem ile hücrelerde geçici transfeksiyon sonucu sentez edilen GST-glukagon füzyon proteini ile glukagon reseptör proteinleri arasındaki fiziksel etkileşim araştırıldı. Bu amaçla 6-kuyulu plaklarda üretilen HEK293 hücreleri GST-glukagon peptidi kodlayan pCAGGS-GST-GCG plazmiti, pCAGGS-GCGR Δ sp ya da pCAGGS-GCGR-ED plazmiti ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyonda **5.20**'de belirtilen yöntem izlendi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 300 μ l RIFA tamponu içerisinde parçalandı. Hazırlanan hücre lizatları 15.000 dev./dk. hızda 4 °C'da 5 dakika süre ile tekrar santrifüj edildi. Üst sıvı Glutatyon-Sepharose boncuklar ile çöktürme amaçlı kullanıldı. Bunun için 1.5 ml'lik plastik tüplerde, 200 μ l hücre lizatına 30 μ l hücre liziz tamponu içerisinde yaklaşık 1:1 oranında karıştırılan Glutatyon-Sepharose boncukları eklendi. Örnekler 4 °C'da 2 saat boyunca dikey tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra örnekler 15.000 dev./dk. hızda 3 dakika santrifüj edilerek Glutatyon-Sepharose boncuklar çöktürüldü. Çökelti 500 μ l hücre liziz tamponu içerisinde yeniden süspanse edildi ve 4 °C'de 5 dakika dikey tüp karıştırıcıda karıştırılarak yıkandı. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Son yıkama işleminden sonra çökelti 40 μ l 1x konsantre örnek yükleme tamponunda süspanse edildi. Örnekler 95 °C'da 5 dakika bekletildikten sonra 15.000 dev./dk. hızda santrifüj edildi. Üst sıvıdan alınan örnekler SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bk **5.21**)

5.23.2. Birlikte immün çöktürme

Plazmitler ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinde sentez edilen flag uzantılı glukagon (glukagon-flag) ile glukagon reseptör proteinleri arasındaki ilişki GST ile çöktürme yöntemine benzer bir şekilde birlikte immün çöktürme yöntemi ile araştırıldı. 6-kuyulu plaklarda üretilen hücreler pCAGGS-GCGflag plazmiti ve pCHA-GCGR Δ sp ya da pCHA-GCGR-ED plazmiti ile birlikte transfekte edildi. Transfekte hücreler RIFA tamponunda parçalandı. 1.5 ml'lik plastik tüplerde, 200 μ l hücre lizatına 3 μ l anti-HA antikoru eklendi ve örnekler 4 °C'da 2 saat boyunca dikey tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra hücre lizatına 30 μ l hücre liziz tamponu içerisinde yaklaşık 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan Protein A Sepharose boncukları eklendi. Örnekler 4 °C'da 2 saat boyunca dikey tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Protein A-Sepharose boncuklar GST ile çöktürme yönteminde olduğu gibi hücre liziz tamponu içerisinde yıkandı ve PAGE için hazır hale getirildi. Örnekler SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bk 5.21).

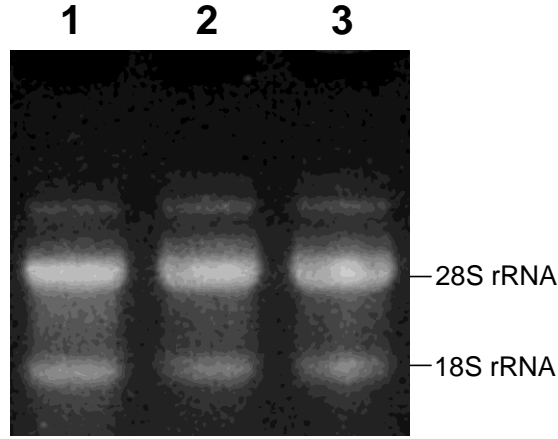
6. BULGULAR

6.1. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Bulgular

Bu tez çalışmasında, hücrelerde sentez edildikten sonra hücre membranına kanalize olmayan, dolayısıyla sitoplazmada serbest formda kalan insan glukagon reseptör proteininin glukagon peptidine olan ilgisinin belirlenmesi hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda, sinyal peptidi kodlamayan glukagon reseptör geni cDNA'sı (GCGR Δ sp) ve glukagon reseptör proteininin hücre dışı kısmını (eksternal bölge) kodlayan cDNA (GCGR-ED), pCAGGS ve pCHA ekspresyon vektörlerine klonlandı. Klonlama sonucunda pCAGGS-GCGR Δ sp, pCAGGS-GCGR-ED, pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED vektörleri elde edildi. Benzer şekilde insan glukagon (CGC) geni de glutatyon S-transferaz (GST) veya flag kodlayan DNA'lar ile kodon çerçevesi içerisinde pCAGGS plazmitine klonlandı ve sonuçta pCAGGS-GST-GCG ve pCAGGS-GCG-flag plazmit vektörleri oluşturuldu.

6.1.1. İnsan Orijinli Hücrelerden Total RNA elde edilmesi ile ilgili veriler

İnsan GCGR cDNA'sı, insan orijinli Hep G2; GCG cDNA'sı ise PANC-1 hücrelerinden hazırlanan total RNA'lar üzerinde reverz transkripsiyon sonucunda elde edildi. Bu amaçla Gereç ve Yöntem kısmında (bk.5.16.1) ayrıntılı olarak verildiği şekilde hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA'ların kalitesi formaldehitli agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 11).



Şekil 11. HepG2 ve PANC-1 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın formaldehit jel elektroforezi ile analizi. 1. HepG2 hücresine; 2 ve 3. PANC-1 hücresine ait RNA örnekleri. RNA örneklerinin incelenmesinde %1.5'lik formaldehitli agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında 30 dakikada tamamlandı. Elektroforez işleminin ardından jel, 0.2 µg/ml konsantrasyon etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 45-60 dakika bekletildi ve UV transillüminatör ile görünür hale getirilerek fotoğrafı çekildi.

Elektroforez sonuçları, total RNA'larda baskın olarak bulunan 18S ve 28S ribozomal RNA'ların herhangi bir yıkıma uğramaksızın tek bant halinde ayrıldıklarını gösterdi ve hazırlanan total RNA'ların, reverz transkripsiyon ile cDNA hazırlamak için kullanılabilir kalitede olduğu saptandı. Hazırlanan total RNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi ve cDNA hazırlamak için kalıp olarak kullanıldı.

6.1.2. İnsan GCGR proteini kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması ile ilgili veriler

Tez çalışması kapsamında insan GCGR cDNA'ları pCAGGS ve pCHA plazmitlerine klonlanarak pCAGGS-GCGR Δ sp, pCAGGS-GCGR-ED, pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmit vektörleri oluşturuldu.

6.1.2.1. İnsan GCGR cDNA'larının hazırlanması ve PZR ile ilgili veriler

Hep G2 hücrelerinden elde edilen RNA üzerinden reverz transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA'ların hazırlandı. Reverz transkripsiyonda oligo dT primerler

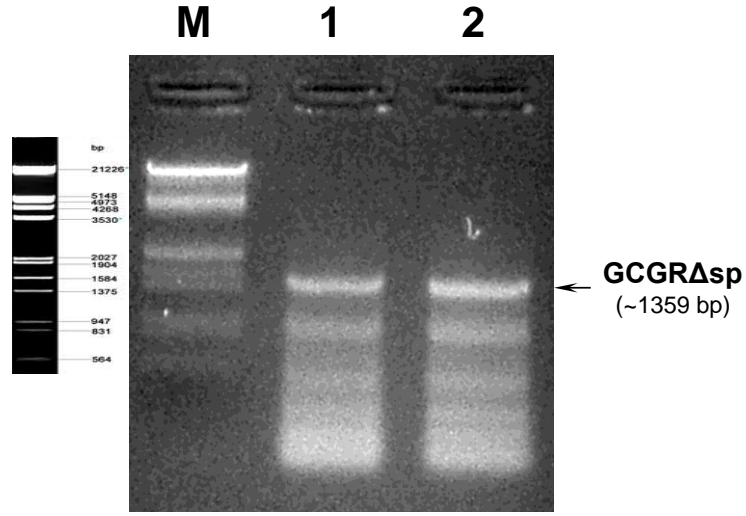
kullanıldı. Aşağıda verilen GCGR referans cDNA'sından (NCBI Ref. No: NM_000160.3) yararlanılarak oluşturulan oligonükleotid primeler ile PZR sonucunda GCGR Δ sp ve GCGR-ED bölgeleri çoğaltıldı (Şekil 12).

İnsan Glukagon Reseptör cDNA'sı (NCBI Ref. No: NM 000160.3):

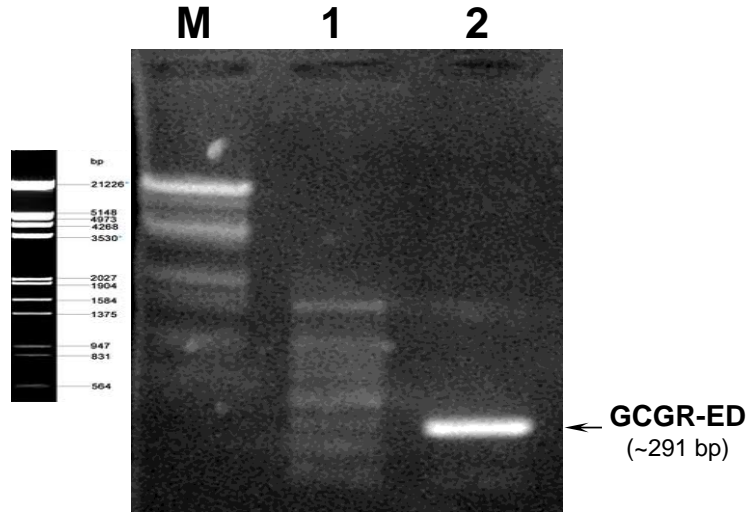
ATGCCCCCTGCCAGCCACAGCGACCCCTGCTGCTGTTGCTGCTGCTGGCCTGCCAGCCACAGGT
CCCCCTCC**GCTCAGGTGATGGACTTCCTGTTTTGAGAAGTGGAAGCTCTACGGTGACCAGTGTCAACCACA**
ACCTGAGCCTGCTGCCCCCTCCACGGAGCTGGTGTGCAACAGAACCTTCGACAAGTATTCCTGCTGG
CCGGACACCCCGCCAATACCACGGCCAACATCTCCTGCCCTGGTACCTGCCTTGGCACCACAAAGT
GCAACACCGCTTCGTGTTCAAGAGATGCGGGCCCGACGGTCAGTGGGTGCGTGGACCCCGGGGCAGC
CTTGGCGTGATGCCTCCAGTGCCAGATGGATGGCGAGGAGATTGAGGTCCAGAAGGAGGTGGCCAAG
ATGTACAGCAGCTTCCAGGTGATGTACACAGTGGGCTACAGCCTGTCCCTGGGGGCCCTGCTCCTCGC
CTTGGCCATCCTGGGGGCCCTCAGCAAGCTGCACTGCACCCGCAATGCCATCCACGCGAATCTGTTTTG
CGTCCTTCGTGCTGAAAGCCAGCTCCGTGCTGGTCATTGATGGGCTGCTCAGGACCCGCTACAGCCAG
AAAATTGGCGACGACCTCAGTGTGACACCTGGCTCAGTGTGAGCGGTGGTGGTGGCTGCCGTGTGGC
CGCGGTGTTTATGCAATATGGCATCGTGGCCAACTACTGCTGGCTGCTGGTGGAGGGCCTGTACCTGC
ACAACCTGCTGGGCCTGGCCACCCTCCCCGAGAGGAGCTTCTTCAGCCTCTACCTGGGCATCGGCTGG
GGTGCCCCCATGCTGTTTCGTGCTCCCTGGGCAGTGGTCAAGTGTCTGTTTCGAGAACGTCCAGTGTG
GACCAGCAATGACAACATGGGCTTCTGGTGGATCCTGCGGTTCCCCGCTTCTCTGGCCATCCTGATCA
ACTTCTTCATCTTCGTCCGCATCGTTCAGCTGCTCGTGGCCAAGCTGCGGGCACGGCAGATGCACCAC
ACAGACTACAAGTTCCGGCTGGCCAAGTCCACGCTGACCCTCATCCCTCTGCTGGGCGTCCACGAAGT
GGTCTTCGCCTTCGTGACGGACGAGCACGCCAGGGCACCCCTGCGCTCCGCCAAGCTCTTCTTCGACC
TCTTCTCAGCTCCTTCCAGGGCCTGCTGGTGGCTGTCTCTACTGCTTCTCAACAAGGAGGTGCAG
TCGGAGCTGCGGCGGCGTTGGCACCGCTGGCGCCTGGGCAAAGTGCTATGGGAGGAGCGGAACACCAG
CAACCACAGGGCCTCATCTTCGCCCCGCCACGGCCCTCCAGCAAGGAGCTGCAGTTTGGGAGGGGTG
GTGGCAGCCAGGATTCATCTGCGGAGACCCCTTGGCTGGTGGCCTCCCTAGATTGGCTGAGAGCCCC
TTC**TGA**

Referans cDNA üzerinde altı çizili açık ve koyu yazılı bölgeyi kapsayan 1359 bp boyutundaki GCGR Δ sp cDNA'sı GCGRsp-For ve GCGR-Rev (bk.Tablo 1) primer çifti kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 13 A). Altı çizili koyu bölgeyi kapsayan 291 bp boyutundaki GCGR-ED cDNA'sı ise GCGRsp-For ve GCGR-ED-Rev (bk.Tablo 1) primer çifti kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 13 B). Agaroz jel elektroforezi ile analiz edilen PZR ürünlerinin beklenen boyutlarda olduğu saptandı.

A



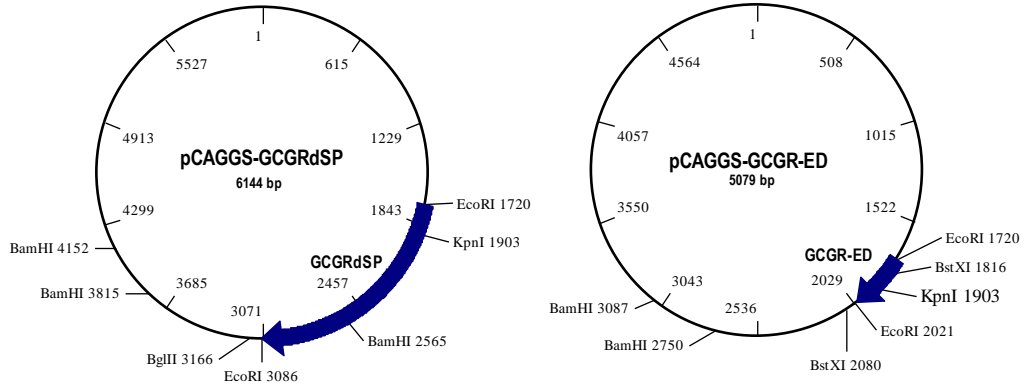
B



Şekil 13. Hep G2 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılan GCGR Δ sp (A) ve GCGR-ED (B) DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. DNA örneklerinin incelenmesinde %1'lik agaroz jeller kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. M. Standart DNA (HindIII ve EcoRI enzimleri ile kesilen Lambda DNA'sı - λ /HindIII+EcoRI).

6.1.2.2. İnsan GCGR cDNA'larının pCAGGS vektörüne klonlanması ve kontrolü ile ilgili veriler

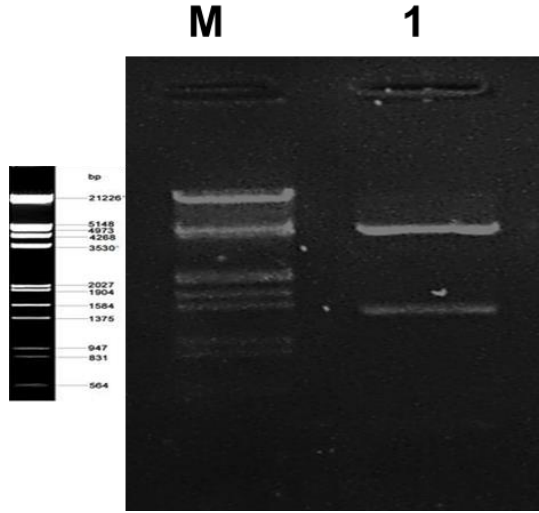
Reverz transkripsiyon / polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile elde edilen GCGR Δ sp ve GCGR-ED cDNA'ları, Gereç ve Yöntemler kısmında (5.16.4) belirtildiği şekilde fenol:kloroform:izoamilalkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktüldü. cDNA'lar EcoRI restriksiyon endonükleazı ile kesildikten sonra agaroz jel ile saflaştırıldı (bk.5.16.4). Saflaştırılan cDNA'lar EcoRI enzimi ile kesilen ve defosforile edilen pCAGGS vektörü ile ligasyona uğrattıldı ve Şekil 14'de haritaları verilen pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörleri elde edildi.



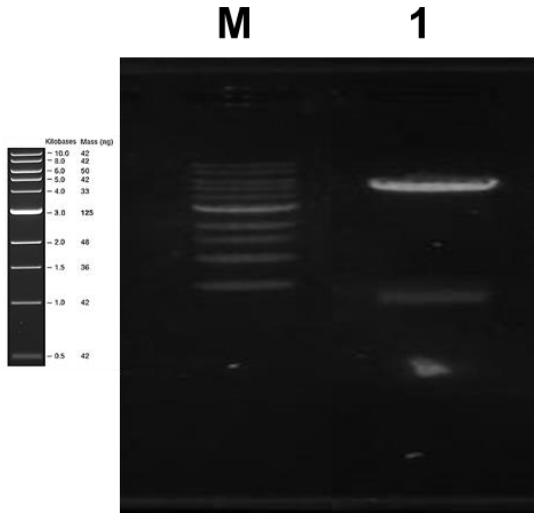
Şekil 14. İnsan glukagon reseptör geni fragmentleri taşıyan pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörleri. Vektör haritaları pCAGGS plazmiti, GCGR Δ sp ve GCGR-ED cDNA'larının nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önüne alınarak BioEdit programı ile çizildi.

Transformasyon sonrası ampisilin içeren LBA besiyerlerinde oluşan transformantlar koloni-PZR ile kontrol edildi. Pozitif reaksiyon veren kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Vektörlerin restriksiyon haritaları göz önüne alınarak pCAGGS-GCGR Δ sp plazmit vektörü BamHI restriksiyon endonükleazı ile pCAGGS-GCGR-ED ise BstXI restriksiyon endonükleazı ile kesildi. pCAGGS-GCGR Δ sp plazmitinin BamHI enzimi ile kesim sonucunda agaroz jel üzerinde 4557, 1250 ve 337 bç'lik beklenen boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi (Şekil 15 A). pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörünün BstXI restriksiyon endonükleazı ile kesimi sonucunda ise 4815 ve 264 bç'lik DNA fragmentleri oluştu (Şekil 15 B).

A



B



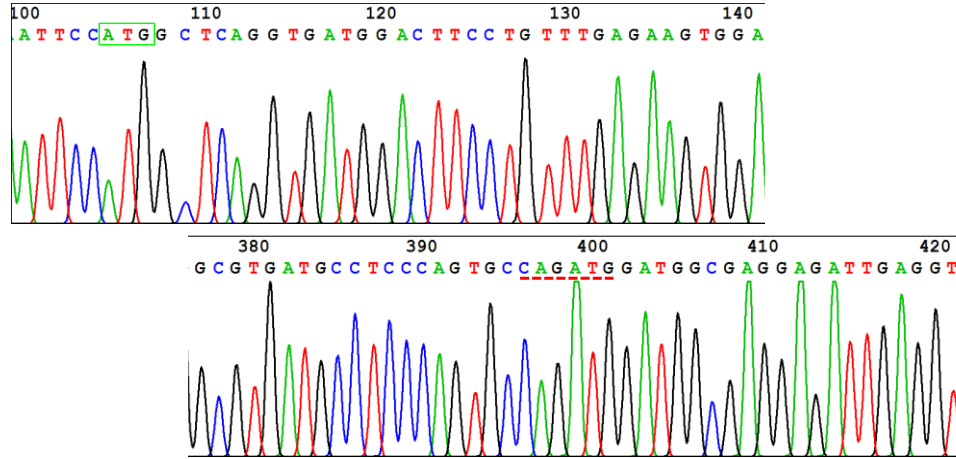
Şekil 15. pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi. A. BamHI restriksiyon endonükleazı ile kesilen pCAGGS-GCGR Δ sp plazmit DNA'sı. B. BstXI restriksiyon endonükleazı ile kesilen PCAGGS-GCGR-ED plazmit DNA'sı. 1. Plazmit DNA örneği. M. Standart DNA (1 kb DNA ladder)

Restriksiyon enzimleri ile kesilerek ön kontrolleri yapılan plazmit DNA'ları, PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizleri ile doğrulukları kesinleştirildi.

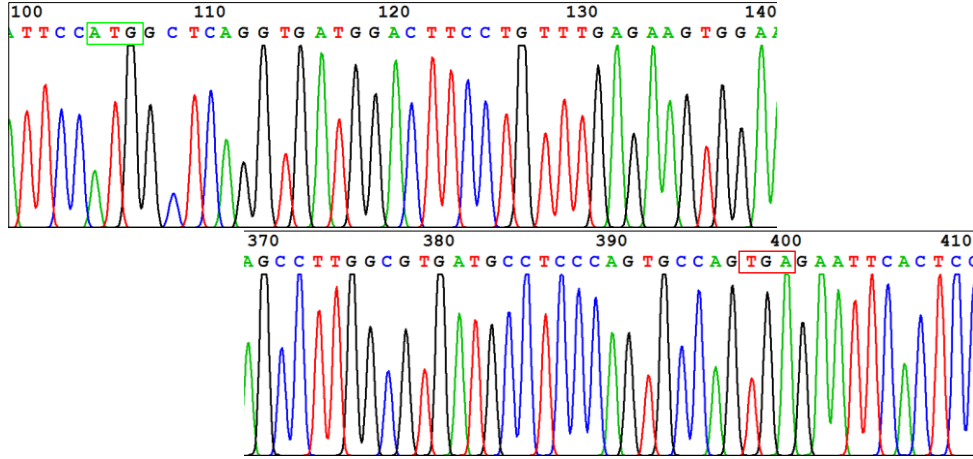
6.1.2.3.DNA dizi analizi sonuçları

Restriksiyon endonükleazları ile kesilerek kontrol edilen pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmit vektörlerinde, GCGR Δ sp ve GCGR-ED genlerinin kesin nükleotid dizileri, Sanger yöntemi ile dizilenerek belirlendi. Sonuçların, teorik olarak tasarlanan vektör yapısıyla aynı olduğu saptandı (Şekil 16).

A



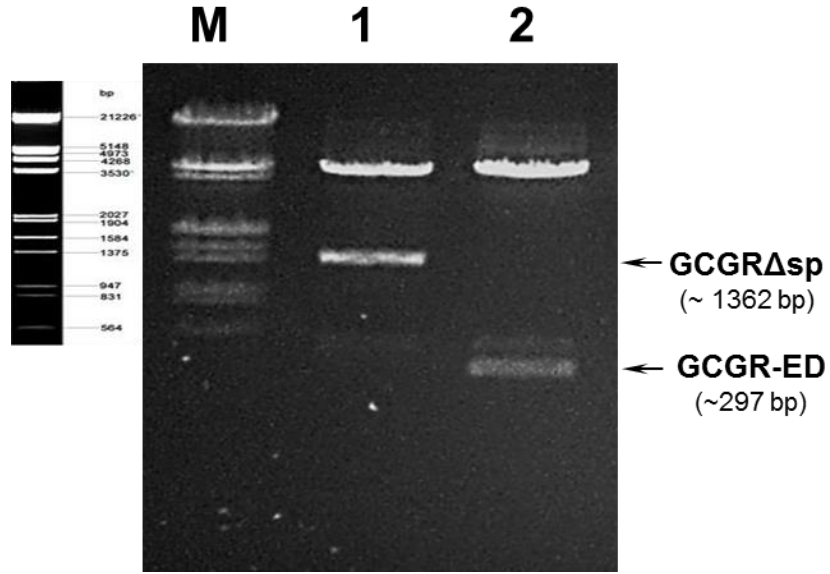
B



Şekil 16. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GCGR Δ sp (A) ve pCAGGS-GCGR-ED (B) DNA fragmentlerinin dizi analizi kromatogramları. pCAGGS-GCGR Δ sp plazmitinde, GCGR Δ sp DNA fragmentinin 3'-bölgesinde yaklaşık 300 bp'lik kısmının dizi analizi yapılmadı. Bu nedenle kromatogramda GCGR Δ sp geninin sadece başlangıç kodonunu da kapsayan 5'- bölgesi verilmiştir. GCGR-ED kromatogramı DNA fragmentinin başlangıç ve bitim kodonlarının kapsayan 5'- ve 3'- bölgeleri verilmiştir.

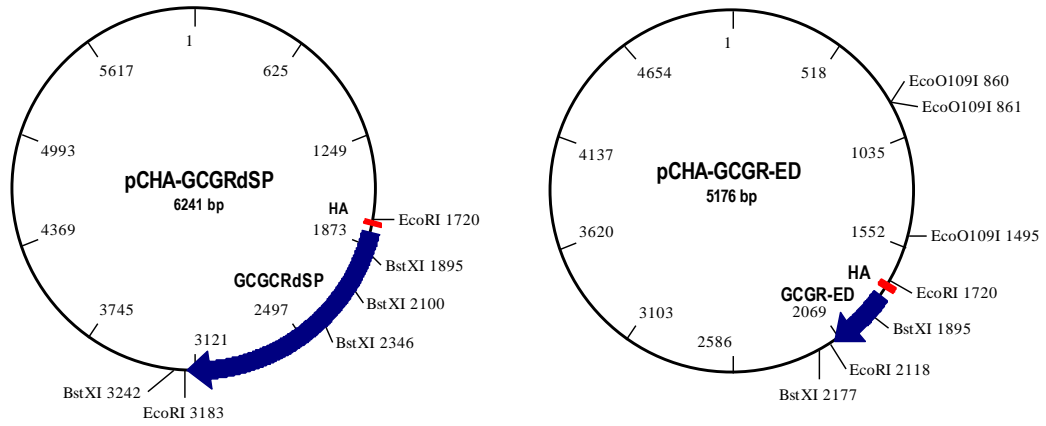
6.1.2.4.İnsan GCGR cDNA'larının pCHA vektörüne klonlanması ve kontrolü ile ilgili veriler

İmmün çöktürme ve Western melezleme yöntemi ile analizlerde avantaj sağlaması nedeniyle GCGR cDNA'ları 5.18.2'de anlatıldığı gibi HA-uzantısı taşıyan pCHA vektörüne aktarıldı. GCGR Δ sp ve GCGR-ED cDNA fragmentleri pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED vektörlerinden EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilerek çıkartıldı (Şekil 17). Kesilen DNA örneklerinin yapışkan uçları Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirildi. Şekil 17'de görülen yaklaşık 1362 bp ve 297 bp boyutlarındaki GCGR Δ sp ve GCGR-ED DNA fragmentleri agaroz jelden kesilerek saflaştırıldı.



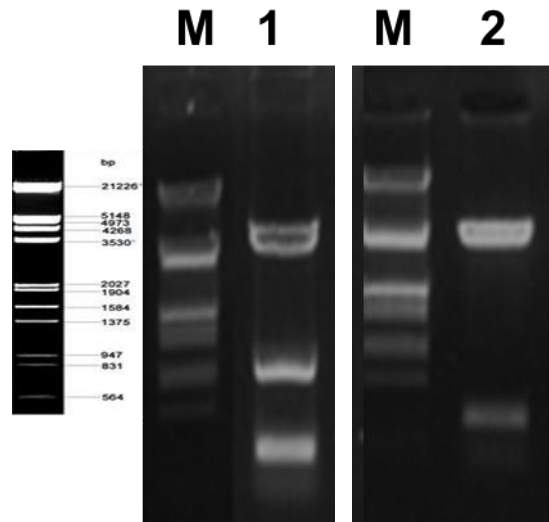
Şekil 17. EcoRI restriksiyon endonükleazları ile kesilen pCAGGS-GCGR Δ sp (1) ve pCAGGS-GCGR-ED (2) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntüsü M. Standart DNA: λ /HindIII+EcoRI

Elde edilen GCGR Δ sp ve GCGR-ED cDNA fragmentleri EcoRV enzimi ile kesilmiş pCHA plazmit vektörü ile ligasyona uğratarak Şekil 18'de restriksiyon haritaları verilen pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED vektörleri elde edildi.



Şekil 18. İnsan glukagon reseptör geni fragmentleri taşıyan pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmit vektörleri. Vektör haritaları pCHA plazmiti, GCGR Δ sp ve GCGR-ED cDNA'larının nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önüne alınarak BioEdit programı ile çizildi.

Elde edilen pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmitleri kompetent *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edildi. Bu hücrelerden hazırlanan kültürlerden orta ölçekte plazmit DNA'ları izole edildi ve saflaştırıldı. pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED DNA örnekleri, bu plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak BstXI enzimi ile kesilerek kontrol edildi (Şekil 19).



Şekil 19. BstXI restriksiyon endonükleazı ile kesilen 1) PCHA-GCGR Δ sp ve 2)PCHA-GCGR-ED plazmit vektörlerinin agaroz jel görüntüleri. DNA örnekleri %1'lik agaroz jel ile analiz edildi. Elektroforez işlemi 100 Volt sabit gerilimde 20 dakikada tamamlandı. M. λ /HindIII+EcoRI.

BstXI enzimi ile kesim sonucunda agaroz jel üzerinde pCHA-GCGR Δ sp için beklenen 4897, 898,246 ve 205 bç'lik DNA bantları; pCHA-GCGR-ED için ise 4898 ve 284 bç'lik DNA fragmentleri elde edildi.

6.1.3. İnsan GCG peptidi kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması ile ilgili veriler

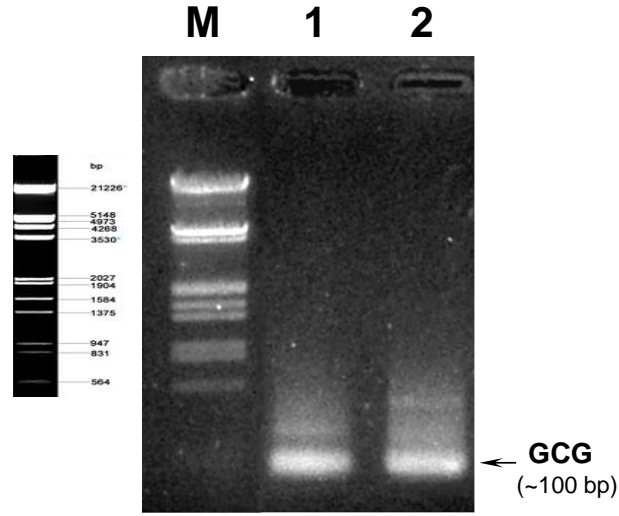
Gereç ve Yöntem kısmında belirtildiği şekilde GCG peptidini GST ya da flag ile füzyon halinde kodlayan pCAGGS-GST-GCG ve pCAGGS-GCGflag plazmit vektörleri oluşturuldu. GCG cDNA'sı PANC-1 hücrelerinden elde edilen total RNA üzerinden RT-PZR ile elde edildi.

6.1.3.1. İnsan GCG cDNA'larının hazırlanması ve PZR ile ilgili veriler

Glukagon cDNA'sı PANC-1 elde edilen total RNA üzerinden reverz transkripsiyon reaksiyonu sonucu elde edildi. Aşağıda verilen *GCG* referans cDNA'sından (NCBI Ref. No: NM_002054.4) yararlanılarak oluşturulan oligonükleotid primeler (bk. **Tablo2**) ile PZR sonucu stop kodonu taşıyan ve stop kodonu taşımayan GCG DNA fragmentleri çoğaltıldı (Şekil 20). GCG peptidini kodlayan bölge referans cDNA üzerinde altı çizili ve koyu renkte verilmiştir.

İnsan Glukagon cDNA'sı (NCBI Ref. No: NM_002054.4):

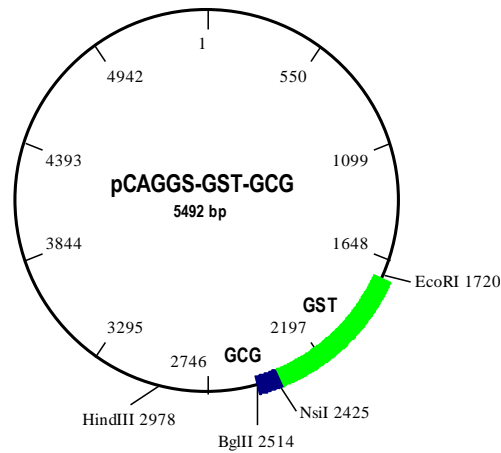
```
ATGAAAAGCATTACTTTGTGGCTGGATTATTTGTAATGCTGGTACAAGGCAGCTGGCAACGTTCCCT
TCAAGACACAGAGGAGAAATCCAGATCATTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATC
AGATGAACGAGGACAAGCGC CATTACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCC
AGGCGTGCCCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAATACCAAAGAGGAACAGGAATAACATTGCCAAACG
TCACGATGAATTTGAGAGACATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCC
AAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAGGCCGAGGAAGGCGAGATTTCCAGAAGAGGTC
GCCATTGTTGAAGAACTTGCCCGCAGACATGCTGATGGTTCTTTCTCTGATGAGATGAACACCATTCT
TGATAATCTTGCCGCCAGGGACTTTATAAACTGGTTGATTCAGACCAAAATCACTGACAGGAAATAA
```



Şekil 20. GCG cDNA'sının PZR ile çoğaltılması. 1. Glu-For ve Glu-Rev-plus primer çifti ile çoğaltılan ve stop kodonu taşıyan GCG cDNA fragmenti. 2. Glu-For ve Glu-Rev-min primer çifti ile çoğaltılan ve stop kodonu taşımayan GCG cDNA fragmenti. M. Standart DNA: λ /HindIII+EcoRI.

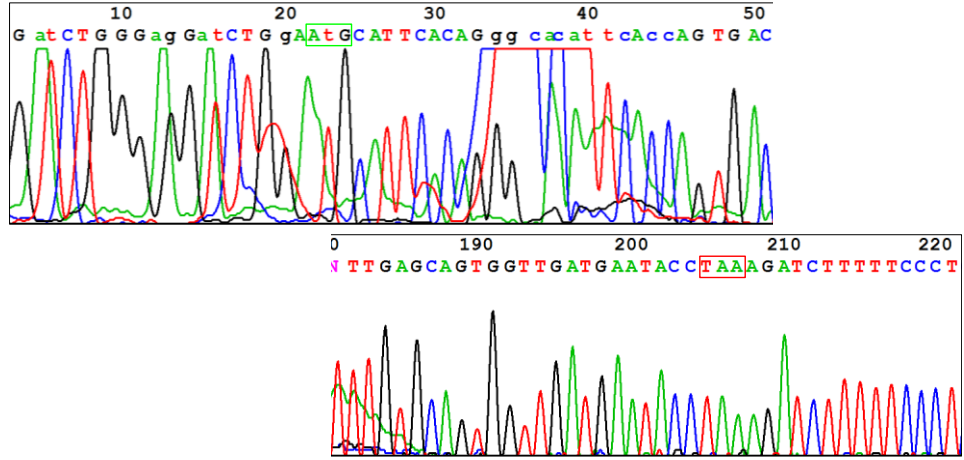
6.1.3.2. pCAGGS-GST-GCG vektörün oluşturulması ve kontrolü ile ilgili veriler

PZR ile çoğaltılan ve stop kodonu taşıyan GCG DNA fragmenti pCAGGS-GST vektörüne GST kodlayan gen ile aynı çerçevede klonlandı ve Şekil 21'de haritası verilen pCAGGS-GST-GCG plazmit vektörü elde edildi.



Şekil 21. GST-GCG fragmenti taşıyan pCAGGS-GST-GCG plazmit vektörü. Vektör haritası pCAGGS ve GST-GCG genlerinin nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önüne alınarak BioEdit programı ile çizildi.

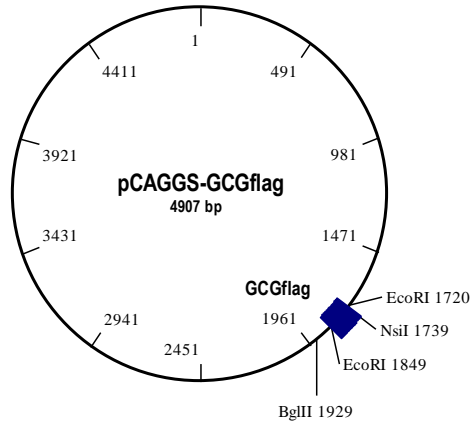
GCG peptidini kodlayan DNA fragmentinin, restriksiyon enzimi ile kesilerek vektörün kontrol edilmesine olanak vermeyecek boyutta küçük olması nedeniyle, plazmit vektörün ön kontrolü PZR ile gerçekleştirildi. Pozitif sonuç veren plazmit DNA örneklerinden biri seçildi ve DNA dizi analizleri ile GCG bölgesinin nükleotid dizisi saptandı (Şekil 22). Dizi analizi sonuçları klonlanan GCG cDNA'sının doğru ve GST geni ile aynı kodon çerçevesi içerisinde olduğunu ortaya koydu.



Şekil 22. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GST-GCG DNA fragmentlerinin dizi analizi kromatogramı. Kromatogramda DNA fragmentinin başlangıç ve bitim kodonlarını kapsayan 5'- ve 3'- bölgeleri verilmiştir.

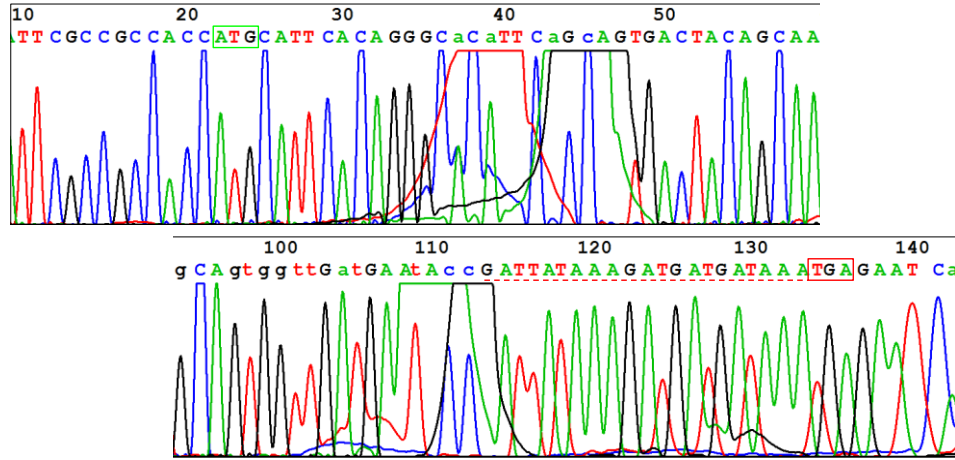
6.1.3.3.pCAGGS-GCGflag vektörün oluşturulması ve kontrolü ile ilgili veriler

Karboksi terminalinde flag uzantılı GCG kodlayan vektör oluşturmak için PZR ile çoğaltılan ve stop kodunu taşımayan GCG cDNA'sı flag kodlayıcı DNA dizisi taşıyan pGAGGS vektörüne klonlandı (bk.5.18.3). Elde edilen vektör pCAGGS-GCGflag olarak adlandırıldı (Şekil 23).



Şekil 23. GCGflag fragmentini taşıyan pCAGGS-GCGflag plazmit vektörü. Vektör haritası pCAGGS ve GCGflag genlerinin nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önüne alınarak BioEdit programı ile çizildi.

pCAGGS-GCGflag vektöründeki GCGflag DNA fragmentinin kesin dizisi DNA dizi analizi ile ortaya kondu (Şekil 24).

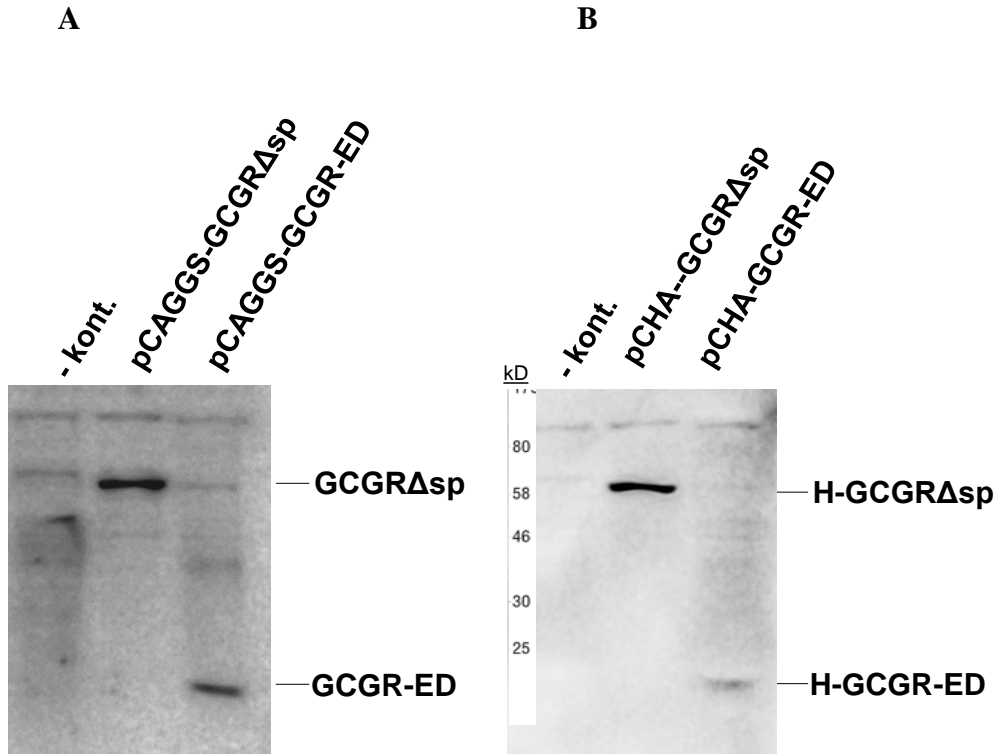


Şekil 24. pCAGGS plazmit vektörüne klonlanan GCGflag DNA fragmentlerinin dizi analizi kromatogramı. Kromatogram DNA fragmentinin başlangıç ve bitim kodonlarının kapsayan 5'- ve 3'- bölgeleri verilmiştir. Altı çizili bölge flag peptidini kodlamaktadır.

6.1.4. Plazmit vektörlere klonlanan *GCGR* ve *GCG* genlerinin ekspresyonlarının western melezleme yöntemi ile analizi

pCAGGS, pCHA ve pCAGGS-GST plazmitlerine klonlanan *GCGR* ve *GCG* genlerinin DNA dizi analizleri yapıldıktan sonra anlatım yapıp yapmadıkları Western melezleme tekniği ile incelendi. Bunun için bu genleri taşıyan vektörler HEK-293 hücrelerine transfekte edildi ve bu hücrelerden hazırlanan protein örnekleri SDS-PAGE/Western melezleme yöntemi ile analiz edildi. Plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatları 5.21.4’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Hücresel proteinler SDS-PAGE ya da Tris-Tricin/PAGE ile ayrıştırıldı (bk.5.21).

pCAGGS-GCGR Δ sp ve pCAGGS-GCGR-ED plazmitleri üzerinden kodlanan *GCGR* proteinlerinin belirlenmesinde primer antikor olarak tavşan orijinli poliklonal anti *GCGR* antikorları kullanıldı. pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmitleri üzerinden kodlanan HA uzantılı proteinler (H-GCGR) ise monoklonal fare orijinli anti-HA antikorları ile işaretlendi (Şekil 25).

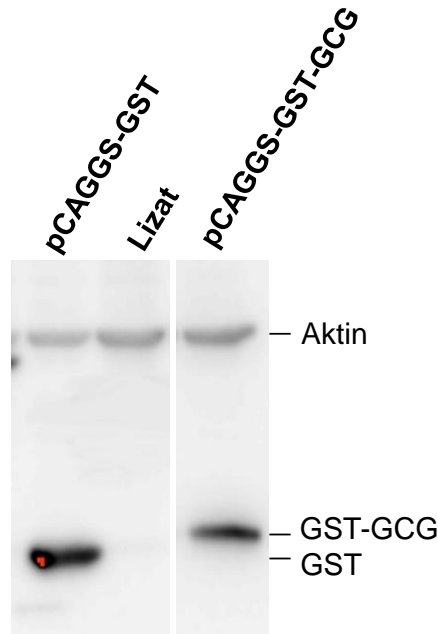


Şekil 25. pCAGGS (A) ve pCHA (B) plazmit vektörleri üzerinden kodlanan *GCGR* proteinlerinin Western melezleme ile analiz edilmesi. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak *GCGR* proteinleri için tavşan orijinli poliklonal anti *GCGR*

antikorları, HA uzantılı proteinler (H-GCGR) için ise monoklonal fare orijinli anti-HA antikorları kullanıldı. Sekonder antikor olarak biyotinlenmiş keçi anti tavşan IgG ve biyotinlenmiş keçi anti fare IgG antikorları kullanıldı. Elektroforez işlemi 5.21.4’de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Protein bantları kemilüminesens substrat ile görüntülendi. Görüntüleme DNR Bio marka jel görüntüleme cihazı kullanıldı. GCGR Δ sp (~51-52 kD) ve GCGR-ED (~10-12 kD) proteinleri poliakrilamid jel üzerinde beklenen büyüklükte bantlar verdi.

İmmün-çöktürme ya da glutatyon S-transferaz (GST) ile çöktürme deneylerinde kullanılmak üzere oluşturulan pCAGGS-GCGflag pCAGGS-GST-GCG vektörleri üzerinden kodlanan GCGflag ve GST-GCG proteinleri de Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Plazmitler HEK-293 hücrelerine transfekte edildi ve bu hücrelerden hazırlanan protein örnekleri Tris-Tricine/SDS PAGE ile ayrıştırıldı. Western melezleme deneylerinde primer antikor olarak GCGflag proteini için monoklonal fare anti-flag antikorları, GST-GCG proteinleri için ise monoklonal fare anti-GST antikorları kullanıldı. pCAGGS-GST-GCG plazmiti ile transfekte edilen HEK-293 hücrelerinde GST-GCG proteinin sentez edildiği saptandı (Şekil 26). Buna karşın GCGflag proteini Western melezleme ile görüntülenemedi.



Şekil 26. pCAGGS-GST-GCG plazmit vektörü üzerinden kodlanan proteinlerin Western melezleme ile analiz edilmesi. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak GST-GCG ve GST proteinleri için fare orijinli monoklonal anti GST; aktin

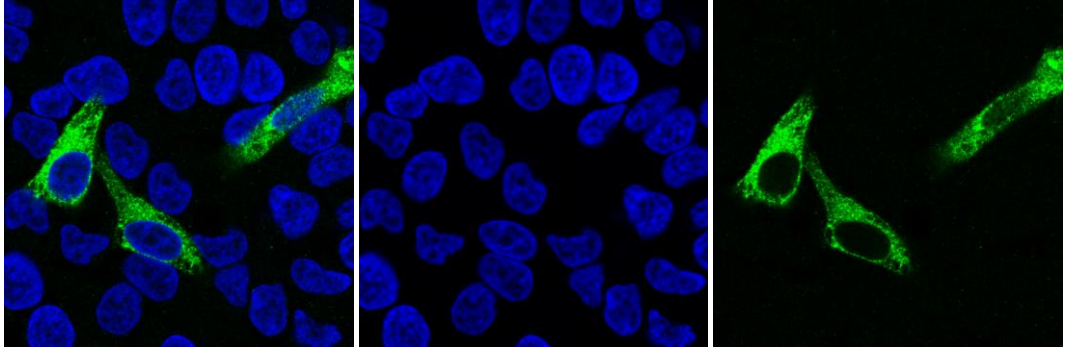
için ise anti-aktin antikorları kullanıldı. Sekonder antikor olarak biyotinlenmiş keçi anti fare IgG antikorları kullanıldı. Elektroforez işlemi 5.21.4'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

6.1.5. Ekspresyon vektörleri üzerinden kodlanan proteinlerin immünfloresans yöntemiyle görüntülenmesine ilişkin veriler

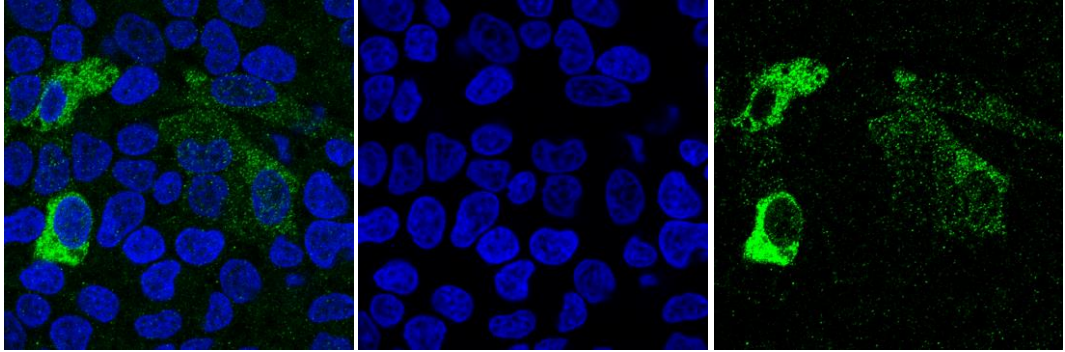
Memeli ekspresyon vektörlerine klonlanan glukagon ve glukagon reseptör genleri tarafından kodlanan proteinlerin hücrelerdeki lokalizasyonları immünfloresans tekniklerden yararlanılarak belirlendi. Bu deneylerde, hücre hattı olarak HeLa hücreleri tercih edildi. Lameller üzerinde üretilen hücreler GCGR ve GCG geni taşıyan plazmit vektörleri ile transfekte edildi ve transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 5.22'de belirtildiği şekilde paraformaldehit ile fikse edilerek immünfloresan işaretleme için hazırlandı.

pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED plazmitleri ile transfekte edilen hücrelerde sentezlenen GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinleri poliklonal tavşan anti-glukagon antikorları ile işaretlendi. Sekonder antikor olarak Alexa488 bağlı anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Floresan mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda sinyal peptidi taşımayan GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinlerinin her ikisinin de baskın olarak hücre sitoplazmasında lokalize olduğu ortaya kondu (Şekil 27).

A



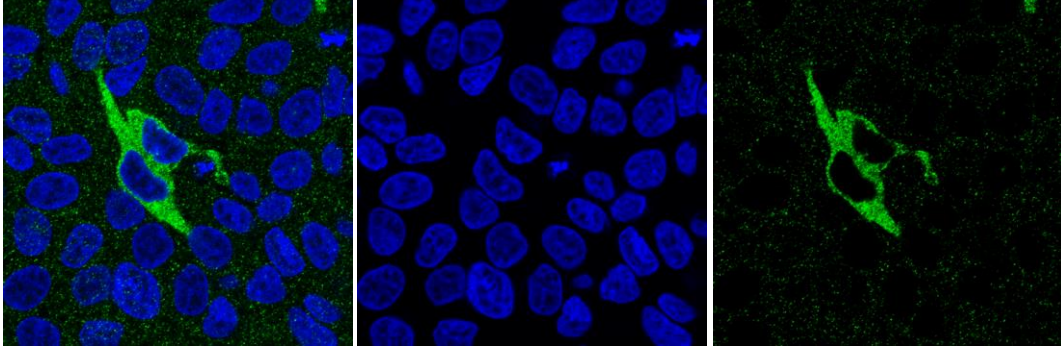
B



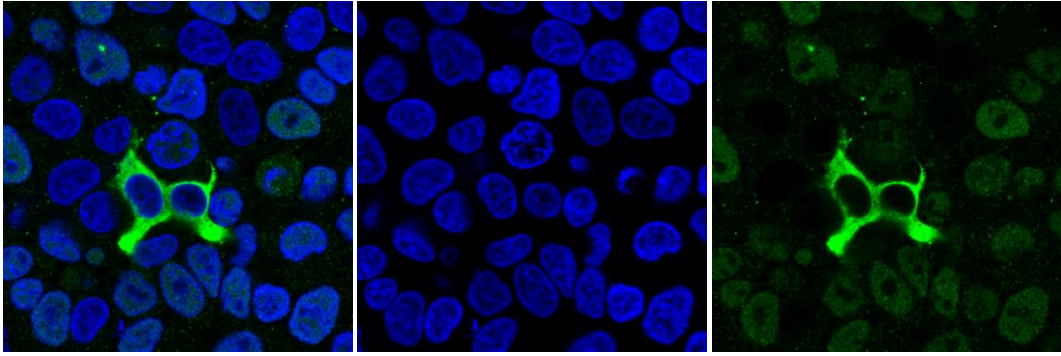
Şekil 27 pCHA-GCGRΔsp (A) ve pCHA-GCGR-ED (B) plazmit vektörleri üzerinden kodlanan HA uzantılı GCGRΔsp ve GCGR-ED proteinlerinin HeLa hücrelerindeki lokalizasyonu. Primer antikor olarak fare orijinli anti-HA antikor ve sekonder antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı.

HeLa hücrelerinde pCAGGS-GCGflag pCAGGS-GST-GCG vektörleri üzerinden kodlanan GCGflag ve GST-GCG proteinlerin lokalizasyonlarının saptanmasında primer antikor olarak monoklonal fare anti-flag ve anti-GST antikorlarından yararlanıldı. Sekonder antikor olarak ise Alexa488 bağlı monoklonal anti-fare antikorları kullanıldı. Floresan işaretleme sonucunda GCGflag ve GST-GCG proteinlerin de GCGR proteinleri gibi hücre sitoplazmasında lokalize olduğu saptandı (Şekil 28).

A



B



Şekil 28 HeLa hücrelerinde sentez edilen GCGflag (A) ve GST-GCG (B) proteinlerinin immünfloresan yöntemle işaretlenmesi. Primer antikor olarak monoklonal fare anti-flag ve anti-GST antikorları, sekonder antikor olarak ise Alexa488 bağlı monoklonal anti-fare antikorları kullanıldı.

6.2. GCGR ve GCG Proteinleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması ile İlgili Bulgular

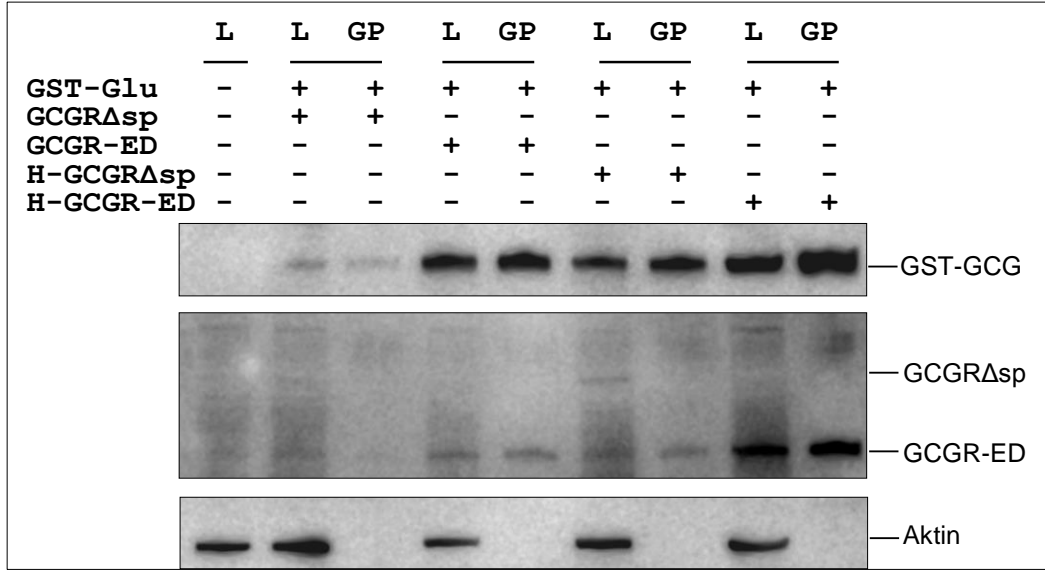
HEK-293 hücrelerinde plazmit transfeksiyonu sonucu sentez edilen sinyal peptid taşımayan GCGR ve GCGR-ED proteinleri ile yine aynı hücrede sentez edilen GCG proteinlerinin (GST-GCG ve GCGflag) fiziksel etkileşim gösterip göstermedikleri GST ile çöktürme ve birlikte immün çöktürme testleri ile araştırıldı.

6.2.1. GST ile çöktürme testleriyle elde edilen sonuçlar

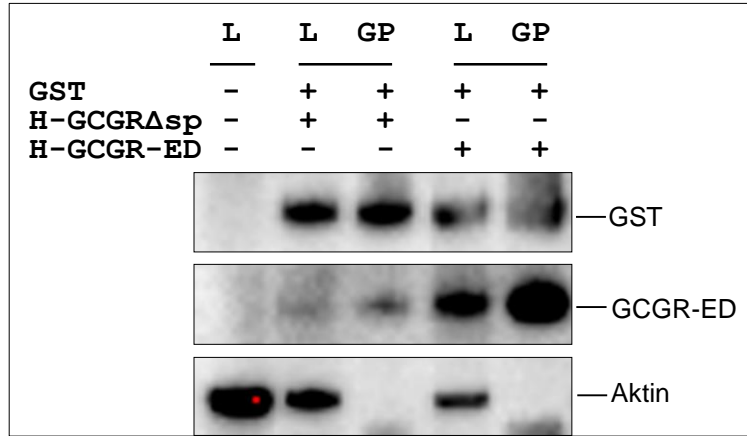
GST ile çöktürme testleri için, HEK293 hücreleri pCAGGS-GST-GCG plazmit vektörü, GCGR Δ sp veya GCGR-ED kodlayan plazmit vektörleri ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden hazırlanan lizatlarda

GST-GCG proteinleri 5.23.1’de belirtildiği gibi GST-Sepharose ile çöktüldü. Çökelen GST-GCG ve olası birlikte çökelen GCGR ve GCGR-ED proteinleri Western melezleme yöntemi ile analiz edildi. Analiz sonuçları Şekil 29’da verildi.

A



B



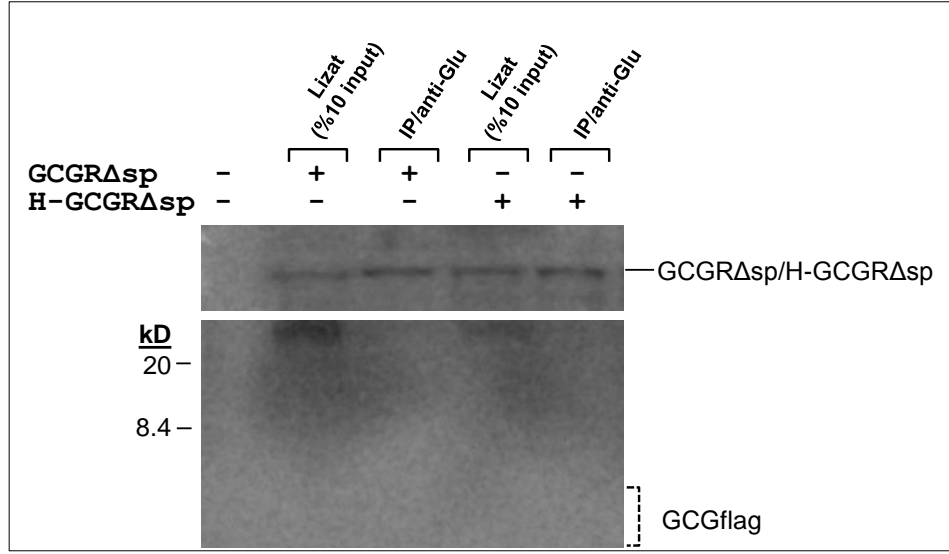
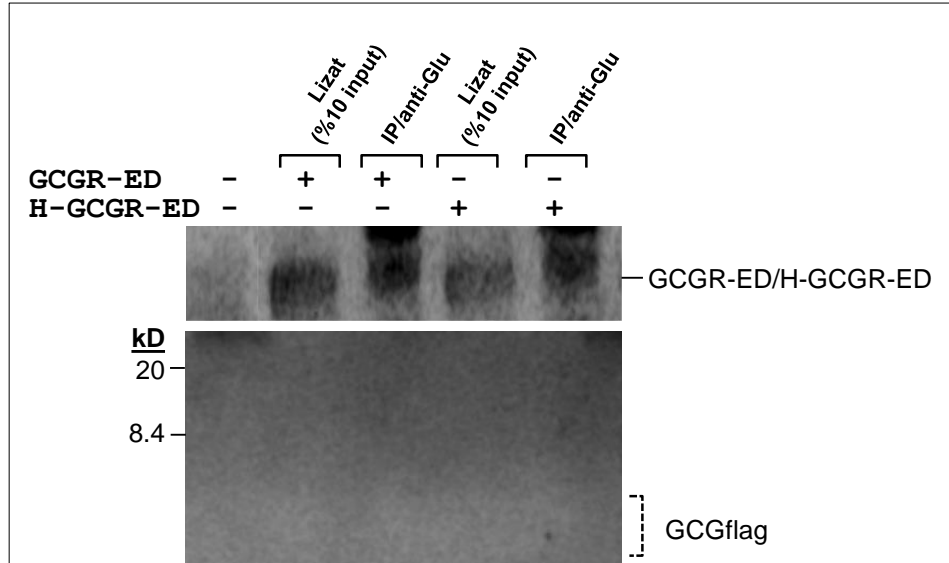
Şekil 29 GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinleri ile GCG arasındaki olası fiziksel etkileşimin GST ile çöktürme yöntemi ile analiz edilmesi. HEK-293 hücreleri şekil üzerinde belirtilen plazmitler ile transfekte edildi. Hücrelerden hazırlanan lizatlar ile 5.23.1’de belirtildiği şekilde GST ile çöktürme işlemi gerçekleştirildi ve Western melezleme ile analiz edildi. Proteinlerin ayrıştırılmasında Tris-Tricine/PAGE kullanıldı. **A.** pCAGGS-GST-GCG ve glukagon reseptör proteinlerini kodlayan

plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde sentezlenen proteinlerin analizi. **B.** pCAGGS-GST (kontrol) ve HA uzantılı glukagon reseptör proteinlerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde sentezlenen proteinlerin analizi. **L.** işlem görmemiş hücre lizatı. **GP.** GST-Sepharose ile çöktürülen protein örnekleri. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare orijinli anti GST ve anti-aktin ve tavşan orijinli anti-GCGR antikorları kullanıldı. Sekonder antikor olarak biyotinlenmiş keçi anti fare IgG veya biyotinlenmiş keçi anti tavşan IgG kullanıldı. Elektroforez işlemi **5.21.4**'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Şekil 29 A' dan da görüldüğü gibi, pCAGGS-GST-GCG ile transfekte edilen tüm hücre lizatları ile yapılan çöktürme deneylerinde GST-GCG proteinlerinin çökeldiği saptandı. GST-GCG proteini ile birlikte çöken GCGR proteinleri incelendiğinde sadece pCHA-GCGR-ED plazmitleri ile transfekte edilen hücre lizatlarında H-GCGR-ED proteinlerinin birlikte çökeldiği saptandı. Bununla birlikte Şekil 29 B'de verilen kontrol deneyi sonuçları, H-GCGR-ED proteininin GCG'den bağımsız olarak da GST proteini ile birlikte çökeldiğini ortaya koydu. GCGR Δ sp'nin ise gerek GST gerekse GST-GCG proteini ile çökemediği saptandı. Dolayısıyla GST ile çöktürme testleri için GST-GCG füzyon proteininin uygun olmadığı sonucuna varıldı.

6.2.2. Birlikte immün çöktürme testleriyle elde edilen sonuçlar

GST ile çöktürme testlerinin olumlu sonuç vermemesi nedeniyle GCG ile GCGR-ED ya da GCGR Δ sp proteinleri arasındaki ilişki birlikte immün çöktürme testleri ile araştırıldı. Bu amaçla HEK-293 hücreleri GCGflag ve GCGR-ED ya da GCGR Δ sp proteinlerini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edildi. Transfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatlar, anti-glukagon ve anti-flag antikorları kullanılarak **5.23.2**'de ayrıntılı verilen işlemlerden geçirildi ve SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Poliklonal tavşan anti-glukagon antikorları ile gerçekleştirilen immün çöktürme deney sonuçları Şekil 30' da verildi.

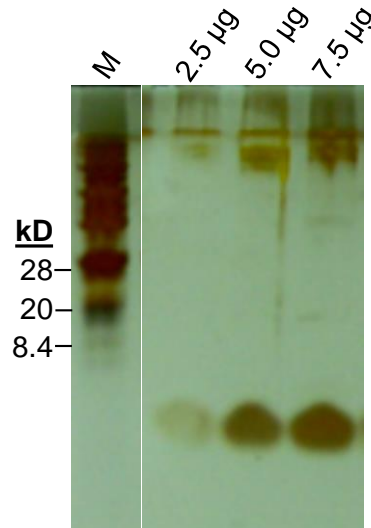
A**B**

Şekil 30. pCAGGS-GCGflag plazmiti, GCGRΔsp (A) ya da GCGR-ED kodlayan (B) plazmit ile birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Birlikte immün çöktürme işlemi 5.23.2'de belirtildiği şekilde, anti-GCGR antikorları kullanılarak gerçekleştirildi. Proteinler SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare orijinli anti-flag ve tavşan orijinli anti-GCGR antikorları; sekonder antikor olarak ise biyotinlenmiş keçi anti fare IgG ve biyotinlenmiş keçi anti tavşan IgG antikorları kullanıldı. Elektroferez işlemi 5.21.4'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Şekil 30'da verilen sonuçlar, hem GCGR Δ sp hem de GCGR-ED proteinlerinin anti-glukagon antikoru ile çöktüğünü gösterdi. Bununla birlikte immün çöktürme işlemine tabi tutulan örneklerde GCGflag proteinleri belirlenemedi. Fare monoklonal anti-flag antikoru ile yapılan çöktürme deneylerinden istenilen sonuçlar alınamadı.

6.3. Ticari Rekombinant GCG Peptidinin Elektroforetik Analizi ile İlgili Bulgular

GCG peptidi 29 amino asitten oluşan, 3.48 kD ağırlığında bir moleküldür. Küçük molekül ağırlıklı peptidler ile ilgili yapılan Western melezleme deneylerinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri, jelde ayrıştırılan peptidlerin membranlara transferi sırasında kaybedilmesidir. Bu nedenle, sentetik olarak üretilen ticari GCG peptidinin (Sigma;G2044) elektroforez sonrası jel üzerinde görüntülenebilirliği değerlendirildi. Bunun için, deiyonize distile su içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda çözündürülerek hazırlanan GCG peptit örneğinden belirli miktarlarda %15'lik jelle uygulandı ve ayrıştırıldı. Daha sonra jel gümüş boyama yöntemi ile boyandı. Bu yöntem 5.21.6'de ayrıntılı olarak belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Deney sonucu Şekil 31'de verildi. Şekil 31'den de görüldüğü gibi, GCG peptidlerinin %15'lik akrilamid jel ile ayrıştırılıp görüntülenebildiği saptandı.



Şekil 31. Ticari GCG peptidlerinin SDS-PAGE ile incelenmesi. Her bir cebe şekil üzerinde belirtilen miktarlarda örnek uygulandı. Deneyde %15'lik jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 30 voltta 20 dakika daha sonra 60 voltta 1 saat sürede gerçekleştirildi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glukagon pankreas bezinde, Langerhans adacıklarındaki alfa hücreleri tarafından üretilen 29 amino asit bakiyesinden oluşan peptid hormondur. Pankreas tarafından kana glukagon salgılanması, insülinin aksine kan glukoz düzeyini arttırıcı etki gösterir. Bu etki, karaciğer hücrelerinde glikojen şeklinde depolanan glukozun, glikojenoliz reaksiyonları ile serbest kalması sonucunda ortaya çıkar. Karaciğer hücrelerinde glikojenoliz reaksiyonlarının tetiklenmesi, glukagon hormonunun hücre membranlarında yer alan glukagon reseptörlerine bağlanması ile gerçekleşir (Nelson DL, 2005). Dolayısıyla, kan glukoz düzeyinin regüle edilmesinde glukagon hormonu kadar, bu hormona özgü reseptörü olan glukagon reseptörü de önemli bir rol üstlenir.

Bu tez çalışmasına konu olan glukagon reseptörü yaklaşık 62 kD ağırlığında, glukagon hormonunun bağlanmasıyla aktive olan bir membran proteindir. Bu protein B sınıfı G-proteini ile eşleşmiş reseptörler (*İng. G protein-coupled receptors - GPCRs*) ailesi içerisinde sınıflandırılır (Brubaker and Drucker, 2002). Glukagon reseptörünün, glukagon hormonu ile uyarılması adenilat siklaz enzimini aktive ederek hücre içerisinde cAMP düzeyinin artmasına neden olur. cAMP düzeyindeki artış, glikojenoliz reaksiyonları için sinyal görevi görür. GPCR'ler, hücre membranını yedi kez geçen transmembran bölgesi, hücre dışında yer alan ve reseptörün bağlanmasında birincil işlev gören hücre dışı (eksternal) amino-terminal bölge ve hücre içerisinde yer alan (internal) karboksi-terminal bölgeler ile karakterize edilir. Ortak bir yapıya sahip olmalarına karşın, GPCR'ler, birçok farklı G proteinleri ve diğer hücre içi ve membran ilişkili sinyalizasyon ve iskelet proteinleri ile etkileşim halindedir (Brubaker and Drucker, 2002, Siu ark. , 2013). Bu sebeple hücreli ilişkilerde farklı mekanizmalar kullanırlar.

GPCR'ler, yapısal ve ligand bağlanma özelliklerine göre altı farklı grup halinde sınıflandırılırlar (Kolakowski, 1994). Bu GPCR ailesi içinde sınıf II olarak da bilinen, B sınıfı reseptörler diyabet, obezite ve diğer endokrin hastalıklarının tedavisinde aday proteinlerdir (Harmar, 2001, Mayo, Miller, 2003). B sınıfı GPCR proteinleri de kendi içerisinde B1, B2 ve B3 alt gruplarına ayrılmıştır. İnsanlarda B1 alt grubu 15 hormon reseptöründen oluşmaktadır (Harmar, 2001). Bu reseptörler polipeptid hormonlar ve diğer ligandlar ile yapısal olarak ilişkilidir. Bu alt grup içerisinde yer alan glukagon reseptör ailesi proglukagon gen ürünleri (glukagon,

sekretin, GLP-1, GLP-2), GIP ve GHRH için hedef görevi görür (Mayo, Miller, 2003).

Kan glukoz düzeyinin regülasyonunda iş gören hormonlar ve bu hormonların kendi reseptörleriyle etkileşimlerindeki anormalliklere bağlı olarak çıkan diyabetin tedavisinde, glukagon ve glukagon reseptör antagonistlerinin önemli bir potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur (Johnson, Goebel, 1982). Bu nedenle özellikle glukagon reseptörünün işlevini bloke edecek glukagon reseptör antagonistleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bir diğer yaklaşım, glukagona özgü monoklonal antikörlerin kullanılması ve normalden yüksek düzeylerde sentez edildiği durumlarda glukagonun nötralize edilmesidir (Brand, Rolin, 1994). Bununla ilişkili olarak gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da, insan glukagon reseptör geninin, proteinlerin endoplazmik retikuluma, dolayısıyla membrana kanalize olmasında işlev gördüğü düşünülen sinyal (lider) peptidi kodlamayan (GCGR Δ sp) ve sadece hücre dışı (eksternal) bölgesini (GCGR-ED) kodlayan kısımları memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pCAGGS ve pCHA plazmit vektörlerine klonlandı. Bu vektörler üzerinden kodlanan glukagon reseptör proteinlerinin glukagon ile etkileşimleri değerlendirildi.

Glukagon reseptörü cDNA'sının hazırlanmasında, insan karaciğer hücrelerinden orijinli Hep G2 hücre hattından yararlanıldı. Hücrelerden hazırlanan total RNA üzerinden (Şekil 11), reverz transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA'lar elde edildi. Hep G2 cDNA'ları ve insan glukagon reseptör genine özgü primerler kullanılarak, sinyal peptidi taşımayan glukagon reseptör proteini (453 amino asit) ve proteinin eksternal bölgesini (98 amino asit) kodlayan gen bölgeleri PZR ile çoğaltıldı (Şekil 13). Sinyal peptid dizisini de içeren 477 amino asit bakiyesinden oluşan, doğal glukagon proteini kodlayacak cDNA fragmentinin de, kontrol amaçlı kullanılmak üzere PZR ile çoğaltılması ve klonlanması amaçlandı. Bununla birlikte farklı koşullarda gerçekleştirilen PZR deneylerinde olumlu sonuç alınmadığı için doğal glukagon reseptör proteini kodlayan ekspresyon vektörü oluşturulmadı. Sinyal peptid kodlayıcı diziler taşımayan glukagon reseptör geni ve eksternal bölgeyi kodlayan gen parçası pCAGGS ve pCHA plazmit vektörlerine klonlanarak pCAGGS-GCGR Δ sp, pCAGGS-GCGR-ED, pCHA-GCGR Δ sp ve pCHA-GCGR-ED vektörleri oluşturuldu (Şekil 14 ve 18). Ekspresyon vektörlerinin doğrulukları

restriksiyon enzimleri ile kesilerek yapılan ön kontroller sonrası (Şekil 15, 17 ve 19), DNA dizi analizleri ile ortaya kondu (Şekil 16).

Sinyal peptidi taşımayan glukagon reseptör proteini ve eksternal bölgesini kodlayan gen bölgelerinin seçilmesinde, iki farklı konu ile ilgili bilimsel verilerden yararlandı. Bunlardan birincisi, hücrelerde protein trafiğinin düzenlenmesinde işlev gördüğü düşünülen ve birçok çalışmada da kanıtlanan sinyal hipotezi (Schutze ark. , 1994, Stornaiuolo ark. , 2003), diğeri ise hücre reseptörleri üzerinde yapılan çalışmalarda, ligandın bağlanmasında eksternal bölgenin önemini ortaya koyan çalışmalardır. Özellikle membran proteinlerinin, translasyonun başlamasından itibaren hücre membranına yönlendirilmesinde sinyal görevi görece dizilerin bulunduğu görüşü ilk kez Blobel ve Dobberstein (Blobel and Dobberstein, 1975a, b) tarafından ortaya atılmıştır. Sinyal dizileri, proteinlerin sadece membrana kanalize olmasında işlev görmez, aynı zamanda hücredeki organellere ve hücre nükleusuna taşınma trafiğinde de önemli görevler üstlenirler (Kalderon ark. , 1984, Schwartz, 1990, Stornaiuolo, Lotti, 2003, Teasdale and Jackson, 1996). Proteinlerin hücre nükleusuna taşınmasında iş gören ve ilk keşfedilen sinyal dizisi SV40 virüsüne ait T antijeni nüklear lokalizasyon (NLS) sinyalidir (PKKKRKV). Bunun dışında birçok farklı tipte nüklear lokalizasyon dizileri saptanmıştır (Dingwall ark. , 1988). NLS dizilerinin çoğu, importin β ailesinin spesifik reseptörleri tarafından tanınırlar (Mattaj and Englmeier, 1998, Williams ark. , 1997). Bu çalışmalar doğrultusunda, bir membran proteini olan glukagon reseptör proteininin 25 amino asit bakiyesinden oluşan sinyal peptidi taşımayan kısmını kodlayan DNA parçası memeli ekspresyon vektörlerine klonlandı. Bunun sonucunda Şekil 14 ve 18 de haritaları verilen ekspresyon vektörleri elde edildi. İkinci olarak, ligand ile bu liganda özgü reseptör arasındaki etkileşimi konu alan çalışmalardır. Yapılan birçok çalışmada hücre membranında yer alan reseptör proteinlerinin ligandları tanımada önemi olan bölgeleri ele alınmıştır (Clayton ark. , 2009, Dong ark. , 2005, Dong ark. , 2007, Dong ark. , 2003, Jin ark. , 2009, Myung ark. , 2013, Yeh ark. , 2000). Örneğin Han ve Halpson (Jin, Singh, 2009) glutamat reseptörünün amino terminal bölgesini DNA teknolojileri ile klonlayarak çözünür formda üretmişler ve bu proteinin radyoaktif (^3H)L-2-amino-4-fosfonobutirik asit antagonistini bağlama potansiyelini araştırmışlardır. Bu çalışmada ise insan glukagon reseptörünün 98 amino asit

bakiyesinden oluşan eksternal amino-terminal bölgesini kodlayan gen bölgesi, glukagon peptidi ile olası etkileşimini saptamak amacıyla pGAGGS ve pCHA vektörlerine klonlandı.

pCAGGS ve pCHA vektörlerine klonlanan insan glukagon reseptör gen bölgelerinin nükleotid dizileri DNA dizi analizleri ile saptandı (Şekil 16). Dizi analizleri sonucunda, tasarlanan şekli ile birebir aynı oldukları saptanan ekspresyon vektörlerinin memeli hücrelerinde anlatım yapıp yapmadıkları, Western melezleme tekniği ve immünfloresans teknikler ile ortaya kondu. Western melezleme tekniği kullanılarak yapılan analizlerde HEK293 hücrelerinden yararlanıldı. Bu hücrelere transfekte edilen ekspresyon vektörleri üzerinden GCGR Δ sp, GCGR-ED, H-GCGR Δ sp ve H-GCGR-ED proteinlerinin etkin bir şekilde sentez edildikleri ve proteinlerin poliakrilamid jel üzerinde beklenen büyüklüklerde bantlar oluşturdukları saptandı (Şekil 25).

Western melezleme tekniği ile yapılan analizler, hücrelerde sentez edilen proteinlerin miktarları ve büyüklükleri hakkında veri sağlarken, doğal olarak bu proteinlerin hücre içerisinde lokalizasyonları hakkında bir fikir vermemektedir. Proteinlerin hücre içi lokalizasyonları immünfloresans teknikler ile saptanabilir. İmmünfloresans teknikler de Western melezleme ile yapılan analizlerin aksine proteinlerin molekül ağırlıkları hakkında veri sağlamaz. Dolayısıyla hücrelerde rekombinant olarak sentez edilecek proteinlerin analizlerinde her iki yöntemin de uygulanması kaçınılmazdır. Yaptığımız bu çalışmada, pCHA plazmiti üzerinden kodlanan GCGR proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının saptanmasında HeLa hücrelerinden yararlanıldı. HeLa hücrelerinde sentez edilen hemaglutinin uzantılı GCGR Δ sp (H-GCGR Δ sp) proteinin belirgin bir şekilde hücre sitoplazmasında lokalize olduğu ortaya kondu (Şekil 27A). Daha önce de belirtildiği gibi sinyal peptidi taşıyan doğal GCGR proteini kodlayacak plazmit vektörü oluşturulmadığı için, H-GCGR Δ sp ve doğal GCGR proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarını karşılaştırma olanağımız olmadı. Bununla birlikte başka araştırmacılar tarafından insan (Krilov ark. , 2008) ve sıçan (Unson ark. , 1995) glukagon reseptörleri ile yapılan çalışmalarda, doğal glukagon reseptörlerinin hücre membranında lokalize olduğu immünfloresans teknikler ile ortaya konmuştur. Dolayısıyla, GCGR Δ sp

proteinin HeLa hücrelerinde sitoplazmik lokalizasyon göstermesi, proteinin amino-terminal ucunda yer alan 25 amino asit bakiyesinden oluşan sinyal peptidinin proteinin hücre membranına kanalize olmasında büyük önem taşıdığı sonucunu verdi. pCHA-GCGR-ED plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde monoklonal anti-HA antikoları ile gerçekleştirilen immünfloresans testlerde, GCGR proteininin sadece 98 amino asit bakiyesinden oluşan ve sinyal peptidi içermeyen eksternal bölgesinin (H-GCGR-ED) de sitoplazmik lokalizasyon gösterdiği saptandı (Şekil 27B). Bu tez çalışmasının ana hedeflerinden biri, rekombinant DNA tekniklerinden yararlanarak, hücre membranına bağlı olmaya, sitoplazmada serbest (çözünür) halde glukagon reseptör proteini üretmektir. Bu bağlamda değerlendirildiğinde, çalışma kapsamında insan glukagon reseptör proteininin 453 amino asitlik büyük bir bölümünü oluşturan GCGR Δ sp ve 98 amino asit bakiyeden oluşan GCGR-ED bölgesi memeli hücrelerinde çözünür formda başarılı bir şekilde üretilmiştir.

Membrana bağlı olayın GCGR proteinlerinin glukagon peptidini bağlama kapasitesine sahip olup olmadıklarını saptanması bu çalışmanın nihai hedefini oluşturmaktadır. Genel olarak hücre reseptörleri ile bu reseptörlere bağlanan küçük molekül ağırlıklı ligandlar arasındaki interaksiyonların araştırılmasında radyoizotoplar ile işaretleme tekniklerinden yararlanılmaktadır (Pal ark. , 2007, Vaughan ark. , 2005). Ligandın protein yapıda olması durumunda ise, birlikte immün çöktürme, GST ile birlikte çöktürme ve hücrelerde birlikte lokalizasyonun immünfloresans teknikler ile saptanması gibi farklı biyokimyasal ve hücre moleküler biyolojisi tekniklerinden yararlanılabilmektedir. Glukagon reseptörüne bağlanan glukagon molekülü 29 amino asit bakiyesinde oluşan yaklaşık 3.5 kD ağırlığında ve poliakrilamid jellerin ayırma kapasitesi sınırlarını zorlayacak ölçüde nispeten küçük bir moleküldür. Bu bakımdan, rekombinant olarak üretilen ticari glukagon peptidlerinin poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenebilirliği, elektroforez sonrası jeller gümüş boyama ile boyanarak araştırılmıştır. Şekil 31’de görüldüğü gibi farklı miktarlarda jelle uygulanan glukagon peptidleri, başarılı bir şekilde görüntülenebildi. Buna karşın Western melezleme ile görüntülemek amacıyla yapılan deneylerde, poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırılan peptidlerin membrana transfer edilmesinde, gerek 0.45 μ m gerekse 0,2 μ m por çapına sahip membranlar ile

beklenen sonuç alınamadı. Bunun nedenlerinde biri, protein transferi aşamasında, peptidlerin kaybedilmesi ya da anti-glukagon antikollarının glukagon peptidlerine etkin bir şekilde bağlanamaması olabilir.

Ticari yolla temin edilen rekombinant glukagon peptidinin poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi konusunda karşılaşılan sorunları aşabilmek amacıyla insan glukagon peptidi kodlayan cDNA molekülü, GST ve Flag (DYKDDDDK) kodlayan DNA dizileri ile aynı çerçeve içinde plazmit vektörlere klonlandı. Bunun sonucunda Şekil 21 ve 23'de haritaları verilen pCAGGS-GST-GCG ve pCAGGS-GCGflag ekspresyon vektörleri elde edildi. Plazmit vektörlere klonlanan DNA fragmentleri DNA dizi analizleri ile kontrol edildi ve teorik olarak tasarlanan gen yapıları ile birebir aynı olduğu ortaya kondu (Şekil 22 ve 24). Bu vektörler üzerinden kodlanan GST-GCG ve GCGflag füzyon proteinlerinin HeLa hücrelerinde sentezi ve lokalizasyonları immünfloresans boyama yöntemleri ile saptandı. Elde edilen sonuçlar hem GST-GCG hem de GCGflag proteinlerinin HeLa hücrelerinde sentez edildiğini ve hücrelerin sitoplazmalarında lokalize olduğunu ortaya koydu (Şekil 28).

Proteinler arası interaksiyonların saptanmasında kullanılan biyokimyasal yöntemlerin başında, hücrelerde doğal halde ya da rekombinant olarak HA (YPYDVPDYA), Flag (DYKDDDDK), Myc (EQKLISEEDL) ve His (HHHHHH) gibi uzantıları (tag) ile füzyon halinde sentez edilen proteinlerin birlikte immün çöktürme, ya da çeşitli afinite kolon kromatografileri ile birlikte fraksiyonlama teknikleri ile ayrıştırılması ve sonrasında PAGE/Western melezleme teknikleri ile analiz edilmesi gelmektedir. Diğer taraftan, Glutasyon-Sepharose boncuklara kolayca bağlanabilen ve ortamdan kolayca ayrılabilen Glutasyon S-Tranferaz (GST) enzimi de protein etkileşimlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Brady ark. , 2011, Brady ark. , 2004, Ren ark. , 2003). GST'in en önemli dezavantajı, HA ve Flag gibi diğer uzantılar ile karşılaştırıldığında daha büyük bir molekül olması ve zaman zaman ele alınan proteinlerin etkileşimini etkilemesidir.

Glukagon ile sitoplazmada lokalize olan çözünür formdaki GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinleri arasındaki olası etkileşim, GST ile çöktürme yöntemi ile araştırıldı. Bunun için GST-GCG füzyon proteini kodlayan plazmit vektöründen yararlanıldı. Ekspresyon plazmitlerinin birlikte transfeksiyonu ile GCGR ve GST-

GCG proteinleri HEK293 hücrelerinde aynı zamanda sentez edildi. Bu hücrelerden hazırlanan lizatlarda GST-GCG füzyon proteinleri glutatyon-Sepharose boncuklar ile çöktürüldü. GCGR Δ sp ve GCGR-ED proteinlerinin GST-GCG proteinleri ile birlikte ayrılıp ayrılmadıkları PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar GST-GCG'nin HEK293 hücrelerinde etkin bir şekilde sentez edildiğini ve Glutatyon-Sepharose ile çökeldiğini ortaya koydu (Şekil 29A). Çökeltelerde GCGR Δ sp proteinine rastlanmadı. Buna karşın özellikle HA uzantılı H-GCGR-ED proteinlerinin GST-GCG ile birlikte çökeldiği görüldü (Şekil 29A). H-GCGR-ED proteininin kontrol deneyinde GST proteini ile de çökmesi (Şekil 29B), bu proteinin non-spesifik olarak GST proteinine bağlandığı ve çökmenin GCG peptidi ile ilişkili olmadığı sonucunu verdi. Dolayısıyla GST ile çöktürme metodunun GCGR ile GCG arasındaki etkileşimin saptanmasında uygun bir yöntem olmadığı görüldü.

GST proteininin GCG peptidi taşımaksızın GCGR-ED proteinlerini bağlaması nedeniyle, GCG ve GCGR proteinleri arasındaki olası interaksiyonu belirlemek amacıyla birlikte immün çöktürme yöntemi denendi. Doğal glukagon peptidinin PAGE/Western melezleme ile görüntülenmesinde karşılaşılan sorunlardan dolayı Flag uzantılı GCG peptid kodlayan pCGAGGS-GCGflag vektörü oluşturuldu. Bu vektör GCGR-ED ve GCGR Δ sp proteinlerini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Aynı anda hücrelerde sentez edilen GCGflag ve GCGR proteinleri arasındaki etkileşim birlikte immün çöktürme deneyleri ile araştırıldı. İmmün çöktürme için GCGR proteinlerine özgü tavşan orijinli anti-glukagon reseptörü antikorları kullanıldı. Plazmitlerle transfekte edilen HEK293 hücrelerde GCGR-ED ve GCGR Δ sp proteinlerinin sentez edildiği ve anti-glukagon reseptör antikorları ile çökeldiği saptandı (Şekil 30). Buna karşın GCGflag proteinleri hem hücre lizatlarında (input) hem de immün çöktürme ile hazırlanan örneklerde saptanamadı (Şekil 30). DNA dizi analizi sonuçları pCAGGS-GCGflag plazmit vektörüne klonlanan GCG cDNA'sının Flag uzantısı ile aynı çerçevede ve doğru dizide olduğunu (Şekil 24) ve immünfloresans boyama yöntemi ile GCGflag proteinlerinin hücrelerde sentez edildiği gösterilmiştir (Şekil 28A). Hücre lizatlarında (input) GCGflag proteinlerinin Western melezleme ile görüntülenememesinin teknik bir sorundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Dolayısıyla gerek GST ile çöktürme gerekse birlikte immün çöktürme deneyleri sonucu elde edilen verilere bakarak, GCG ile çözünür formdaki glukagon reseptör proteinleri arasında fiziksel interaksiyonun olmadığını söylemek olası görünmemektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında, sinyal (lider) peptidi taşımayan insan glukagon reseptör proteini ve bu proteinin eksternal bölgesi rekombinant olarak üretildi ve bu proteinlerin memeli hücrelerinde sitoplazmik lokalizasyon gösterdikleri ortaya kondu. Benzer şekilde insan glukagon peptidi, PANC-1 hücrelerinden elde edilen cDNA'nın pCAGGSflag ve pCAGGS-GST plazmit vektörlerine klonlanması ile GST ve flag ile füzyon halinde (GCGflag ve GST-GCG) üretildi. Her iki füzyon proteinin de hücrelerde sitoplazmada lokalize oldukları saptandı. Buna karşın, glukagon ve sitoplazmik glukagon reseptör proteinleri arasındaki olası fiziksel etkileşimin ortaya konmasında istenilen sonuca ulaşılamadı. Özellikle glukagon peptidinin Western melezleme tekniği ile görüntülenmesinde yaşanan sorunların aşılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Glukagon cDNA'sının proglukagon halinde klonlanarak nispeten daha büyük olan proglukagonun sitoplazmik glukagon reseptör proteinleri ile ilişkisi araştırılacaktır. Bir diğer alternatif ise, glukagon reseptörü eksternal bölgesinin başka proteinler ile füzyon halinde sentez edilmesidir. Özellikle insan IgG antikorlarının değişken olmayan ağır zincirleri bu amaç için ideal aday protein molekülü olarak görülmektedir.

8. KAYNAKLAR

Abrahamsen N, Lundgren K, Nishimura E. Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J. Biol. Chem.* 1995;270:15853-7.

Abrahamsen N, Nishimura E. Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology.* 1995;136:1572-8.

Ahn JM, Medeiros M, Trivedi D, Hruby VJ. Development of potent glucagon antagonists: structure-activity relationship study of glycine at position 4. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society.* 2001;58:151-8.

Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia.* 2000;43:393-410.

American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care.* 2014;37 (Suppl 1):S14-80.

Andreone BJ, Lacoste B, Gu C. Neuronal and Vascular Interactions. *Annu Rev Neurosci.* 2015 (Epub ahead of print).

Arslanian S, Heil BV, Kalhan SC. Hepatic insulin action in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with long-term glycemic control. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 1993;42:283-90.

Atlan N, Dinçel, A.S., Koca, C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006;31:51-6.

Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. *CMLS.* 2008;65:1880-99.

Authier F, Desbuquois B, De Galle B. Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver. *Endocrinology.* 1992;131:447-57.

Authier F, Janicot M, Lederer F, Desbuquois B. Fate of injected glucagon taken up by rat liver in vivo. Degradation of internalized ligand in the endosomal compartment. *Biochem. J.* 1990;272:703-12.

Barazzone P, Gorden P, Carpentier JL, Orci L, Freychet P, Canivet B. Binding, internalization, and lysosomal association of 125I-glucagon in isolated rat hepatocytes. A quantitative electron microscope autoradiographic study. *J. Clin. Invest.* 1980;66:1081-93.

Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes.* 1987;36:274-83.

Bell RH, Jr., Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res.* 1983;35:433-60.

Birnbaumer L. The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007;1768:756-71.

Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* 1975a;67:835-51.

Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol.* 1975b;67:852-62.

Blonski W, Buchner AM, Aberra F, Lichtenstein G. Teduglutide in Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13:1207-14.

Brady AE, Chen Y, Limbird LE, Wang Q. Study of GPCR-protein interactions using gel overlay assays and glutathione-S-transferase-fusion protein pull-downs. *Methods Mol Biol.* 2011;746:347-55.

Brady AE, Wang Q, Limbird LE. Study of G-protein-coupled receptor-protein interactions using gel overlay assays and glutathione-S-transferase-fusion protein pull-downs. *Methods Mol Biol.* 2004;259:371-8.

Brand CL, Jorgensen PN, Svendsen I, Holst JJ. Evidence for a major role for glucagon in regulation of plasma glucose in conscious, nondiabetic, and alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes.* 1996;45:1076-83.

Brand CL, Rolin B, Jorgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS, Holst JJ. Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* 1994;37:985-93.

Bregman MD, Trivedi D, Hruby VJ. Glucagon amino groups. Evaluation of modifications leading to antagonism and agonism. *J Biol Chem.* 1980;255:11725-31.

Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:52-62.

Brubaker PL, Crivici A, Izzo A, Ehrlich P, Tsai CH, Drucker DJ. Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology.* 1997;138:4837-43.

- Brubaker PL, Drucker DJ. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors & Channels*. 2002;8:179-88.
- Buggy JJ, Heurich RO, MacDougall M, Kelley KA, Livingston JN, Yoo-Warren H, et al. Role of the glucagon receptor COOH-terminal domain in glucagon-mediated signaling and receptor internalization. *Diabetes*. 1997;46:1400-5.
- Burcelin R, Katz EB, Charron MJ. Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes & Metabolism*. 1996;22:373-96.
- Burcelin R, Li J, Charron MJ. Cloning and sequence analysis of the murine glucagon receptor-encoding gene. *Gene*. 1995;164:305-10.
- Burcelin R, Mrejen C, Decaux JF, De Mouzon SH, Girard J, Charron MJ. In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J Biol Chem*. 1998;273:8088-93.
- Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD, et al. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:2628-35.
- Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*. 1999;42:856-64.
- Chauvet G, Tahiri K, Authier F, Desbuquois B. Endosome-lysosome transfer of insulin and glucagon in a liver cell-free system. *FEBS*. 1998;254:527-37.
- Cho YM, Merchant CE, Kieffer TJ. Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;135:247-78.
- Chow BK, Moon TW, Hoo RL, Yeung CM, Muller M, Christos PJ, et al. Identification and characterization of a glucagon receptor from the goldfish *Carassius auratus*: implications for the evolution of the ligand specificity of glucagon receptors in vertebrates. *Endocrinology*. 2004;145:3273-88.
- Christophe J. Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;1241:45-57.
- Claus TH, El-Maghrabi MR, Regen DM, Stewart HB, McGrane M, Kountz PD, et al. The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. *Current Topics in Cellular Regulation*. 1984;23:57-86.
- Clayton A, Siebold C, Gilbert RJ, Sutton GC, Harlos K, McIlhinney RA, et al. Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the

architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors. *J Mol Biol.* 2009;392:1125-32.

Cooperberg BA, Cryer PE. Beta-cell-mediated signaling predominates over direct alpha-cell signaling in the regulation of glucagon secretion in humans. *Diabetes Care.* 2009;32:2275-80.

Coppari R. Hypothalamic neurons governing glucose homeostasis. *J Neuroendoc.* 2015 (Epub ahead of print).

Cotter DG, Ercal B, Huang X, Leid JM, d'Avignon DA, Graham MJ, et al. Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J Clin Invest.* 2014;124:5175-90.

DaCampa MP, Yusta B, Sumner-Smith M, Crivici A, Drucker DJ, Brubaker PL. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. *Biochem.* 2000;39:8888-94.

De Diego JG, Gorden P, Carpentier JL. The relationship of ligand receptor mobility to internalization of polypeptide hormones and growth factors. *Endocrinology.* 1991;128:2136-40.

Desbuquois B. *Polypeptide Hormone Receptors.* New York: Marcel Dekker; 1983.

Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B, Richardson WD. The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J Cell Biol.* 1988;107:841-9.

Dong J, Opresko LK, Chrisler W, Orr G, Quesenberry RD, Lauffenburger DA, et al. The membrane-anchoring domain of epidermal growth factor receptor ligands dictates their ability to operate in juxtacrine mode. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2984-98.

Dong M, Lam PC, Gao F, Hosohata K, Pinon DI, Sexton PM, et al. Molecular approximations between residues 21 and 23 of secretin and its receptor: development of a model for peptide docking with the amino terminus of the secretin receptor. *Mol Pharma.* 2007;72:280-90.

Dong M, Li Z, Zang M, Pinon DI, Lybrand TP, Miller LJ. Spatial approximation between two residues in the mid-region of secretin and the amino terminus of its receptor. Incorporation of seven sets of such constraints into a three-dimensional model of the agonist-bound secretin receptor. *J Biol Chem.* 2003;278:48300-12.

Güçlü F, Özmen B, Hekimsoy Z. Glucagon-Like Peptide-1: Review. *Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science.* 2007;27:386-93.

Drucker DJ. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology.* 2001;142:521-7.

Dumonteil E, Magnan C, Ritz-Laser B, Ktorza A, Meda P, Philippe J. Glucose regulates proinsulin and prosomatostatin but not proglucagon messenger ribonucleic acid levels in rat pancreatic islets. *Endocrinology*. 2000;141:174-80.

Dunning BE, Foley JE, Ahren B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia*. 2005;48:1700-13.

Dunphy JL, Taylor RG, Fuller PJ. Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression. *Mol and Cell Endocrin*. 1998;141:179-86.

Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei MA, et al. Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes*. 1999;48:86-93.

Egan JM, Bulotta A, Hui H, Perfetti R. GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes/Metabolism Res and Rev*. 2003;19:115-23.

Evans M, Schumm-Draeger PM, Vora J, King AB. A review of modern insulin analogue pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles in type 2 diabetes: improvements and limitations. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2011;13:677-84.

Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine Rev*. 1995;16:390-410.

Fehmann HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology*. 1992;130:159-66.

Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Rev*. 2013;93:137-88.

Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*. 2005;54:1808-15.

Fuchs R, Male P, Mellman I. Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes. *J Biol Chem*. 1989;264:2212-20.

Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouille Y, Holst JJ, Carroll R, et al. Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Sci U S A*. 1997;94:6646-51.

Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, et al. Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *J Biol Chem*. 2001;276:27197-202.

Gallwitz B. Glucagon-like peptide-1-based therapies for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Treatments in Endocrinology*. 2005;4:361-70.

Gilbert W, de Souza SJ, Long M. Origin of genes. *Proc Natl Sci U S A*. 1997;94:7698-703.

Goldfine ID, Roth J, Birnbaumer L. Glucagon receptors in β -cells. Binding of 125 I-glucagon and activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 1972;247:1211-8.

Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52:456-67.

Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, et al. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca^{2+} current and the number of granules close to the L-type Ca^{2+} channels. *J Gen Physiol*. 1997;110:217-28.

Gysin B, Johnson DG, Trivedi D, Hruby VJ. Synthesis of two glucagon antagonists: receptor binding, adenylate cyclase, and effects on blood plasma glucose levels. *J Med Chem*. 1987;30:1409-15.

Gysin B, Trivedi D, Johnson DG, Hruby VJ. Design and synthesis of glucagon partial agonists and antagonists. *Biochem*. 1986;25:8278-84.

Haderslev KV, Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Sorensen HA, Graff J, et al. Short-term administration of glucagon-like peptide-2. Effects on bone mineral density and markers of bone turnover in short-bowel patients with no colon. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2002;37:392-8.

Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Philippi A, Poller W, et al. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature Genetics*. 1995;9:299-304.

Harmar AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology*. 2001;2:3013.1–3013.10.

Hermansen K, Fontaine P, Kukolja KK, Peterkova V, Leth G, Gall MA. Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47:622-9.

Hers HG. The control of glycogen metabolism in the liver. *Annual Review of Biochemistry*. 1976;45:167-89.

Hinke SA, Pospisilik JA, Demuth HU, Mannhart S, Kuhn-Wache K, Hoffmann T, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization

of glucagon degradation products and DPIV-resistant analogs. *J Biol Chem.* 2000;275:3827-34.

Hirsch IB. Treatment of patients with severe insulin deficiency; what we have learned over the past 2 years. *Am J Med.* 2004;116(Suppl 3A):17S-22S.

Hirsch IB. Insulin analogues. *The New England Journal of Medicine.* 2005;352:174-83.

Holst JJ. Gut hormones as pharmaceuticals. From enteroglucagon to GLP-1 and GLP-2. *Regulatory Peptides.* 2000;93:45-51.

Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287:E199-206.

Horwitz EM, Gurd RS. Quantitative analysis of internalization of glucagon by isolated hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1988;267:758-69.

Huang P, Wang CY, Gou SM, Wu HS, Liu T, Xiong JX. Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3903-7.

Hue L, Rider MH. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J.* 1987;245:313-24.

Jaspan JB, Polonsky KS, Lewis M, Pensler J, Pugh W, Moossa AR, et al. Hepatic metabolism of glucagon in the dog: contribution of the liver to overall metabolic disposal of glucagon. *Am J Physiol.* 1981;240:E233-44.

Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, et al. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Sci.* 1993;259:1614-6.

Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:E671-8.

Jin R, Singh SK, Gu S, Furukawa H, Sobolevsky AI, Zhou J, et al. Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *European Mol Biol Organization J.* 2009;28:1812-23.

Johnson DG, Goebel CU, Hruby VJ, Bregman MD, Trivedi D. Hyperglycemia of diabetic rats decreased by a glucagon receptor antagonist. *Sci.* 1982;215:1115-6.

Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. *Sci.* 1983;219:632-7.

Johnson LN, Barford D, Owen DJ, Noble ME, Garman EF. From phosphorylase to phosphorylase kinase. *Adv Second Messenger and Phosphoprotein Res.* 1997;31:11-28.

Jones HW, Jr., McKusick VA, Harper PS, Wu KD. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstetrics and Gynecology.* 1971;38:945-9.

Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J the Associ of Physicians of India.* 2007;55 Suppl:19-25.

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell.* 1984;39:499-509.

Katuchova J, Harvanova D, Spakova T, Kalanin R, Farkas D, Durny P, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrine Pathology.* 2015 (Epub ahead of print).

Kimball C, Murlin, J. Aqueous extracts of pancreas III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem.* 1923;58:337-48.

Kolakowski LF, Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels.* 1994;2:1-7.

Krebs EG. Phosphorylation and dephosphorylation of glycogen phosphorylase: a prototype for reversible covalent enzyme modification. *Current Topics in Cellular Regulation.* 1981;18:401-19.

Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, Unson CG, Bouscarel B. Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295:C1230-7.

Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *The New England J Med.* 2007;356:1517-26.

Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neurosci.* 1997;77:257-70.

Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.* 1975;15:741-7.

Ling A, Plewe M, Gonzalez J, Madsen P, Sams CK, Lau J, et al. Human glucagon receptor antagonists based on alkylidene hydrazides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2002;12:663-6.

- Lok S, Kuijper JL, Jelinek LJ, Kramer JM, Whitmore TE, Sprecher CA, et al. The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization. *Gene*. 1994;140:203-9.
- MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, et al. A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol*. 2007;5:e143.
- MacNeil DJ, Occi JL, Hey PJ, Strader CD, Graziano MP. Cloning and expression of a human glucagon receptor. *Biochem and Biophysical Res Communications*. 1994;198:328-34.
- Madsen P, Knudsen LB, Wiberg FC, Carr RD. Discovery and structure-activity relationship of the first non-peptide competitive human glucagon receptor antagonists. *J Med Chem*. 1998;41:5150-7.
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*. 1994;8:1003-11.
- Maniatis T, Fritsch, E. F., and Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
- Martin BR. Transient receptor coupling in the activation of rat liver plasma-membrane adenylate cyclase by glucagon. *Biochem Soc Trans*. 1981;9:44-7.
- Mattaj IW, Englmeier L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:265-306.
- Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Goke B, Thorens B, et al. International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacological Rev*. 2003;55:167-94.
- McNally T, Grihalde ND, Pederson TM, Ogiela CA, Djuric SW, Collins CA, et al. Cloning and characterization of the glucagon receptor from cynomologous monkey. *Peptides*. 2004;25:1171-8.
- Meier JJ, Kjems LL, Veldhuis JD, Lefebvre P, Butler PC. Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the inraislelet insulin hypothesis. *Diabetes*. 2006;55:1051-6.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides*. 1999;85:9-24.
- Merlen C, Fabrega S, Desbuquois B, Unson CG, Authier F. Glucagon-mediated internalization of serine-phosphorylated glucagon receptor and Gsalpha in rat liver. *FEBS Letters*. 2006;580:5697-704.

- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem.* 1986;261:11880-9.
- Morgan NG, Leete P, Foulis AK, Richardson SJ. Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. *IUBMB life.* 2014;66:723-34.
- Muller WA, Faloon GR, Unger RH. Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis. Its prevalence and significance. *Am J Med.* 1973;54:52-7.
- Myung JK, Banuelos CA, Fernandez JG, Mawji NR, Wang J, Tien AH, et al. An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. *J Clin Invest.* 2013;123:2948-60.
- Nagata K, Saito S, Okuwaki M, Kawase H, Furuya A, Kusano A, et al. Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Experimental Cell Res.* 1998;240:274-81.
- Nelson DL C, M.M. Lehninger's Principles of Biochemistry. New York: W. H. Freeman and Company; 2005.
- Ngan ES, Chow LS, Tse DL, Du X, Wei Y, Mojsov S, et al. Functional studies of a glucagon receptor isolated from frog *Rana tigrina rugulosa*: implications on the molecular evolution of glucagon receptors in vertebrates. *FEBS Letters.* 1999;457:499-504.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991;108:193-9.
- Olsen HL, Theander S, Bokvist K, Buschard K, Wollheim CB, Gromada J. Glucose stimulates glucagon release in single rat alpha-cells by mechanisms that mirror the stimulus-secretion coupling in beta-cells. *Endocrinology.* 2005;146:4861-70.
- Orskov C, Holst JJ. Radio-immunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2 (GLP-1 and GLP-2). *Scandinavian J Clin and Lab Invest.* 1987;47:165-74.
- Pal A, Hajipour AR, Fontanilla D, Ramachandran S, Chu UB, Mavlyutov T, et al. Identification of regions of the sigma-1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Mol Pharmacol.* 2007;72:921-33.
- Paoli A, Bosco G, Camporesi EM, Mangar D. Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. *Frontiers in Psychology.* 2015;6:27.
- Patet C, Quintard H, Suys T, Bloch J, Daniel R, Pellerin L, et al. Neuroenergetic response to prolonged cerebral glucose depletion after severe brain injury and the role of lactate. *J Neurotrauma.* 2015 (Epub ahead of print).

- Pospisilik JA, Hinke SA, Pederson RA, Hoffmann T, Rosche F, Schlentzig D, et al. Metabolism of glucagon by dipeptidyl peptidase IV (CD26). *Regulatory Peptides*. 2001;96:133-41.
- Prevost M, Vertongen P, Raussens V, Roberts DJ, Cnudde J, Perret J, et al. Mutational and cysteine scanning analysis of the glucagon receptor N-terminal domain. *J Biol Chem*. 2010;285:30951-8.
- Quesada I, Todorova MG, Soria B. Different metabolic responses in alpha-, beta-, and delta-cells of the islet of Langerhans monitored by redox confocal microscopy. *Biophysical J*. 2006;90:2641-50.
- Rakatzi I, Ramrath S, Ledwig D, Dransfeld O, Bartels T, Seipke G, et al. A novel insulin analog with unique properties: LysB3,GluB29 insulin induces prominent activation of insulin receptor substrate 2, but marginal phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *Diabetes*. 2003;52:2227-38.
- Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64:106-10.
- Ren L, Chang E, Makky K, Haas AL, Kaboord B, Walid Qoronfle M. Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin. *Analytical Biochem*. 2003;322:164-9.
- Riddle MC. Timely initiation of basal insulin. *Am J Med*. 2004;116 (Suppl 3A):3S-9S.
- Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HM. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem*. 1971a;246:1877-82.
- Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. 3. Binding of glucagon: method of assay and specificity. *J Biol Chem*. 1971b;246:1861-71.
- Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem*. 2002;48:2270-88.
- Roth J, Qureshi S, Whitford I, Vranic M, Kahn CR, Fantus IG, et al. Insulin's discovery: new insights on its ninetieth birthday. *Diabetes/Metabolism Res and Rev*. 2012;28:293-304.
- Rouille Y, Bianchi M, Irminger JC, Halban PA. Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. *FEBS Letters*. 1997a;413:119-23.
- Rouille Y, Kantengwa S, Irminger JC, Halban PA. Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J Biol Chem*. 1997b;272:32810-6.

Rouille Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3242-6.

Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, et al. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000;49:749-58.

Schutze MP, Peterson PA, Jackson MR. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO*. 1994;13:1696-705.

Schwartz AL. Cell biology of intracellular protein trafficking. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:195-229.

Scrocchi LA, Brown TJ, McClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, et al. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med*. 1996;2:1254-8.

Sildorf SM, Eising S, Hougaard DM, Mortensen HB, Skogstrand K, Pociot F, et al. Differences in MBL levels between juvenile patients newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings. *Molecular Immunology*. 2014;62:71-6.

Siu FY, He M, de Graaf C, Han GW, Yang D, Zhang Z, et al. Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2013;499:444-9.

Sivarajah P, Wheeler MB, Irwin DM. Evolution of receptors for proglucagon-derived peptides: isolation of frog glucagon receptors. *Comparative biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 2001;128:517-27.

Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 1988;67:31-40.

Stornaiuolo M, Lotti LV, Borgese N, Torrisi MR, Mottola G, Martire G, et al. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell*. 2003;14:889-902.

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:461-80.

Sundby F, Markussen J. Isolation, crystallization and amino acid composition of rat glucagon. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*. 1971;3:184-7.

- Svoboda M, Ciccarelli E, Tastenoy M, Cauvin A, Stievenart M, Christophe J. Small introns in a hepatic cDNA encoding a new glucagon-like peptide 1-type receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993a;191:479-86.
- Svoboda M, Ciccarelli E, Tastenoy M, Robberecht P, Christophe J. A cDNA construct allowing the expression of rat hepatic glucagon receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993b;192:135-42.
- Teasdale RD, Jackson MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Develop Biol.* 1996;12:27-54.
- Tong J, Fujimoto WY, Kahn SE, Weigle DS, McNeely MJ, Leonetti DL, et al. Insulin, C-peptide, and leptin concentrations predict increased visceral adiposity at 5- and 10-year follow-ups in nondiabetic Japanese Americans. *Diabetes.* 2005;54:985-90.
- Tunalı G. Beynin Enerji Metabolizması Derleme. *J Exp Clin Med.* 1983;2:83-92.
- Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Bianculli A, Orlandi A, Desimio MG, et al. Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein. *J Biol Chem.* 2013;288:2281-9.
- Turan K, Ata P. Effects of intra- and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression. *Genetics and Molecular Res.* 2011;10:2009-23.
- Ugleholdt R, Zhu X, Deacon CF, Orskov C, Steiner DF, Holst JJ. Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology.* 2004;145:1349-55.
- Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia.* 1985;28:574-8.
- Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 2012;122:4-12.
- Unger RH, Orci L. The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus. *Annu Rev Med.* 1977;28:119-30.
- Unson CG, Andreu D, Gurzenda EM, Merrifield RB. Synthetic peptide antagonists of glucagon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4083-7.
- Unson CG, Cypess AM, Kim HN, Goldsmith PK, Carruthers CJ, Merrifield RB, et al. Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. Seven transmembrane segments are necessary for receptor transport to the plasma membrane and glucagon binding. *J Biol Chem.* 1995;270:27720-7.

- Unson CG, Cypess AM, Wu CR, Goldsmith PK, Merrifield RB, Sakmar TP. Antibodies against specific extracellular epitopes of the glucagon receptor block glucagon binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:310-5.
- Unson CG, Macdonald D, Merrifield RB. The role of histidine-1 in glucagon action. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300:747-50.
- Vaughan RA, Parnas ML, Gaffaney JD, Lowe MJ, Wirtz S, Pham A, et al. Affinity labeling the dopamine transporter ligand binding site. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005;143:33-40.
- Walter P, Johnson AE. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol*. 1994;10:87-119.
- Williams SC, Angerer ND, Johnson PF. C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expression*. 1997;6:371-85.
- Yang X, Yates ML, Candelore MR, Feeney W, Hora D, Kim RM, et al. Cloning and expression of canine glucagon receptor and its use to evaluate glucagon receptor antagonists in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*. 2007;555:8-16.
- Yazbeck R, Abbott CA, Howarth GS. The use of GLP-2 and related growth factors in intestinal diseases. *Curr Opin Invest Drugs*. 2010;11:440-6.
- Yeh S, Sampson ER, Lee DK, Kim E, Hsu CL, Chen YL, et al. Functional analysis of androgen receptor N-terminal and ligand binding domain interacting coregulators in prostate cancer. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2000;99:885-94.
- Yki-Jarvinen H. Insulin therapy in type 2 diabetes: role of the long-acting insulin glargine analogue. *European J Clin Invest*. 2004;34:410-6.
- Zechel C, Trivedi D, Hruby VJ. Synthetic glucagon antagonists and partial agonists. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1991;38:131-8.
- Zhang BB, Moller DE. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4:461-7.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	ŞULE	Soyadı	İBİŞOĞLU
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	10.10.1990
Uyruğu	T.C	Tel	05364956250
E-mail	suleibisoglu@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Ens./Biyokimya	2015
Lisans	Marmara Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji-Kimya	2012
Lise	İstanbul Köy Hizmetleri Anadolu Lisesi/Fen-Matematik	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Stajyer	Deva Holding	07.2012-08.2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	orta	orta	orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	45							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72,89885	75,44816	68,86558

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word	iyi
Microsoft Office Power Point	iyi
Microsoft Office Excel	iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. İbişoğlu, Ő, **Turan K**, “Investigation of the affinity of recombinant soluble form of human glucagon receptor protein with glucagon”, Fourth International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, September 18-21, P4, Istanbul, Turkey, 2014.