



T. C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

G PROTEİNLERİ ÜZERİNE YAPI VE İŞLEV ÇALIŞMALARI

PINAR MEGA TİBER
DOKTORA TEZİ

BİYO FİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. BEKİ KAN

İSTANBUL – 2006

I. TEŞEKKÜR

Tüm doktora eğitimim süresince benim bilimsel kişiliğimi şekillendiren, deneysel çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, beni motive eden, nazımı çeken ve onun öğrencisi olmaktan dolayı gurur duyduğum çok değerli hocam, danışmanım

Prof. Dr. Beki KAN'a;

Laboratuvarın alfabetini bana öğreten, tecrübelerini benimle paylaşan, kimi zaman anlamsız sorularıyla çıldırttığım hocam ve ablam Yard. Doç. Dr. Oya ORUN'a;

Sabancı Ünv. Mühendislik ve Doğa Bilimleri Laboratuvarının tüm olanaklarını kullanmama izin veren, çalışmalarımın yönlendirilmesine katkılarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zehra SAYERS'e;

Dinamik Işık Saçılım Spektroskopisi Ölçümleri için yardımlarını esirgemeyen Koç Ünv. Kimya bölümünden Dr. Funda YAĞCI'ya;

İstanbul Ünv. Biyofizik A.B.D.'nin Laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen tez izleme komitesindeki sayın hocam Prof. Dr. Rüstem NURTEN'e;

Tübitak MAM'da floresans spektroskopik ölçümleri için mevcut olanaklarını sunan ve bulgularımızın yorumlanmasına katkıda bulunan Prof. Dr. Alexander P. DEMCHENKO'ya; floresans ölçümlerde yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Şule ÖNCÜL'e;

Yıldız Teknik Ünv. 'de floresans ölçümlerin bir bölümünü gerçekleştirmemize izin veren Prof. Dr. M. MUSTAFA(EV) AKDESTE'ye ve onun asistanı Yasemin BUDAMA BATTAL'a;

Protein saflaştırma aşamasında soğuk oda imkanlarını kullanmama izin veren Marmara Ünv. Farmakoloji A.B.D. başkanı Prof. Dr. Kemal BERKMAN'a;

Gerçekleştirdiğim deneylerde bana daima yardımcı olan arkadaşlarım Burcu KAPLAN'a, Başak VAROL'a, Dr. Özlem COŞKUN'a;

Çalışmalarımın yanı sıra her zaman her konuda dayanışma içinde olduğum arkadaşım Cevdet NACAR'a, Her zaman bana moral veren Biyofizik A.B.D. öğretim üyelerinden Yard. Doç. Dr. Ayşe GARİP'e, Yard. Doç. Dr. Hülya CABADAK'a, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım arkadaşım Banu AYDIN'a, Biyofizik A.B.D arkadaşlarıma;

Uzarlarda olsa bile hep yanımnda olduğunu hissettiğim dostum Dr. Devrim ÖZ ARSLAN'a;

Bana, çalışmalarıma gösterdiği sabır, anlayış ve desteğinden ötürü Sevgili Eşim Göksel'e, sevgili ağabeyim Ertunç'a, sevgili kardeşim Alican'a, çok değerli varlıklarım Annem'e, Babam'a ve Canım Oğlum Arda'ya;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'nın SAĞ-DKR-100105-0003 No'lu proje desteğinden yararlanılarak ve Biyofizik Anabilim Dalı olanakları doğrultusunda yapılmıştır.

Değerli Anneme ve Babama

II. İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
I.	TEŞEKKÜRI
II.	İÇİNDEKİLER III
III.	KISALTMALAR VE SİMGELERVII
1.	ÖZET 1
2.	SUMMARY 2
3.	GİRİŞ VE AMAÇ 3
4.	GENEL BİLGİLER..... 6
4.1.	G-Proteinleri..... 6
4.2.	G _α Proteini..... 11
4.3.	G Proteinleri Üzerine Yapı Çalışmaları 15
4.3.1.	Reseptör- G Protein Etkileşiminin Yapısal Unsurları..... 22
4.3.2.	Efektör- G Protein Etkileşiminin Yapısal Unsurları..... 24
4.4.	G _α Protein Sentezinde Kullanılan Ekspresyon Sistemi..... 24
4.4.1.	pQE80 Vektör Sisteminin Özellikleri 26
4.5.	G _α Proteininin Saflaştırılması..... 27
4.6.	Spektroskopi..... 28
4.6.1.	Moleküler Spektroskopi 30
4.6.2.	Floresans 31
4.6.3.	Floresans Yayılım Grafiği 33
4.6.4.	Protein Floresansı 33
4.6.5.	Spektrofotometre 36
5.	GEREÇ VE YÖNTEM..... 38
5.1.	Gereçler..... 38
5.1.1.	Kimyasal Maddeler..... 38
5.1.2.	Sığır Goα Kalıbı 39
5.1.3.	Primerler..... 40
5.1.4.	Western Emdirimi Gereçleri 40
5.1.5.	Antikorlar 40
5.1.6.	Radyoaktif Maddeler..... 40
5.1.7.	Klonlama İçin Kullanılan Kitler 40

5.1.8.	Cihazlar.....	41
5.1.9.	Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi	41
5.1.9.1.	Hücre Kültür ve Ekspresyonu Sırasında Kullanılan Çözeltiler.....	41
5.1.9.2.	Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözelti	42
5.1.9.3.	Saflaştırma İşleminde Kullanılan Çözeltiler	42
5.1.9.4.	Elektroforez ve Western Emdirimi Analizlerinde Kullanılan Çözeltiler	43
5.1.9.5.	Floresans Spektroskopik Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	46
5.1.9.6.	[³⁵ S] GTP γ S Bağlama Testinde Kullanılan Çözeltiler	47
5.2.	Yöntem	48
5.2.1.	Alt-Klonlama	48
5.2.1.1.	DNA Kalıbının Hazırlanması	49
5.2.1.2.	pQE 80 Vektörünün Hazırlanması	50
5.2.1.3.	Yapıştırma	50
5.2.1.4.	Transformasyon (Aktarma).....	51
5.2.2.	Kültür ve Ekspresyon	52
5.2.3.	Protein Miktar Tayini	52
5.2.4.	Elektroforez	52
5.2.5.	Islak Elektroforetik Transfer Düzenegi ile Elektroforetik Transfer	53
5.2.6.	Western Emdirimi Analizi	53
5.2.7.	Protein Saflaştırma İşlemi.....	54
5.2.7.1.	Lizatin Hazırlanması	54
5.2.7.2.	Ni-NTA Agaroz Kolon.....	54
5.2.7.3.	Sephadex G-100 Kolon	54
5.2.8.	Dinamik Işık Saçılım Spektroskopik Ölçümleri	55
5.2.9.	[³⁵ S] GTP γ S Bağlama Testi	55
5.2.10.	Radyoaktivitenin Ölçülmesi.....	55
5.2.11.	Floresans Spektroskopik Ölçümler	56
5.2.11.1.	G $_{\alpha}$ Proteininin Floresans Spektroskopik Ölçümleri.....	56
5.2.11.2.	G $_{\alpha}$ Proteinine GTP γ S Bağlanma ve Mg ⁺² Kinetiği.....	56
5.2.12.	G $_{\alpha}$ Proteininin Floresansına GTP'nin Etkisi	57

5.2.13.	G_{oa} Proteininin Floresansında GTP'nin Neden Olduğu Değişikliğe GDP'nin Etkisi	57
5.2.14.	BODIPY FL-GTPγS Floresans Spektroskopik Ölçümler	57
5.2.14.1.	BODIPY FL-GTPγS – G_{oa} Proteininin Uyarılma ve Yayılım Spektrum Ölçümü	57
5.2.14.2.	BODIPY FL-GTPγS – G_{oa} Proteininin Etkileşim Kinetiği	57
6.	BULGULAR	58
6.1.	Klonlama	58
6.1.1.	G_{oa} Dizisinin PZR ile Çoğaltılması	58
6.1.2.	PZR Ürününün Agaroz Gelden Ekstraksiyonu	59
6.1.3.	pQE80 Plazmidinin Hazırlanması ve Yapıştırma	60
6.1.4.	Aktarma ve Koloni Taraması	61
6.1.5.	Dizi Analizi Bulguları	62
6.2.	G_{oa} Proteininin Ekspresyonu	63
6.3.	G_{oa} Protein Saflaştırması	67
6.4.	Moleküler Elek Kromatografisi (Sephadex G-100)	70
6.5.	Saflaştırma İşleminin Genel Değerlendirmesi	72
6.6.	Dinamik Işık Saçılım Spektroskopisi Ölçümleri	72
6.7.	Floresans Spektroskopik Ölçümler	74
6.7.1.	G_{oa} Proteininin İçsel Floresans Spektroskopik Ölçümleri	74
6.7.2.	G_{oa} Proteininin Floresansının Mg⁺² Bağımlı Artışının Kinetiği	75
6.7.3.	G_{oa} Proteininin Floresansına GTP'nin Etkisi	77
6.7.4.	G_{oa} Proteininin Floresansında GTP'nin Neden Olduğu Değişikliğe GDP'nin Etkisi	78
6.8.	BODIPY FL-GTPγS ile Floresans Spektroskopik Ölçümler	79
6.8.1.	BODIPY FL-GTPγS – G_{oa} Proteininin Uyarım ve Yayılım Spektrumlarının Ölçümü	79
6.8.2.	BODIPY FL-GTPγS – G_{oa} Proteininin Etkileşim Kinetiği	80
6.9.	[³⁵S] GTPγS Bağlama Testi Sonuçları	81
6.9.1.	[³⁵S] GTPγS Bağlama Etkinliğine Protein Derişimlerinin Etkisi	81
6.9.2.	[³⁵S] GTPγS Bağlama Etkinliğine Nükleotidlerin Etkisi	83
6.9.3.	Mg⁺²'un G_{oa} Proteininden [³⁵S] GTPγS'in Ayrışmasına Etkisi	85

7.	TARTIşMA VE SONUÇ	86
8.	KAYNAKLAR	90
9.	ÖZGEÇMİş	97

III. KISALTMALAR VE SİMGELER

BCIP	: Bromokloroindol fosfat
BSA	: Sığır serum albümini
DEAE	: Dietilaminoetil
DTT	: Ditiyotritol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EF-Tu	: Elongasyon faktör-Tu
FS	: Fenil-Sefaroz
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin 5'-trifosfat
GTPγS	: Guanozin 5'-O-(3-tiotrifosfat)
IPTG	: Izopril- β -D-tiogalactopiranozid
NBT	: Nitroblutetrazolyum
Ni-NTA	: Nikel-nitrilotriasetik asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil klorür
RH	: Reaksiyon hacmi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N, N, N', N',-tetrametiletildiamin
w/v	: Ağırlık/hacim
v/v	: Hacim/hacim

1. ÖZET

Bu çalışmada merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan yapısı ve işlevi henüz açıklığa kavuşmamış olan G_{α} proteininin rekombinant olarak *E.Coli*'den saflaştırılması amaçlandı.

Rekombinant G_{α} cDNA'sının, alıcı hücre olarak *E.Coli Top10* hücreleri kullanılarak, pQE80 vektör sistemine alt klonlanması gerçekleştirildi. En uygun ekspresyon düzeyi farklı IPTG koşullarında ve farklı sıcaklıklarda belirlendi. 1 mM IPTG derişiminde 25°C'taki sıcaklıkta yüksek miktarda çözüner protein eldesinin mümkün olduğu saptandı.

His etiketli G_{α} proteini Ni-NTA ilginlik kromotografisi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırmanın her aşamasındaki protein miktarları Lowry yöntemiyle belirlendi. Elde edilen G_{α} proteinlerinin analizi SDS-PAGE ve G_{α} proteinine özgül antikor kullanarak Western emdirimi analizi ile gerçekleştirildi. Afinite kromotografisinden elde edilen proteindeki safsızlıklardan kurtulmak için, protein Sephadex G-100 (moleküler elek kromotografisi) kolonuna verildi. Böylelikle ikinci bir saflaştırma işlemi uygulanmış oldu.

Protein etkinliğini belirlemek üzere floresans ölçümleri yapıldı. Proteinin içsel floresans spektrumları elde edildi. Proteinin guanin nükleotid bağlama etkinliği BODIPY FL-GTP γ S probu kullanılarak gösterildi. Guanin nükleotid bağlama etkinliği ayrıca, GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu [³⁵S]GTP γ S kullanılarak belirlendi.

Kullanılan pQE80 ekspresyon sistemiyle etkin G_{α} proteininin çözüner kesimden eldesi mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler: G_{α} protein, pQE80, His-Tag, klonlama, ekspresyon, saflaştırma, BODIPY FL-GTP γ S, floresans spektroskopisi.

2. SUMMARY

Studies on G Protein Structure and Function

This study was designed to overexpress and purify recombinant G_{α} protein, the most abundant type of G-protein in the nervous system. G_{α} protein was subcloned into the pQE80 vector system. Recombinant G_{α} was expressed in *E.Coli Top10* cells that were transformed with pQE80 plasmid. Optimum expression levels were determined by using different IPTG concentrations and temperatures for induction. Soluble protein was obtained by overnight induction with 1mM IPTG at 25°C.

His-tagged G_{α} protein was purified with Ni-NTA affinity chromatography. The protein was further purified by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The quantity of protein was detected by the Lowry method. The presence of G_{α} was monitored by SDS-PAGE and Western blot analysis by using monoclonal G_{α} antibody.

Fluorescent measurement assays were performed in order to demonstrate the intrinsic fluorescence of G_{α} protein. The intrinsic fluorescence of protein was determined from its emission spectroscopy. The guanine nucleotide binding activity of G_{α} protein was demonstrated by using the BODIPY FL-GTP γ S probe. The guanine nucleotide binding activity of G_{α} protein was also measured by [³⁵S]GTP γ S binding assay.

In conclusion, we were able to purify active G_{α} protein by using the pQE80 expression vector system.

Key Words: G_{α} protein, pQE80, His-Tag, cloning, expression, purification, BODIPY FL-GTP γ S, fluorescence spectroscopy.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Heterotrimerik guanin nükleotit bağlayıcı proteinler (G proteinleri) hücre yüzeyinden alınan bilgiyi hücresel efektör sistemlere ileterek cevap oluşmasını sağlayan sinyal ileti yollarında çok önemli role sahip aracı moleküllerdir. G proteinleri, sayıları birkaç yüzü bulan, membranı yedi kez kateden reseptörlere (GPCR) kenetlenerek, görme, koku, tat alma gibi duyuşsal algıların yanısıra, hücre büyümesi, hormonal yanıt oluşturma ve nöronal aktivite gibi birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesine katkıda bulunurlar (1,2) .

Heterotrimerik G-proteinleri, alfa (α), beta (β), gama (γ) olarak adlandırılan üç farklı altbirimden oluşan moleküllerdir. G-proteinleri, bu özellikleri ile sinyal iletiminde rol oynayan monomerik GTP-bağlayıcı proteinlerden ayrılmaktadır. G-proteinlerine GTP'nin bağlanması ve hidrolizi ile aktif ve inaktif durumlar oluşmaktadır. Uyarılan α altbirimi, hedef enzim sistemlerine ulaşarak çeşitli hücresel cevapların oluşmasına neden olur (3).

G-protein altbirimlerinin birincil yapıları oldukça çeşitlidir. Bugüne kadar tanımlanan 27 G_{α} , 5 G_{β} , 14 G_{γ} altbirimi 1890 farklı sinyal kombinasyonu yaratmaktadır (4). α ve $\beta\gamma$ altbirimlerinin birbirinden ayrılarak fonksiyon göstermesi, eş zamanlı iki efektörün kontrolüne olanak tanımaktadır. Ayrıca, G-proteinlerinin işleyiş özellikleri sinyal çoğaltımına olanak sağlamaktadır (5). G-proteinleri, GTP bağlama ve GTPaz etkinliğine sahip olan α altbirimine göre 4 alt gruba sınıflandırılmaktadır. Bugüne değin, 20 kadar farklı G_{α} -altbirimi saptanmış ve bunlar amino asit dizilimine göre $G_{s\alpha}$, $G_{i\alpha}$, $G_{q\alpha}$ ve $G_{12\alpha}$ olarak dört gruba bölünmüşlerdir. G-protein α altbirimleri % 45-80 benzerlik gösterirken, β ve γ altbirimleri % 50-83 benzerlik göstermektedirler (2).

G_i ailesinin bir üyesi olan G_o proteini, merkezi sinir sisteminde en yaygın görülen G proteini tipidir. Özellikle beyinde, adrenal medullada ve sinir dokularında bulunan $G_{o\alpha}$ 'nın nöronal voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını kontrol ettiği, K^+ kanallarının

uyarılmasında rol oynadığı ve hücre gelişmesinde doğrudan etkili olduğu düşünülmektedir (3). G_o proteininin muskarinik reseptörler ve rodopsinle işlevsel etkileşimi saptanmışsa da, fizyolojik rolü hakkında cevaplanmamış sorular mevcuttur.

$G_{o\alpha}$ 'nın adenilat siklazın bazı izoformlarını baskıladığı bilinmektedir, ancak bunun fizyolojik önemi henüz değerlendirilmemiştir (5). $G_{o\alpha}$ 'nın nörit uzamasında katkısı olduğunu düşündüren çalışmalar vardır. Örneğin, sinir büyüme faktörü ile işlem görmüş feokromositoma PC12 hücrelerinde $G_{o\alpha}$ 'nın gelişmekte olan nöritlerde yoğunlaştığı gözlenmiştir (6). Ayrıca, nörit uzaması esnasında, nöronlarda $G_{o\alpha}$ ve nöromodulin'in ekspresyonlarının başladığı belirlenmiştir. Son zamanlarda, bu olayın düzenlenmesine aday bir efektör adayı, GRN1, izole edilmiş ve Neuro 2a hücrelerinde $G_{o\alpha}$ ile birlikte ekspres edildiğinde, nörit uzamasına yol açtığı saptanmıştır (7).

G_o 'nun bazı nörolojik hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir. Nöroendokrin tümörlerde $G_{o\alpha}$ düzeyinin non-endokrin tümörlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (8). Ayrıca, $G_{o\alpha}$ 'nın Alzheimer hastalığında öncül bir protein olan APP reseptörü ile etkileştiği ileri sürülmektedir (9). G_o 'nun sinir sisteminde yaygın olarak bulunması nedeniyle, üç boyutlu yapısı ile işlevi arasındaki bağlantının açığa çıkarılması önem kazanmaktadır. Ayrıca, G_o 'nun bazı nöroendokrin bozukluklarda olası rolü, G_o 'yu nörolojik hastalıklara yönelik ilaç tasarımı için ilginç bir protein yapmaktadır. $G_{o\alpha}$ 'nın ekspresyonu ve saflaştırılması Linder ve Gilman tarafından gerçekleştirilmişse de, henüz kristalizasyon ve yapı analizi üzerine yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır (10).

Biz bu çalışmada, sinir sisteminde yaygın olarak bulunan ve işlevi henüz tam açıklığa kavuşturulmamış olan G_o -proteinini, yapısal ve işlevsel çalışmalar yapabilmek amacıyla rekombinant olarak üretmeyi amaçladık. Günümüzde proteinlerin yüksek miktarlarda üretilmesini sağlayan pekçok ekspresyon sistemi bulunmaktadır (11). Bu sistemler ayrıca protein sentezi sırasında proteinin amino ya da karboksil ucuna ekledikleri etiketler yoluyla protein saflaştırmasını kolaylaştırırlar. Biz çalışmamızda vektör sistemi olarak pQE80 (Qiagen) vektör sistemini tercih ettik.

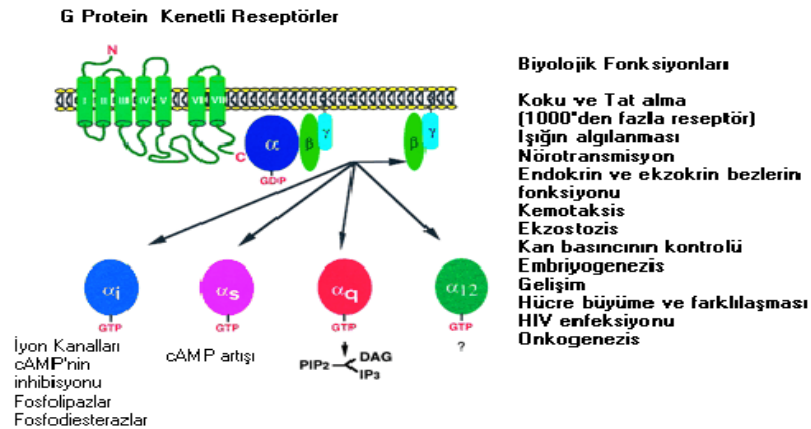
İlk olarak, G_o proteininin α altbirim cDNA'sının pQE (Qiagen) vektörüne klonlanmasını planladık. Koloni taraması PCR kontrolü ile gerçekleştirildikten sonra elde edilen pQE80- $G_{o\alpha}$ plazmidi izole edilip dizi analizine gönderildi. Dizi analizi sonucu klonlanmanın doğru olarak gerçekleştiği belirlendikten sonra ekspresyon deneylerine başlandı. Küçük ölçekli ekspresyon deneyleriyle proteinin çözümlenebilir olduğu belirlendikten sonra histidin etiketli füzyon proteinleri afinite kromatografisi ve moleküler elek kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı.

$G_{o\alpha}$ proteininin GTP bağlama etkinliği floresans spektroskopik ölçümlerle ve [35 S]GTP γ S kullanılarak belirlendi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. G-Proteinleri

Tüm hücreler çevresinden bilgiyi alıp işleme kapasitesine sahiptir. Işık, koku gibi dış sinyaller özelleşmiş duyu organlarındaki hedef hücreleri uyarır. Bu uyarıyı takiben serbestlenen hormonlar, nörotransmitterler ve büyüme faktörleri, komşu veya uzak hücreler arasında kimyasal haberciler olarak davranırlar. Bu habercilerin hücre yüzeyindeki özel reseptörlerle etkileşimi sinyal iletimindeki moleküler olay şelalesinin ilk basamağını oluşturur. Birçok durumda bu reseptörlerin uyarılmasıyla, efektör proteinler uyarılmakta ve hücre içinde karakteristik davranışları başlatan ikincil habercilerin oluşması sağlanmaktadır. Tüm ökaryotik organizmalarda, heterotrimerik G-proteinleri, hücre yüzeyinden alınan bilgiyi hücre içi sistemlere ileterek cevap oluşmasını sağlayan sinyal ileti yollarında çok önemli role sahiptir. G proteinleri protein sentezinden sorumlu elongasyon faktör (EF-Tu) ve ras p21 gibi küçük monomerik GTP bağlayıcı proteinleride içine alan geniş GTPaz ailesinin bir üyesidir (1,2). Fotonlar, koku uyarıcıları, nörotransmitterler, hormonlar, glikoproteinler, kemokinler gibi uyarıcılar G protein kenetli reseptörlere bağlanarak bu reseptörlerin aktivasyonunu sağlarlar. Aktive olan reseptörler G proteinleri ile etkileşerek çeşitli biyolojik cevapları oluştururlar (12)(Şekil 4.1).



Şekil 4.1. G protein kenetli sinyal ileti sisteminin çeşitliliği (12)

Heterotrimerik G-proteinleri farklı efektörlerin sinyallerinde gerekli olan alfa (α), beta (β), gama (γ) altbirimlerinden oluşurlar (12). İnsan genom dizisinin tanımlanmasıyla 27 G_α , 5 G_β , 14 G_γ altbirimi 1890 farklı kombinasyonla tanımlanmıştır. Bazı kombinasyonlar *in vitro* ortamda oluşmamakla birlikte büyük bir çeşitlilik ortaya çıkmaktadır (4).

G-proteinleri, GTP bağlama ve GTPaz etkinliğine sahip olan α altbirimlerinin birincil dizilerine göre 4 alt gruba sınıflandırılmaktadır. G_α altbirimlerinin molekül ağırlıkları 39-50 kDa arasında değişmektedir. Bugüne değin, 20 kadar farklı G_α altbirimi saptanmış ve bunlar amino asit dizilimine göre $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$ ve $G_{\alpha 12/13}$ olarak dört gruba bölünmüşlerdir (13). G-protein α altbirimleri % 45-80 benzerlik gösterirken, β ve γ altbirimleri % 50-83 benzerlik göstermektedirler (2).

$G_{\alpha q}$ ailesi G_q , G_{11} , G_{14} , G_{16} proteinlerini içermekte, fosfolipaz C aktivasyonunu sağlamaktadırlar. $G_{\alpha i/o}$ ailesinin 6 üyesi olmakta, G_{11} , G_{12} , G_{13} , G_{o1} , G_{o2} , G_z adenilil siklaz inhibisyonunda rol almaktadırlar. $G_{\alpha s}$, adenilil siklaz uyarılmasında rol oynamaktadır (14).

G_β altbirimlerinin molekül ağırlığı 35-39kDa, G_γ altbirimlerinin molekül ağırlığı 7-9 kDa arasında değişmektedir. G_β altbirimi β_{1-5} ve G_γ altbirimi γ_{1-12} olarak sınıflandırmaktadır. Şu anda bilinmekte olan retinal konilerde β_3 ve retinal çubuklarda ise γ_1 olduğu bilimektedir. Uzun bir dönem $\beta\gamma$ kompleksinin negatif düzenleyici olduğu düşünülmüştür. G_i proteininden serbestlenen $\beta\gamma$ kompleksinin diğer α altbirimlerini inaktif heterotrimer oluşturarak inaktif ettiği düşünülmüş ve $\beta\gamma$ altbiriminin bu mekanizmayla adenilil siklaz aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Son yıllarda hem α altbiriminin hem de $\beta\gamma$ kompleksinin pozitif efektör düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir. Bu efektörlere örnek potasyum kanalları, adenilat siklazın bazı izoformları, fosfoinositid-3-kinaz, β -adrenerjik reseptör kinaz (β -ARK) verilebilir. Bunun dışında $\beta\gamma$ altbirimlerinin mitojen-aktive kinazların (MAPK) aktivasyonunda rol

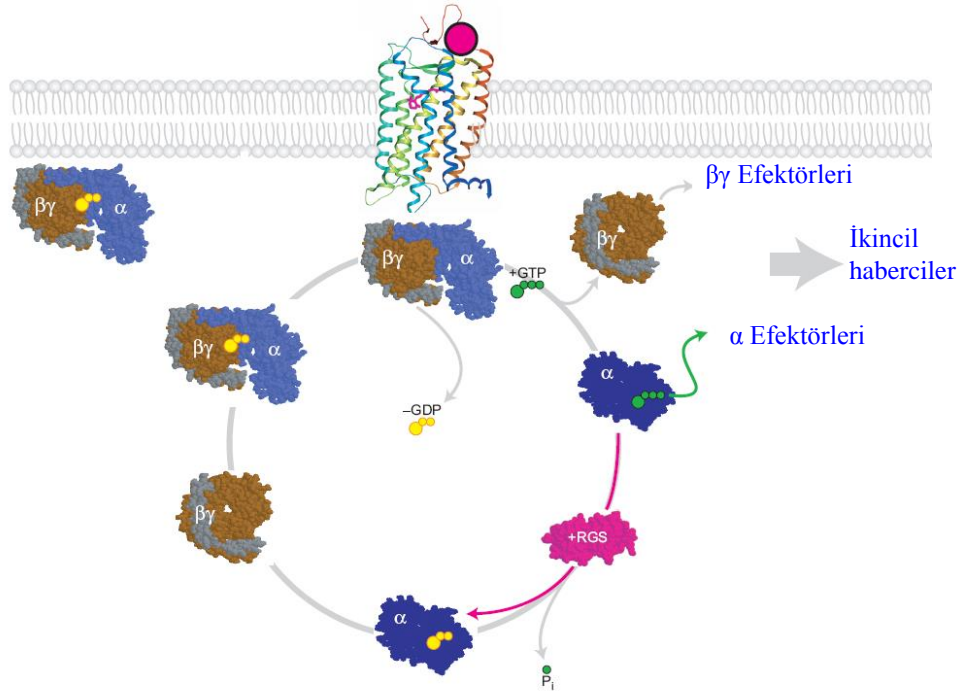
oynadığı gösterilmiştir (14). Tablo 4.1’de G proteinlerin etkileştiği efektörler görülmektedir (15).

Tablo 4.1. G Protein Efektör ve Düzenlenmesi

G Protein (sınıf)	G Protein (alt birim)	Efektör	Efektörün düzenlenmesi
G _s	G _{as}	AC1-9	Uyarılma
		c-Src	Uyarılma
		RGS-PX1	Uyarılma
G _i	G _{olf}	Tubulin	GTPaz aktivitesinin Uyarılması
	G _{atr}	ACS	Uyarılma
		PDE6	Uyarılma
	G _{atc}	PDE6	Uyarılma
	G _{ag}	PDE	Uyarılma
	G _{ai1-3}	AC5,AC6	İnhibisyon
		G _{ao}	c-Src
	RAP1GAPII		RAP1GAP’ın durdurulması
	Ca ⁺² Kanalları		İnhibisyon (G _{αo})
	G protein aracılığı ile aktive olan K ⁺ Kanalları (GIRK)		Uyarılma (G _{αi})
Tubulin	GTPaz aktivitesinin uyarılması		
G _{βγ}	G _{βγ}	G protein aracılıklı nörit büyümesini düzenleyici (GRIN1 ve GRIN2)	Bilinmiyor
		PI3Kγ, PI3Kβ	Uyarılma
		AC2, AC4, AC7	Uyarılma
		AC1	İnhibisyon
		PLCβ1-3	Uyarılma
		GRK2, GRK3	Plazma membranını düzenleme
		GIRK1, GIRK2 ve GIRK4	Uyarılma
		ATP-hassas K ⁺ kanalları	Uyarılma
		Ca ⁺² kanalları	İnhibisyon
		Küçük GTP bağlayıcı	Plazma membranını düzenleme

		Proteinler	
		Bruton's tirozin kinaz	Uyarılma
		Tsk tirozin kinaz	Uyarılma
		Protein kinaz D	Uyarılma
		Kalmodulin	Kalmodulin kinaz uyarılması
		Tubulin	GTPaz aktivite artışı
		Shc	Uyarılma
		Raf1 protein kinaz	Gβγ durdurulması
G _q	G _{αq,11}	PLCβ1-4	Uyarılma
	G _{αq 14, 15,16}	Lösemiye eşlik eden Rho	Uyarılma
		GEF, GRK2, GRK3	
		Bruton's tirozin kinaz	Uyarılma
G ₁₂	G _{α12}	P115-RhoGEF, PDZ-	Uyarılma
	G _{α13}	RhoGEF, GAP1m	Uyarılma
G _h	G _{αh}	PLCγ1	Uyarılma
Küçük G	Arf	PLD1	Uyarılma
proteinler	Rho A	fosfotidilinositol 4P 5-kinaz	Uyarılma

G proteinlerinin genel işleyiş mekanizmaları şu şekildedir: G proteinleri dinlenme durumunda hücre dışı reseptörlerle ve hücre içi efektör sistemleriyle etkileşim halinde değildirler (13)(Şekil 4.2). Hormonun reseptöre bağlanmasıyla, reseptör G proteiniyle etkileşir ve G proteininde konformasyonel bir değişiklik meydana gerçekleşerek GDP serbestlenir. Serbestlenen GDP'nin yerine GTP bağlanır ve G_α altbirimi, Gβγ dimerinden ve reseptörden ayrılır. GTP bağlı G_α altbirimi ve Gβγ dimeri adenilil siklaz, fosfodiesteraz, fosfolipaz C ve iyon kanalları gibi çok sayıda çeşitli efektör sistemlerle etkileşirler. Diğer düzenleyici faktörlerin yokluğunda, G_α altbiriminin içsel GTPaz aktivitesi, bu altbirimi aktif olmayan duruma dönüştürür. GTP, GDP'ye hidrolizlenir, G_α ve Gβγ altbirimleri tekrar üçlü kompleks yapıya dönüşürler (13).



Şekil 4.2. G protein genel işleyiş mekanizması (13)

G-proteinlerinin etkileştiği reseptör ailesi oldukça geniştir. 1998'in sonlarına doğru, üç yüzden fazla G-proteini ile etkileşen reseptör ailesi gen bankasına girmiştir. Bunlardan başlıcaları adrenerjik reseptörleri ($\alpha 1a$, $\alpha 1b$, $\alpha 1d$, $\alpha 2a$, $\alpha 2b$, $\alpha 2c$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), muskarinik asetilkolin reseptörleri (M1, M2, M3, M4, M5), dopamin reseptörleri (D1, D2, D3, D4, D5), histamin reseptörleri (H1, H2) ve vazopresin reseptörleridir (V1a, V1b, V2) (16).

Efektörler ise reseptörlerin aksine oldukça sınırlı saydadırlar. Efektör moleküller arasında adenilil siklaz (I,II,III,IV,V,VI,VII,VIII,IX), cGMP'ye özgü fosfodiesteraz, fosfolipaz C, fosfoinositid 3-kinaz, fosfolipaz A2 ve iyon kanalları sayılabilir (K^+ , Ca^{+2} , Na^+ , Cl^-) (16).

G_α proteinlerinin aktif, inaktif ve geçiş durumlarındaki kristal yapılarının çözümlenmesi, G proteinlerinin sinyal ileti yolağındaki moleküler anahtar olarak görev almasının temelini anlamada etkilidir. Günümüze kadar çok az G proteini

kristalleştirilmiştir (Tablo 4.2.). Bu yapıların yorumlanması ve sonuçları altbirim kombinasyonlarının karmaşasının tamamını yansıtmamaktadır. Ayrıca bu protein yapılarının statik doğası, G proteinlerinin dinamik doğasını anlamayı sınırlandırmaktadır (17).

Tablo 4.2. G Protein Kristal Yapıları

PDB kodu	Yapı	Çözünürlük (Å°)
1GOT	Heterotrimerik G $\alpha\beta\gamma$ t kompleksi	2.00
1GDP2	Heterotrimerik G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ kompleksi	2.30
1TAD	G α_t -GDP.AIF $^-_4$	1.70
1TAG	G α_t -GDP Mg $^{+2}$	1.80
1TND	G α_t -GTP γ S	2.20
1AZT	G α_s - GTP γ S	2.50
1GFI	G α_{i1} - GTP	2.2
1TBG	G $\beta\gamma$ dimer	2.1

4.2. G $_{o\alpha}$ Proteini

Büyük oranda merkezi sinir sisteminde bulunan G $_o$ proteini G $_i$ ailesinin bir üyesidir. G $_{o\alpha}$ proteini sığır beyninden boğmaca toksin substratlarının saflaştırılması sırasında izole edilmiş olup, ilk cDNA dizisi 1986'da yayınlanmıştır (18).

-196
-118

GAATATCTGTGAACAAAGCATAGGAATAAAATGGGGGTTCTGGTTCTCGACATTTTGTGTTTCAGCCCAAGGGGA

GCCTATCGTGAATTTTTCCCTTTGAGCCGAGGTTCTGCTCTTTGGGGGGTGGGGGCGCGAGCCGGGGAGCCGTGCCAGCAGAGTGTGGCGGGCTGTGGCAGGGAAGGGGCCACC

1 Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg Ala Ala Leu Glu Arg Ser Lys Ala Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Asp Gly Ile Ser Ala
 1 ATG GGA TGT ACT CTG AGC GCA GAG GAG CGA GCC CTC GAG CGG AGC AAG GCG ATT GAG AAA AAC CTC AAA GAG GAT GGC ATC AGC GCC

31 Ala Lys Asp Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly
 91 GCC AAA GAC GTG AAA TTA CTC CTG CTG GGG GCT GGA GAA TCA GGA AAA AGC ACC ATT GTG AAG CAG ATG AAG ATC ATC CAC GAA GAC GCC

61 Phe Ser Gly Glu Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr
 181 TTC TCT GGC GAA GAC GTG AAG CAG TAC AAG CCC GTG GTC TAC AGC AAC ACC ATC CAG TCC CAG ATC TCC CAG ATG AAG ATC ATC CAC GAA GAC ACT

91 Leu Gly Ile Glu Tyr Gly Asp Lys Glu Arg Lys Ala Asp Ala Lys Met Val Cys Asp Val Val Ser Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe
 271 CTG GGC ATC GAG TAC GGT GAC AAG GAG CGA AAG GCC GAC GCC AAG ATG GTG TGT GAC GTG GTG AGT CCG ATG GAA GAC ACG GAG CCC TTC

121 Ser Pro Glu Leu Leu Ser Ala Met Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln Glu Cys Phe Asn Arg Ser Arg Glu Tyr Gln Leu Asn
 361 TCT CCA GAG CTG CTC TCC GCC ATG ATG CGA CTC TGG GGC GAC TCG GGG ATC CAG GAG TGC TTC AAC AGG TCC CCG GAA TAT CAG CTC AAC

151 Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu Asp Arg Ile Gly Ala Ala Asp Tyr Gln Pro Thr Glu Gln Asp Ile Leu Arg ~~THR~~ ARG VAL
 451 GAC TCT GCC AAA TAC TAC CTG GAC AGC CTG GAC GCG ATC GGG GCC GCC GAC TAC CAG CCC ACC GAG CAG GAC ATC CTC CGA ACC AGG GTC

181 LYS Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Lys
 541 AAA ACC ACC GGC ATC GTA GAA ACC CAC TTC ACA TTC AAG AAC CTC CAC TTC AGG CTG TTC GAC GTC GGG GCC CAG CCG TCT GAG CGC AAG

211 Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp Val Thr Ala Ile Ile Phe Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu His Glu Asp Glu Thr
 631 AAG TGG ATT CAC TGC TTC GAG GAC GTC ACG GCC ATC ATC TTC TGT GTC GCG CTC AGC GGC TAT GAC GTC CAC GAA GAC GAG ACC

241 Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Met Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn Asn Lys Phe Phe Ile Asp Ile Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn
 721 ACG AAC CGC ATG CAC GAG TCT CTC ATG CTC TTC GAC TCC ATC TGT AAC AAC AAG TTC TTC ATC GAT ATC TCC ATC ATT CTC TTC CTC AAC

271 Lys Lys Asp Leu Phe Gly Glu Lys Ile Lys Lys Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe Pro Glu Tyr Thr Gly Ser Asn Thr Tyr Glu Asp Ala
 811 AAG AAA GAT CTC TTT GGG GAG AAG ATC AAG AAG TCA CCT CTG ACC ATC TGC TTT CCC GAG TAC ACA GGC TCC AAC ACC TAT GAA GAC GCC

301 Ala Ala Tyr Ile Gln Ala Gln Phe Glu Ser Lys Asn Arg Ser Pro Asn Lys Glu Ile Tyr Cys His Met Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn
 901 GCC GCC TAC ATC CAA GCA CAA TTT GAA AGC AAA AAC TCA CCC AAC AAA GAA ATT TAT TGT TAC CAC ATG ACT TGT GCC ACA GAC ACG AAT

331 Asn Ile Gln Val Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Ile Ile Ile Ala ASN ASN LEU ARG GLY CYS GLY LEU TYR stop
 991 AAT ATC CAG GTG GTA TTC GAC GCT GTC ACC GAC ATC ATC ATT GCC AAC AAC CTC CCG GGC TGC GGC TTG TAC TGA CCTTTGTCCTGTATAGCA

1085 ACCTATTGACTGCTTCACGGACTCTTTGCTGTGAAGATCTCTGGTAGCATGACCTTTTGGCCCTTTGTTAAGACACACAGCCCTTCTGTATCAGCCCCCTGCTAACCTACGACC
 1204 AGAGTGACTGACGGCTGTGTACTCTCTAGAAATGCTATAGAAATCGCGCTTTAGTTTGGACTTTTACATTAGAA

Şekil 4.3. Sığır G_{α} 'sının $\lambda G09$ klonundan çıkarılan aminoasit ve nükleotid dizisi. Nükleotidler 5'-3' yönündedir. Başlangıç ATG kodonu ökaryot mRNA'larda sıkça bulunan ACC'yi izlemektedir. Boğmaca toksini tarafından ADP-ribozillenme bölgelerindeki aminoasitler büyük harflerle, triptik peptid bölgeleri ise altı çizili olarak verilmiştir. Bu dizi sıçan G_{α} cDNA'sı ile karşılaştırıldığında %92 civarında benzerlik bulunmuştur (19)

G_o proteini 39 kDa ağırlığında alfa, 36 kDa ağırlığında beta ve 11 kDa ağırlığında gama altbirimini içermektedir. Açık okuma çerçevesindeki 1062 nükleotid 354 aminoasiti kodlamaktadır. Dizi olarak $G_{i\alpha}$ ile %73, $G_{s\alpha}$ ile %34 benzerlik göstermektedir. İnsan, sıçan, sığır türlerinde aminoasit dizisi %98 korunumludur (20).

G_{α} proteini beyinde ve merkezi sinir sisteminde oldukça yaygın görülmekle birlikte kalp, salgı bezleri, adrenal medullada, sinir dokularında ve pankreas'ta da eksprese olmaktadır (21). G_{α} 'nın beyin ve kalpteki kesin işlevi henüz bilinmemektedir. G_{α} 'nın sinir sisteminde yapılan çalışmalarda nöronal sinyal iletilişinde işlevi belirlenmiştir. G_{α} , nöronal voltaj kapılı kalsiyum kanallarını kontrol etmesinin yanı sıra potasyum kanallarının uyarılmasında da rol oynamaktadır (22).

G_{α} 'nın adenilil siklazın bazı izoformlarını baskıladığı bilinmektedir, ancak bunun fizyolojik önemi henüz değerlendirilmemiştir (20). G_i ve G_o 'nun ekspresyon düzeyleri oldukça yüksek olduğundan, reseptör bağımlı aktivasyonları oldukça yüksek $\beta\gamma$ kompleksinin serbestlenmesine neden olmaktadır. G_i/G_o aktivasyonunun $\beta\gamma$ aracılı sinyal olaylarının etkinleşmesinde temel mekanizma olduğuna inanılmaktadır (23). G_i/G_o proteinlerinin karboksil ucu boğmaca toksiniyle ADP ribozillenir. Karboksil ucunun ADP ribozillenmesi G_i/G_o proteinlerinin reseptör ile etkileşimini bozmaktadır.

Diğer G proteinlerinden farklı olarak, sinir sisteminde bol bulunan G_o proteininin etkisi çoğunlukla $\beta\gamma$ kompleksiyle gerçekleşmektedir.

G_i/G_o ile kenetlenen muskarinik asetilkolin (M_2) reseptörü, kalbin parasempatik düzenlenmesine aracılık etmektedir. Parasempatik sistemin negatif kronotropik ve dromotropik etkileri adenilat siklazın G_i aracılı baskılanmasıyla olmaktadır. cAMP üretiminin baskılanması gerçekleşirken, etkinleşen G_i/G_o 'dan yüksek miktarda $\beta\gamma$ kompleksinin serbestlenmesi G protein kapılı içe doğru düzeltilmiş potasyum kanallarının (GIRK) aktivasyonuna yol açar. Elektrofizyolojik ve biyokimyasal çalışmalarda GIRK kanal düzenlenmesinde $G_{\beta\gamma}$ kompleksinin gerekliliği gösterilmiştir (24). Potasyum kanallarının uyarılmasıyla düzenlenmesine ek olarak kalp fonksiyonunun muskarinik düzenlenmesi, bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla voltaj bağımlı L-tipi Ca^{+2} kanallarının baskılanmasına yol açar (25).

Fotoreseptör hücrelerde G_{α} proteininin etkisi incelenmiştir. Fotoreseptör hücrelerde ışığın neden olduğu hiperpolarizasyon glutamatın salınmasını azaltmaktadır. Serbestlenen glutamat retinadaki ikincil nöronları iki şekilde etkiler. Off-bipolar hücrelerde depolarizasyon, on-bipolar hücrelerde ise hiperpolarizasyon gerçekleşir. Off bipolar hücrelerde ionotropik glutamat reseptörü, on bipolar hücrelerde ise metabotropik glutamat reseptörü (mGluR6) ile etkileşim gerçekleşmektedir. mGluR6 ve G_{α} eksik olan farelerde, on bipolar hücrelerinin ışığa yanıtının bozulması, G_o

proteininin on-bipolar hücrelerde, glutamatın neden olduğu inhibisyonda birincil aracı olduğunu göstermektedir (26-28).

G_{α} 'nın nörit uzamasında katkısı olduğunu düşündüren çalışmalar vardır. Örneğin, sinir büyüme faktörü ile işlem görmüş feokromositoma PC12 hücrelerinde G_{α} 'nın gelişmekte olan nöritlerde yoğunlaştığı gözlenmiştir (6). Ayrıca, nörit uzaması esnasında, nöronlarda G_{α} ve nöromodulin'in ekspresyonlarının başladığı belirlenmiştir. Son zamanlarda, bu olayın düzenlenmesine aday bir efektör aday, GRN1, izole edilmiş ve Neuro 2a hücrelerinde G_{α} ile birlikte ekspres edildiğinde, nörit uzamasına yol açtığı saptanmıştır (7).

G_o 'nun bazı nörolojik hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir. Nöroendokrin tümörlerde G_{α} düzeyinin non-endokrin tümörlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (8). Ayrıca, G_{α} 'nın Alzheimer hastalığında öncül bir protein olan APP reseptörü ile etkileştiği ileri sürülmektedir (9).

Amiloid $\beta/A4$ öncü protein APP, nöron yüzeyinde bulunan ve reseptör yapısında bir proteindir. Bu protein korunumlu bir sitoplazmik bölgeye sahiptir ve G_o proteini ile kompleks oluşturmaktadır. Sitoplazmik bölgedeki His657- Lys676 bölgesinin G_o proteinini aktive ettiği saptanmış, Nishimoto ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda bu kısa peptidin $GTP\gamma S$ bağlanma hızını doza bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir(9). Good ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ise, sentetik APP ve saf G_{α} içeren fosfolipid kesecikler kullanarak düşük derişimlerde APP'nin GTP hidrolizini arttırdığı, ancak yüksek derişimlerde azalttığı saptanmıştır (29). Brouillet ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ise, APP'nin N-ucuna özgün bir antikorla etkileştirilen nöron membranlarında GTPaz etkinliğinin azaldığı bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca, APP ile G_{α} etkileşiminin hücre dışı sinyaller tarafından düzenlenebileceği gösterilmiştir (30).

Dopaminin D2 reseptörlerine bağlanma afinitesinin GTP ile düzenlenmesinin G_o proteini eksik olan farelerde kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bu veriler, merkezi sinir

sisteminde D2 reseptörünün G_i proteininden çok G_o proteini ile etkileştiğini göstermektedir (31).

4.3. G Proteinleri Üzerine Yapı Çalışmaları

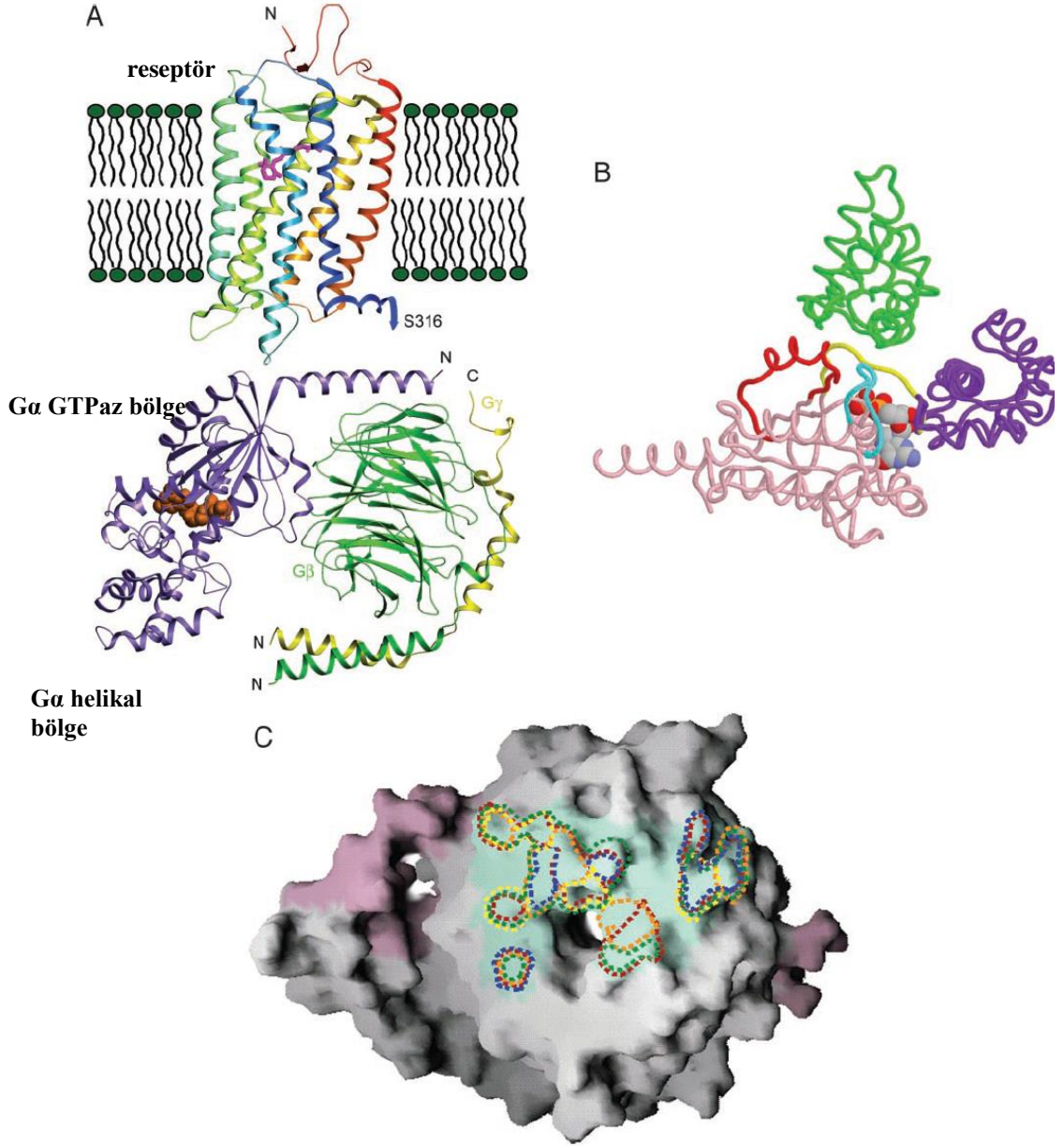
G proteinlerinin aktif, inaktif, geçiş durumları ve inaktif heterotrimerik durumlarının kristal yapılarının çözümlenmesi G proteinlerinin moleküler anahtar olarak biyomekanizmalarını anlamada bir çerçeve sunmaktadırlar. Transdüsin kristalleri ile yapılan yapı analizleri alfa altbiriminin iki bölgeden oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.4) (2). Bunlardan ilki GTPaz bölgesidir. Tüm GTPaz'larda ortak olan bu bölge, reseptör tirozin kinazların aktivasyonuna bağlı olarak hücre çoğalması ve farklılaşmasında etkili sinyalden sorumlu olan monomerik GTP-bağlayıcı protein ras p21'e benzemektedir. İkinci bölge ise tüm heterotrimerik G proteinlerde aynı olan α -sarmal bölgesidir (32). GTPaz bölgesi altı uzun β şeridi (β_1 - β_6) çevreleyen beş α -sarmalından oluşmuştur (2). β şeritlerinin beşi birbirine paralel, bir tanesi ise (β_2) diğerine anti-paraleldir. GTPaz bölgesi, tüm GTPazlarda GTP'nin bağlanmasında gerekli ortak bölgeleri içermektedir. Bunlar fosfat bağlama halkası (P halkası), Mg^{+2} bağlama rezidüleri ve 2 guanin bağlama halkasıdır (2).

Sarmal bölge tümüyle α -sarmal ikincil yapıya sahiptir ve uzun bir merkezi sarmal beş kısa sarmal tarafından çevrelenmiştir. Bunlar da 54-58 ve 173 -179 bağlaç bölgeleri ile GTPaz bölgesine bağlanmışlardır. Sarmal bölge ile GTPaz bölgesinin sıkıca bağlanabileceği derin bir yarıklık vardır.

G protein α altbirimi GTPaz bölgesi GTP'nin hidrolizinden ve bağlanmasından, sarmal bölge ise GTP'nin protein içine gömülmesinden sorumludur (Şekil 4.5). Sarmal bölge G proteinleri içinde çeşitliliğe sahip olduğundan, reseptör-efektör-G protein yönelmesinde önemli rol oynamaktadır (17).



Şekil 4.4. G α .GDP'nin şematik yapısı. GTPaz bölgesini oluşturan α -sarmalı ve β -şeritleri (2).

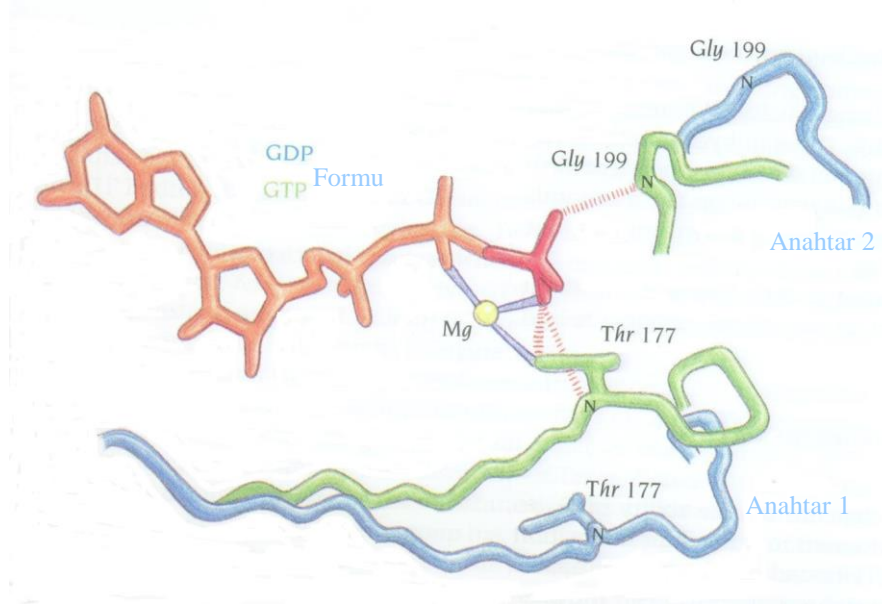


Şekil 4.5. G_t , RGS4- $G_{\alpha i-1}$ karmaşımında, G_{β} üzerindeki efektör etkileşim bölgeleri, A; Heterotrimerik G_t proteininin membran üzerindeki yerleşimi $G_{\alpha t}$ (mor), GDP molekül (kırmızı), G_{β} (yeşil), G_{γ} (sarı), rodopsin heliksi (kırmızı'dan koyu maviye doğru), rodopsin içindeki retinal bölge (bordo), B; RGS4- $G_{\alpha i-1}$ kompleks: RGS4 (yeşil) $G_{\alpha i-1}$ (kırmızı), $G_{\alpha i-1}$ - β pileli yapı (mor), GTP molekül (bordo), C; $G_{\beta 1\gamma 2}$ çözünür yüzey modeli (33).

Tüm guanin nükleotid bağlayan proteinler nükleotid bağlanma paketinin çevresinde beş korunmuş diziye sahiptir. Bunlar β,γ fosfat bağlama ilmeği (P-ilmeği) içindeki GXGCCGKS motifi, nükleotid ile etkileşen N/TKXD motifi, Mg^{+2} bağlama dizisi DXXG ve ikinci bir guanin bağlama yeri olan TCAT'dir. TCAT dizisi ras p21'de TSAK ile benzerlik göstermektedir (32).

Alfa alt biriminin aktivasyonunun yapısal temeline bakıldığında, meydana gelen konformasyon değişikliğinin Mg^{+2} ve fosfatların pozisyonlarındaki değişiklikten kaynaklandığı belirlenmiştir.

Aktif ve inaktif konformasyonlarda guanin halkası ve riboz, GTPaz ve α -sarmal bölgelerin arasında gömülüdür. GDP-bağlı konformasyonda GDP'nin β fosfatı ve Mg^{+2} 'u yüzeyde açık iken, GTP bağlı durumda Mg^{+2} ve fosfatlar buldukları pozisyondan bölgeler arasındaki yere gömülürler. Bu hareket GTP'nin γ fosfatı çevresinde meydana gelen bir dizi konformasyon değişikliğinin bir sonucudur. Alfa altbiriminin Mg^{+2} ve GTP-bağlı formundaki fosfatlarla etkileşmesinde anahtar olarak adlandırılan 3 önemli bölge tanımlanmıştır: Arg 174 ve Thr 177'yi de içeren Ser 173-Thr 183 bölgesi anahtar I; Gly 199 ve α 2-sarmalını içeren Phe 195-Thr 215 bölgesi anahtar II; Asp 222-Arg 238 arasındaki halka anahtar III bölgesi olarak adlandırılmıştır (2, 33). Yapısal farklar GTPaz'ın bu üç bölgesinde gerçekleşmektedir. $G_{\alpha t}$ -GDP ve $G_{\alpha t}$ -GTP γ S'in kristal yapıları karşılaştırıldığında GTP bağlı formda üç anahtar bölgenin daha düzgün ve sıkı bir yapı kazandığı belirlenmiştir. Bu bölgelerdeki yapısal değişiklikler oldukça dikkat çekicidir. GDP-bağlı yapıdan GTP-bağlı yapıya geçişte G proteini ile GTP'nin fosfatı arasında kurulan hidrojen bağlarının ve Mg^{+2} iyonu ile kurulan yeni bağların tetikleyici olduğu düşünülmektedir (34).



Şekil 4.6. G_t proteininin GDP-inaktif formuyla GTP aktif formunda etkili anahtar bölgeleri (mavi: inaktif; yeşil: aktif) (34).

Aktivasyon sonrası, anahtar I γ -fosfata doğru hareket ederek, Thr 177 kenar zincirini Mg^{+2} ve γ -fosfata yaklaştırır. Mg^{+2} hem γ -fosfatın düzgün yerleşmesi hem de guanin nükleotid kompleksinin kararlılığı için gereklidir (34). Gly 199'un NH temel zinciriyle, GTP'nin γ -fosfatı arasında kurulan hidrojen bağı, Gly 199 ilmeği ile α 2-sarmalını içeren anahtar II'yi gerer ve döndürür. Anahtar III bölgesinin γ -fosfatla doğrudan etkileşimi yoktur fakat anahtar III anahtar II ile etkileşerek yeni konformasyonun sabit kalmasını sağlar.

Alfa-altbirimlerinin amino ve karboksil uçları hakkında çok az şey bilinmektedir. İki kristal yapıda da amino ucunun β altbirimi ile etkileşmekte olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal çalışmalar bu uç bölgelerinin aktivasyon olaylarında ve protein-protein etkileşimlerinde anahtar rol oynadığını göstermektedir (21).

G protein aktivasyonunu sınırlayıcı basamak nükleotid-bağlanma paketinden GDP'nin serbestlenmesidir. GDP, heterotrimerik G proteininden alfa altbiriminin çeşitine bağlı olan hızla kendiliğinden serbestlenir. Örneğin G α o proteininden GDP

serbestlenme hızı $0,19 \text{ dak}^{-1}$, $G_{\alpha 2}$ proteininden GDP serbestlenme hızı (K_D , rate of release /or/ dissociation) $0,072 \text{ dak}^{-1}$ dir (35).

G_α altbiriminin inaktif durumu $G_{\beta\gamma}$ bağlanmasıyla kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda Mg^{+2} yokluğunda $G_{\beta\gamma}$ 'nın $G_{\alpha o}$ 'nun GDP'ye ilginliğini 300 kat arttırdığını gösterilmiştir. GDP'nin serbestlenmesi, G protein reseptör aktivasyonu ile oldukça kolaylaşmaktadır (17). GTPaz bölgesinin $\beta 6-\alpha 5$ halkasında bulunan TCAT guanin nükleotid bağlanma motifinde meydana getirilen mutasyonlar reseptörden bağımsız kendiliğinden GDP serbestlenmesini arttırmaktadır (36).

İri ve arkadaşları, $G_{\alpha s}$ proteininde A366S (37), Posner ve arkadaşları $G_{\alpha i}$ proteininde A326S (38), Thomas ve arkadaşları $G_{\alpha o}$ proteininde C325S mutasyonları (39) oluşturarak GDP serbestlenmesindeki artışı gözlemlemişlerdir. Bütün bu çalışmalardan elde edilen ortak sonuçlardan, TCAT guanin nükleotid bağlanma motifinin GDP'nin serbestlenmesinde etkili bir bölge olduğu sonucuna varılmıştır. Posner ve arkadaşları GDP serbestlenmesinin G_α 'da büyük bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir.

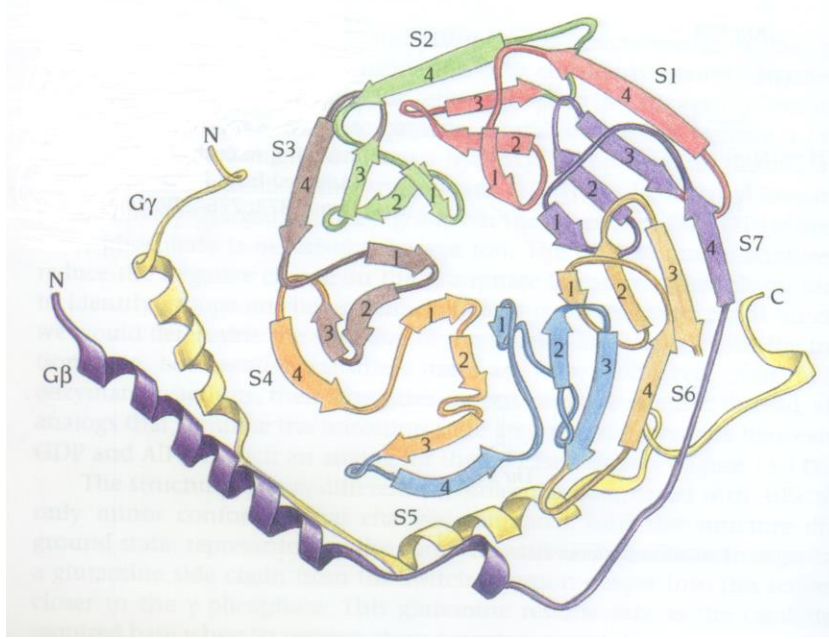
TCAT motifine ek olarak G_α altbiriminin N ve C uç bölgelerinin de GDP serbestlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. $G_{\alpha t}$ proteininde $\alpha 5$ sarmalının iç yüzeyine bakan kısımda üç kalıtıda meydana gelen mutasyon, reseptörün katalizlediği nükleotid değiştirme oranını arttırmaktadır (40). Grishina ve arkadaşları, sarmal bölge ile GTPaz bölgesi arasındaki ara yüzeyin reseptör aracılı aktivasyon, GTP bağlama ve reseptör- G protein ayrılmasında etkili olduğunu göstermişlerdir (41).

Yapılan bir çalışma heterotrimerik G proteinlerinin α -sarmal ve GTPaz bölgeleri arasındaki hidrofobik etkileşimin bazal GDP serbestlenme oranını değiştirdiğini göstermiştir (42).

Yang ve arkadaşları, G_{at}/G_{ai} kimeralarında Cys347-C uç kalıntısını floresan işaretleyerek AlF_4 aktivasyonu ile C ucunun daha hidrofobik çevreye hareket ettiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu meydana gelen hareketin, G_{at}/G_{ai} kimerasının $\alpha 2$ - $\beta 4$ halkasıyla C ucu arasındaki etkileşimden kaynaklandığını önermişlerdir. Bu uç bölgeler, G_{α} altbirimlerinde içsel GTP serbestlenme oranının değişimine kaynaktır. G_{at} 'nin N ve C ucundaki yapısal etkileşimler, G_{at} 'nin yavaş GDP serbestlenme hızını sağlamakta önemlidirler (43).

Cao ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, palmitollenmenin $G_{\alpha\alpha}$ proteinindeki konformasyon ve GTP-bağlama aktivitesine etkisi radyoaktif $GTP\gamma^{35}S$ ve BODIPY-FL- $GTP\gamma S$ floresans prop kullanılarak incelenmiştir. Araştırmacılar, palmitollenmenin $G_{\alpha\alpha}$ 'nın GTP bağlama aktivitesini etkileyerek, GTP/GDP değişimini düzenlediğini ve G protein aracılıklı sinyal ileti yolağındaki G proteininin açık-kapalı anahtar fonksiyonunu kolaylaştırdığını göstermişlerdir (44).

G_{β} altbirimi yapısal olarak N-ucundaki yaklaşık 20 amino asit içeren α -sarmal yapısındaki bir bölge ile yedi kez tekrar eden bir motiften oluşan pervane şeklindeki bir başka bölge olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 4.7). Yedi kez tekrarlanan dizi WD tekrarı olarak adlandırılır ve pek çok farklı hücrel süreçte rol alan WD40 ailesine üye proteinlerde görülür. WD tekrarının korunumlu iç bölgesi birbirine Gly-His (GH) ve Trp-Asp (WD) bağlarıyla bağlanan yaklaşık 40 aminoasitlik temel bölgeyi içermektedir (5). β altbirimini oluşturan yedi motifin her biri, β kanadı olarak adlandırılan 4 antiparalel zincirden oluşur. Kanatlar bir ucu dar, bir ucu geniş olan merkezi bir kanalı çevrelerler. Bir kanadın en dıştaki zinciri ile bir sonraki kanadın iç bölgesinde bulunan üç zincir bir WD dizi tekrarına karşılık gelmektedir. İlk WD zincirinin N-ucu, yedinci kanadın dış zincirini oluşturarak pervanenin başlangıcı ile sonunu birbirine bağlar. Kanatlar arasında hemen hemen tümüyle korunumlu olan beş aminoasit, dış zincirler ile iç bölgedeki üç zincir arası bağlantıda önemli konuma sahiptir (34).

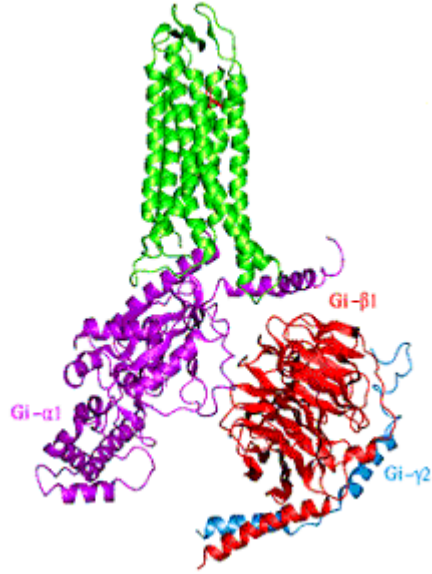


Şekil 4.7. $\beta\gamma$ kompleksi ve WD40 yapısını oluşturan polipeptit zincirlerinin şematik gösterimi. Şekil β -altbiriminin geniş ucundan α -altbiriminin yer aldığı dar uca doğrudur (34).

4.3.1. Reseptör- G Protein Etkileşiminin Yapısal Unsurları

Reseptörlerin G proteinleriyle nasıl etkileştiği ve aktivasyonunu katalizlediği hala açıklığa kavuşmamakla birlikte, reseptörün ikinci ve üçüncü halkasındaki dizilerin, G proteinleri seçicilik ve afinitesinde önemli olduğu bilinmektedir (45).

Reseptörün, G protein alfa altbirimiyle direkt olarak etkileşimi GDP'nin ayrışmasını kolaylaştırmaktadır. Reseptör, G_α 'nın amino ucuyla etkileşmekte, $\alpha/\beta\gamma$ yüzeyini bozmaktadır. G_α 'nın C ucunun sonlanma bölgesi (son beş kalıntı) reseptör-G protein etkileşmesinde önemlidir. Örneğin, boğmaca toksinle kalıntı 4'ün ADP ribozillenmesi, G_i/G_o proteinleri reseptör etkileşimini bozmaktadır. Reseptör-G protein etkileşmesini C uç bölgesinin etkili bir şekilde bloke ettiğini gösteren antikor çalışmaları vardır (Şekil 4.6). Bunun yanısıra bazı çalışmalarda C ucunda benzer kalıntılara sahip olan G proteinlerinin farklı reseptörlerle etkileştiği gösterilmiştir.



Şekil 4.6. G α i- α 2a-adrenerjik reseptör kompleks modeli: Modelleme rodopsin kristal yapısı, G protein trimeri, 1gp2'nin kristal yapısı ve fotoaktif rodopsin ile kompleks yapan transdusinin C uç parçasının NMR yapısı kullanılarak yapılmıştır (<http://mosberglab.phar.umich.edu/projects/proj7.php>).

α 2 ve α 4 sarmallarının içindeki bazı anahtar kalıntıların G protein-reseptör etkileşmesinde gerekli olduğu belirlenmiştir. α 4/ α 5 halkasındaki kalıntıların mutasyonu, özellikle α 4 sarmalının C ucundaki kalıntılarında meydana gelen mutasyon, bu kalıntıların G α altbirimlerinin reseptör aracılıklı aktivasyonunda önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Diğer yandan yapılan biyokimyasal çalışmaların bir kısmı reseptör etkileşimde G α altbiriminin N ucunun ilişkisinin olduğunu göstermektedir. (46). G β ve G γ altbirimlerinin bazı bölümlerinin de heterotrimerlerin reseptör etkileşim yüzeylerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (33).

4.3.2. Efektör- G Protein Etkileşiminin Yapısal Unsurları

Her G_{α} ailesi kendine özgün efektörleri aktive eder. $G_{\alpha s}$ ve adenilat siklazın katalitik bölgelerinin birlikte yapılan kristalleştirme çalışmalarında, $G_{\alpha s}$ 'in $\alpha 2$ heliksinde ve $\alpha 3$ - $\beta 5$ halkasında özgün etkileşim bölgeleri belirlenmiştir (47). Bunun dışında, $G_{\alpha s}$ 'in $\alpha 4$ - $\beta 6$ halkası da, adenilat siklaz aktivasyonunda rol oynamaktadır (48).

$G_{\alpha i}/G_{\alpha s}$ kimeraları kullanılarak, $G_{\alpha s}$ 'in karboksil ucundaki 235-256 arası bölgenin adenilat siklaz aktivasyon bölgesini içermekte olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu bölgelerin kalıntılarında meydana getirilen mutasyonların adenilat siklaz uyarılmasının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (49). $G_{\alpha i2}/G_{\alpha s}$ kimeralarıyla yapılan çalışmalarda efektör aktivasyonunda gerekli üç ayrı bölge gösterilmektedir: Kalıntı 236-240 ($G_{\alpha t}$ $\alpha 2$ - $\beta 4$), kalıntı 276-285 ($G_{\alpha t}$ $\alpha 3$ - $\beta 5$), kalıntı 349-356 ($G_{\alpha t}$ $\alpha 4$ - $\beta 6$) (50).

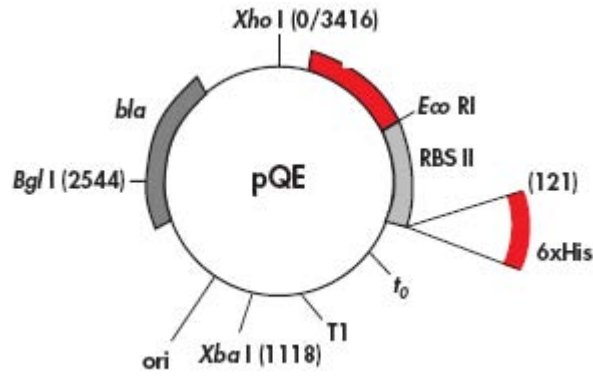
$G_{\alpha t/i}$ kimerasıyla ve RGS9 ile cGMP fosfodiesteraz düzenlenmesi için yapısal belirleyiciler X-ışın kristografisi analiziyle Slep ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (50). Bu çalışmada fosfodiesteraz γ altbirimiyle G_{α} etkileşiminin temel bölgelerinin anahtar II ve $\alpha 3$ bölgesi olduğu gösterilmiştir. Bunun dışında fosfodiesteraz γ altbiriminin, G_{α} $\alpha 4$ - $\beta 6$ halkasıyla da etkileşmekte olduğu gösterilmiştir (50).

4.4. G_{α} Protein Sentezinde Kullanılan Ekspresyon Sistemi

Rekombinant proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılması proteinlerin ayrıntılı karakterizasyonu ve üretimi için önemlidir. Yapı çalışmalarında çok miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim duyulmaktadır. Çeşitli ekspresyon sistemlerinin geliştirilip rekombinant protein üretiminde kullanılmasına rağmen, saf protein eldesinde sıkıntılar mevcuttur. Rekombinant DNA tekniklerinde ilginlik (afinite) etiketlerinin kullanılması protein afinite kromatografi yöntemlerini kullanarak rekombinant füzyon proteinlerinin saflaştırmasını kolaylaştırmaktadır.

“QIAexpress® System” rekombinant proteine 6 tane histidin rezidüsü ekler. Bu histidin etiketleri nikel-nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) ile etkileşmektedir.

QIAexpress® pQE vektörlerini kullanarak 6xHis-işaretli proteinlerin *E. Coli*'de yüksek seviyede ekspresyonu T5 promotör transkripsiyon–translasyon sistemine dayanmaktadır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. pQE vektör sistemi

QIAexpress Ekspresyon sistemi birçok protein yapı çalışması için yüksek seviyede protein ekspresyonu sağlamaktadır (51). Bu çalışmalar arasında,

- Fonksiyonel ve konformasyonel aktif proteinlerin saflaştırılması
- Antikor üretimi için doğal olmayan koşullarda saflaştırma
- Üç boyutlu yapının belirlenmesi için kristalleştirme

başlıcalarıdır.

4.4.1. pQE80 Vektör Sisteminin Özellikleri

Bu vektörler lac represörünü aşırı eksprese eden cis-lac^q genine sahiptirler. Lac represörü IPTG indüklemesi öncesi *lac* promotorundan protein ekspresyonunu baskılayarak toksik protein üretimini engellemektedir (Şekil 4.8).

pQE vektörleri ile *E.Coli*'den yüksek seviyede protein ekspresyonu eldesinin yanı sıra 6xHis etiketlerinin eklenmesi saflaştırmada avantajlar sağlamaktadır. Örneğin:

- 6xHis etiket ve Ni-NTA arasındaki yüksek seçicilik tek bir basamakta saf protein eldesine imkan tanımaktadır.
- Etkileşim konformasyondan bağımsızdır. Doğal koşullarda fonksiyonel protein eldesi mümkündür.
- Antikor üretimi için doğal olmayan koşullarda protein eldesi mümkündür.
- Histidine karşı antikorlar kullanarak etkili tarama gerçekleştirilebilir.

6xHis etiketi diğer afinite etiketlerinden çok daha küçüktür ve fizyolojik pH'da yüksüzdür. 6xHis etiketi proteinin yapı ve fonksiyonunu etkilemez, sekresyonda etkili değildir ve uzaklaştırılması için proteaz kesimi gerekli değildir (52).



Şekil 4.8. pQE80L vektör sistemi

4.5. G_{α} Proteininin Saflaştırılması

G proteinlerinin rekombinant olarak ekspresyonu ve saflaştırılması üzerine çalışmalar 1989 yılında Graziano ve arkadaşları ile başlamıştır. Çalışmalarında G_{sa} proteinini NpT7-5 vektörü kullanılarak klonlanmıştır. Ekspresyon 30°C'tan 42°C'ta yükseltilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma da sırasıyla DEAE-Sefasel, hidroksiapatit ve Mono Q kromatografileri kullanılmıştır. Saflaştırmanın en son aşamasında yüksek performanslı hidroksiapatit (HPHT) kullanılmıştır (53,54).

Linder ve Gilman, rekombinant $G_{i\alpha}$ ve $G_{o\alpha}$ proteinlerini *E.Coli*'den saflaştırmışlardır. Araştırmacılar ekspresyon vektörü olarak Graziano ve arkadaşlarının kullanmış olduğu NpT7-5 vektörünü kullanmışlardır. Saflaştırmada sırasıyla DEAE-

Sefasel, Heptilanin-Sefaroz, Mono Q, Hidroksiapatit, Fenil-Sefaroz kromotografi yöntemleri uygulanmıştır. 8 litre kültürden 2.1-3 mg $G_{11\alpha}$, 30 μ g-1 mg $G_{12\alpha}$, 200-800 μ g $G_{13\alpha}$, 20 litre kültürden 5 mg $G_{0\alpha}$, 6 mg $G_{11\alpha}$, 1 mg $G_{12\alpha}$, 200-800 μ g $G_{13\alpha}$ elde edilmiştir(10).

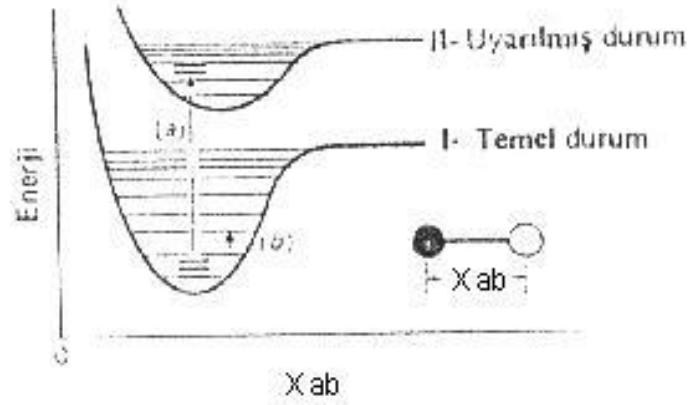
Lee ve arkadaşları rekombinant G-protein miktarını arttırmak için farklı bir ekspresyon sistemi kullanmışlardır. Klonlamada pQE-6 vektörü kullanılmıştır. Bu vektör BL21(DE3) hücrelerine aktarılmış ve 30 μ M IPTG ile indükleme yapılmıştır. Saflaştırmada sırasıyla DEAE-Sefasel, Fenil-Sefaroz, Q-Sefaroz, Hidroksiapatit, kromotografi yöntemleri uygulanmıştır. 10 litre kültürden 65 mg $G_{0\alpha}$, 400 mg $G_{11\alpha}$, 40 mg $G_{12\alpha}$ elde etmişlerdir (55). Bu çalışmada His etiketli Go proteini Ni^{+2} afinite kromotografi yöntemi kullanarak saflaştırılmıştır(55).

4.6. Spektroskopi

Spektroskopi, elektromanyetik dalgaların maddeyle etkileşiminin çalışılmasıdır. Elektromanyetik spektrum radyo izotopların bozunumu sırasında salınan yüksek enerjili δ -ışınları ve sırasıyla azalan enerjiye sahip, x-ışınları, mor ötesi ışınlar, görünür ışınlar, kızılötesi ışınlar, mikrodalgalar ve radyo dalgaları gibi elektromanyetik dalgalardan oluşur. Elektromanyetik ışınlar dalga özelliklerinin yanı sıra tanecik özellikleri de gösterirler.

Maddedeki her konum veya davranış (elektronların yer aldığı yörüngeler, atomlar arası titreşim ve dönme hareketleri) belirli enerji seviyelerinde gerçekleşirler. Diğer bir deyişle, maddenin dalga mekaniğine dayalı özelliklerine bağlı olarak atomlar basamaklı ya da kesikli enerji değerleri içerirler. Atomlar yalnızca belirli enerji düzeylerinde bulunabildiklerinden, ışının soğurulabilmesi basamak arasındaki enerji farklarına karşılık gelen dalga boylarında olanaklıdır (Şekil 4.9).

Işının atomlar tarafından soğurulması ya da salınımı belirli enerji paketleri üzerinden gerçekleşir. Moleküllerde uyarılma sonrası ışığın geri saçılmasına *floresans* etkisi denir.



Şekil 4.9. Basit bir diatomik molekülde enerji düzeyleri (kalın çizgiler elektronik enerji düzeylerini; ince düz çizgiler titreşim enerji düzeylerini; ince kısa çizgiler dönme enerji düzeylerini göstermektedir) (56).

Işın, enerjisini içinden geçtiği maddede çarpıştığı atomlara aktarır. Uyarılma sonucu elektron veya atomun titreşim dönme hareketleri, bir üst enerji basamaklarına geçebilir. Basamaklar dışındaki bir ara enerji düzeyine geçiş olanaklı değildir. Işını soğurmadan önceki enerji düzeyi E1, soğurma sonrası enerji düzeyi E2 olarak gösterilirse;

$$E2 - E1 = h \cdot \nu \quad \text{olur.}$$

$$h \cdot \nu = \text{soğurulma enerjisi}$$

Spektroskopi kullanılan dalga boyları ve dolayısıyla uyarının gerçekleştiği enerji düzeyi farklılıklarına göre çeşitli tiplere ayrılmıştır (56,57).

4.6.1. Moleküler Spektroskopi

Moleküllerin 3 temel optiksel spektrumu vardır;

1 – Elektronik Spektrum:

Bu tür geçişler, bir temel elektronik durumun üst elektronik enerji seviyesine geçiştir.

2 – Titreşim Spektrumu:

Bu tür geçişler bir titreşim seviyesinin, aynı elektronik durumdaki diğer titreşim seviyesine geçiştir.

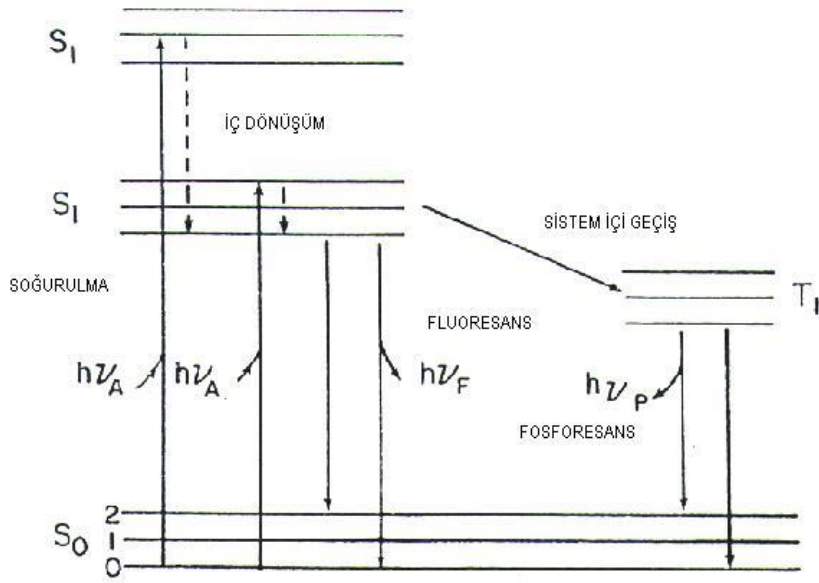
3 – Dönme Spektrumu:

Aynı elektronik durumun, aynı titreşim durumunda dönme seviyeleri arasındaki geçiştir.

Molekülün elektronik taban enerji değeri, molekülün elektron konfigürasyonu ve yörünge düzeni tarafından belirlenir ve molekülün elektronik durumu olarak tanımlanır.

Işığın soğurulmasının ve yayılımının gösterildiği enerji seviyeleri diyagramına “Jablonski Diyagramı” denilmektedir. Temel, birinci ve ikinci elektronik durumları sırasıyla; S_0 , S_1 ve S_2 ile gösterilir (Şekil 4.10) (58).

Çeşitli elektronik seviyeleri arasındaki geçişler dikey geçişlerdir. Bu gösterim, ışığın soğurulmasının anlık durumunu göstermek için kullanılır.



Şekil 4.10. Jablonski diyagramı (58).

4.6.2. Floresans

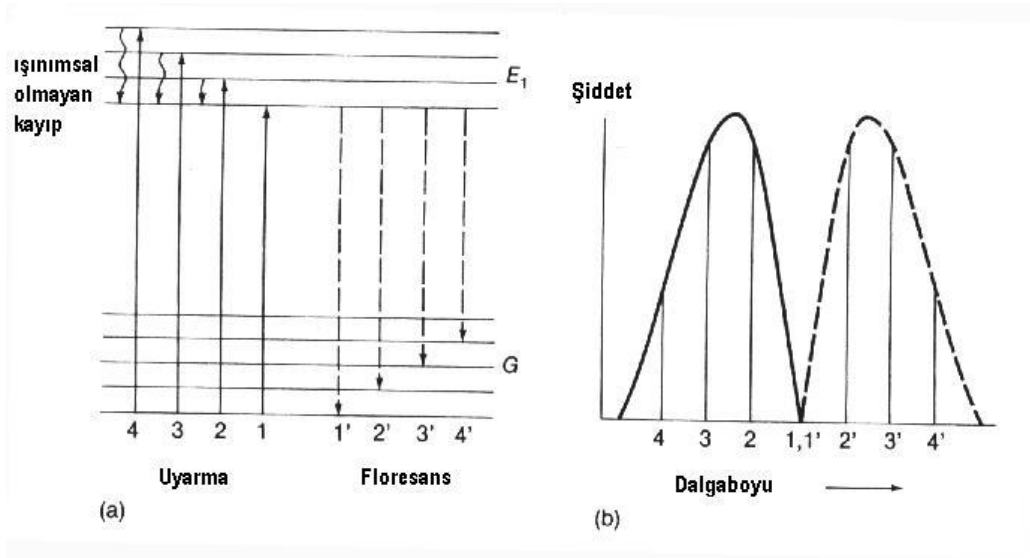
Soğurulan ışın tarafından uyarılan molekül, uyarılmış enerji seviyesine geçer. Molekül buradan çok kısa bir zaman içerisinde uyarılma enerjisini geri vererek düşük enerji seviyesine geri döner. Temel enerji seviyesinin geri dönüşüm mekanizması hem molekül seviyelerine hem de molekülün içinde bulunduğu ortama bağlıdır (59).

Uyarılmış molekül ortamdaki başka bir molekülle çarpışması sonucunda enerjisini diğer moleküle kinetik ve titreşim enerjisi olarak aktarır. Sonuçta, yüksek titreşim seviyesine uyarılmış molekül hızlı bir şekilde düşük titreşim seviyesine geri döner. Temel durumun yüksek titreşim enerji seviyeleri, uyarılmış durumun en düşük titreşim enerji seviyesine yakın olduğu durumda zayıf çarpışmalarla temel enerji durumuna dönüş gerçekleşir. Bir diğer yol da, kuvvetli çarpışmalarla uyarılmış enerji durumundaki (S_1) en düşük titreşim seviyesinden temel enerji seviyesine (S_0) iniştir. Böylesi çarpışmaların yokluğunda molekül bir foton salar. Uyarılma durumunda salınan bu fotona floresans denir.

Floresans fotonlarının enerji aralığı, soğurulan fotonların enerji aralığından daha azdır. Floresans ömür, molekülün uyarılma durumundan temel duruma dönerken geçen ortalama zamanıdır.

Salınan foton uyarılma durumunun en düşük enerji seviyesinden, temel durumun titreşim enerji seviyelerine doğru sadece bir enerji bantı verir. Bu durumda, floresans bantın dalga boyu, soğurulan bantın dalga boyundan daha uzundur. Genelde, floresans yayılım spektrumu ve soğurulma spektrumu ayna görüntü simetrisine sahiptirler. Bu simetrik durum; soğurulma ve yayılımda aynı geçişler gerçekleşmesinden ve titreşim enerji seviyeleri arasındaki benzerlikten kaynaklanmaktadır.

Floresans dalga boyu, soğurulma dalga boyundan bağımsızdır. Bu bağlamda, soğurulma ve floresans spektrumları genellikle üst üste gelmez. Ancak çözelti içindeki moleküllerin çevre molekülleri ile etkileşimleri sonucu titreşim enerji seviyeleri değişebilir ve emilim ve yayılım bantları kısmen çakışabilirler (Şekil 4.11) (60).



Şekil 4.11. Enerji seviyeleri çizgesi (60).

Soğurulma spektrumu birçok enerji bantı içerir ve bu bantlar genelde üst üste gelerek geniş bir bant meydana getirirler. Bu nedenle soğurulma spektrumu floresans spektrumundan daha geniştir.

Bir floreforun floresans şiddeti (yoğunluğu), uyarılmış halde çarpıştığı moleküllerin uyarım enerjisini ne oranda soğurduklarına bağlıdır. Bu moleküller uyarılma enerjisini soğurarak floresans yayılım olasılığını azaltır ve böylece floresans şiddetini azaltmış olur. Floresans şiddetini azaltan bu moleküllere floresans söndürücü'leri denilmektedir. Titreşim seviyeleri aralıkları geniş olan moleküller örneğin su etkin floresans söndürücüleridirler.

$$\text{Foton Verimi} = \frac{\text{Yayılan Foton Sayısı}}{\text{Soğurulan Foton Sayısı}}$$

Floresans şiddeti, floresans foton verimi ile açıklanmaktadır. Floresans foton verimi; yayılan fotonların sayısının, soğurulan fotonların sayısına oranıdır (60).

4.6.3. Floresans Yayılım Grafiği

Floresans yayılım bilgileri floforun kimyasal yapısı ve içinde bulunduğu çözücü ortama bağlı olarak değişiklik gösteren yayılım spektrum aracılığı ile elde edilir. Floresans yayılım spektrumu, floresans ışık şiddetinin dalgaboyu ya da dalga sayısına göre değişimidir.

4.6.4. Protein Floresansı

Proteinler yapılarında bulunan ve ultraviyole ışığı soğuran 3 aromatik aminoasit aracılığı ile lümenisans tekniklerle incelemektedir. Doğal flofor olarak adlandırılan amino asitler:

Triptofan (Trp)

Tirozin (Tyr)

Fenilalanin (Phe)

Bu aminoasitler aromatik amino asitlerdir.

Aromatik amino asitlerin ışığı en çok soğurma ve floresans yayılım tepe dalgaboyları Tablo 4.3’de verilmiştir (61).

Tablo 4.3. Triptofan,Tirozin, Fenilalaninin Soğurum ve Floresans Dalgaboyu Değerleri

Aromatik Amino asit	Işığı en soğurduğu dalga boyu (nm)	Işığı maksimum yaydığı dalga boyu (nm)
Triptofan	280	348
Tirozin	270	303
Fenil Alanin	260	282

G protein aracılı sinyal ileti çalışmalarının çoğunda doğal davranış gösteren ve analizi hassas bir şekilde yapılabilen guanin nükleotid analogları kullanılmaktadır. En çok kullanılan analoglar radyoaktif olarak işaretlenmiş izotoplardır. Bunlar [$\gamma^{32}\text{P}$] GTP veya [$\gamma^{35}\text{S}$] GTP γS 'dir. Bu analoglarla GTPaz aktivitesi ve nükleotid bağlanma analizleri filtre-bağlanma yöntemleriyle yapılmaktadır. Son yıllarda ise, G protein aktivasyonunda, floresans guanin nükleotid türevleri olan N-methyl-3'-O-anthranoyl (MANT) ve BODIPY kullanılmaktadır. Bu floresan analogların, GTP aktivite tayininde daha önce kullanılan içsel floresans değişikliklerine göre daha hassas olduğu saptanmıştır (62).

Bu problemlerle heterotrimerik G protein etkileşimleri ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. İlk çalışmalarda G_i/o_α altbirimlerinin aktivitesi, MANT nükleotid değişim kinetiğiyle saptanmıştır. Ancak MANT probunun bazı heterotrimerik G proteinlerine afinitesinin düşük olduğu ve beklenmeyen bir şekilde adenilat siklaz inhibitörleriyle yarış yaptığı belirlenmiştir. Bu durum ise bu probun, *in vitro* ve G protein-efektör etkileşim çalışmalarında kullanılmasını sınırlandırmıştır. Bu nedenle MANT probunun yerine BODIPY floresan nükleotid analogları kullanılmaya başlanmıştır. BODIPY problemleri adenilat siklaz inhibisyonuna etkisizdir ve G_α altbirimlerine bağlandıklarında MANT probuna göre daha yüksek bir floresans artış göstermektedir. Bu problemlerin ayrışma sabitleri nanomolar seviyededir ve görünen bölge içerisinde uyarılabilmektedirler. Bütün bu avantajlar, bu probun nükleotid değişim çalışmalarında ve guanin nükleotid ayrışma inhibitörleriyle heterotrimer etkileşim belirlenmesinde tercih edilmesini sağlamaktadır (62).

Önceki çalışmalarda BODIPY FL-GTP'nin G_{α} ile hidrolizi belirlenmesine karşın bununla ilgili kinetik çalışmalar yapılmamıştır. Bundan dolayı da bu probun, G_α aktivite çalışmalarında GTP'yi taklit etmesinin etkili bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği bilinmemektedir. Jameson ve arkadaşları, BODIPY FL-GTP ve BODIPY FL-GTP γ S analoglarıyla $G_{\alpha 1}$ ve $G_{\alpha 0}$ proteinlerinin GTPaz aktivitesini çalışmışlardır. Enzimatik reaksiyon boyunca gerçekleşen dinamik değişiklikleri belirlemek için örnekler hızlıca kapiller elektroforezle ayrılmış ve lazer etkili (CE-LIF) floresans ile analiz edilmişlerdir. Yapılan çalışmalar bu problemlerin GTPaz aktivitesini çalışmada substrat olarak kullanabileceğini göstermektedir (62).

Higashijima ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, GTP γ S'in G_i veya G_o proteinlerine bağlandığında bu proteinlerde konformasyonel değişikliğe yol açtığı ve proteinlerin içsel floresansında artışa neden olduğu gösterilmiştir (63). GTP γ S'in ardından eklenen Mg^{+2} proteinde hızlı bir konformasyonel değişikliğe yol açmakta ve floresans şiddetinde büyük bir artışa neden olmaktadır. Bu grubun yaptıkları diğer bir çalışmada, GTP'nin de proteinin içsel floresansında büyük bir değişikliğe yol açtığı saptanmıştır. GTP, floresansta gittikçe artan bir floresans şiddetine neden olmaktadır. 5 dakika geçtikten sonra durağan duruma ulaşılmaktadır (64).

GTP γ S ve GTP'nin protein içsel floresans şiddetinde neden olduğu bu benzer değişiklik her iki nükleotidin de benzer konformasyonel değişikliklere yol açtığı bir göstergesidir.

GDP içeren G_{oa}'ya GTP eklendiğinde, triptofan floresansında yavaş bir artış gözlemlenirken, GDP ile GTP yer değiştirdikten sonra, Mg⁺² eklenmesinin floresans şiddetinde hızlı bir artışa neden olduğu saptanmıştır (65).

4.6.5. Spektrofotometre

Spektrofotometre, küvetin içindeki bir çözeltilerden geçen ışığın ölçülmesinde kullanılan bir alettir. İletilen ışık, küvetin içindeki ışığı soğuran maddenin derişimini belirlemek için matematiksel hesaplamalarla emilme birimlerine dönüştürülür. Bütün spektrofotometreler temelde aynı parçalara sahiptirler (Şekil 4.12).

Bu parçalar;

1 – Işık Kaynağı:

Işık kaynağı araştırılan bileşik tarafından soğurulan radyant enerji sunmaktadır. İyi bir ışık kaynağı için şu koşullar gereklidir.

- Yeterli güçte bir ışık demeti üretmelidir.
- Çalışılan spektrum bölgesinin üzerinde sürekli dalga boyları sağlamalıdır.
- Sabit olmalıdır.

2 - Monokromatörler:

Gerekli dalga boylarının seçilmesi için kullanılmaktadır. Monokromatörler ile giriş ve çıkış yarıklarının kombinasyonu sağlanmaktadır. Monokromatörün giriş yarığı, monokromatöre giden istenmeyen ışıkları engellenmesinde kullanılırken, çıkış yarığı sadece küvetten geçen dar ışık demetine izin vermektedir.

3 - Küvet:

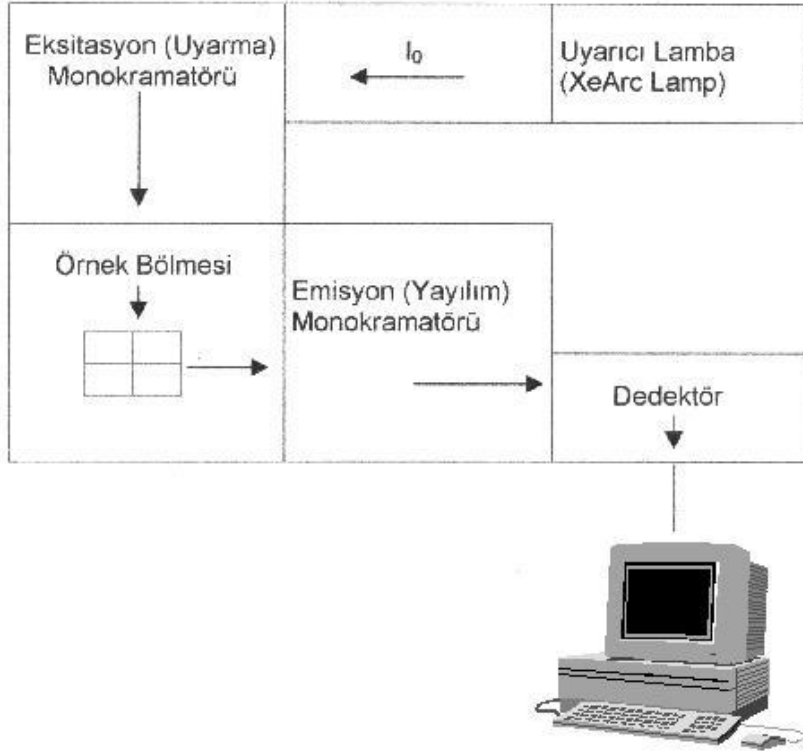
Küvetin içine emilimi ölçülmek istenen çözelti konulmaktadır. Küvet camdan, kuvarsttan veya plastikten yapılabilmektedir.

4 - Dedektör:

Dedektör, çözelti içinde iletilen elektromanyetik radyasyonu, elektriksel sinyale dönüştürmektedir. Elektromanyetik radyasyonun şiddeti ne kadar artarsa, elektriksel sinyal de o kadar artmaktadır.

5 – Okuyucu Alet :

Dedektörden gelen elektriksel akımın büyüklüğü, dijital bir göstergede kaydedilmektedir. Sonuçlar genelde iletici birimlerde, soğurulma birimlerinde bazen de direkt derişim birimlerinde olmaktadır (66).



Şekil 4.12. Floresans spektrometrenin sistem bileşenleri.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kimyasal Maddeler

Agar	Sigma
Agaroz	Sigma
Akrilamit	Bio-Rad
Amonyum persülfat	Sigma
Ampisilin	Mustafa Nevzat
Asetik asit	Merck
Bakır-EDTA	Sigma
Bisakrilamit	Sigma
Bromokloroindol fosfat (BCIP)	Promega
“Coomassie” parlak mavisi	Sigma
Ditiyotiretiol (DTT)	Sigma
Etanol	Merck
Etidyum bromür	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)	Sigma
Folin & ciocalteau fenol çözeltisi	Sigma
Glisin	Sigma
Gliserol	Sigma
Guanozin difosfat	Sigma
Guanozin 5'-trifosfat	Sigma
Guanozin 5'-O-(3-trifosfat)	Sigma
Hepes	Sigma
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)	Roche
İzoamilalkol	Merck
İzopropanol	Merck

Kalsiyum klorür	Sigma
Magnezyum klorür	Sigma
Maya Özütü	Merck
β -Merkaptoetanol	Sigma
Metanol	Merck
N, N, N', N',-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma
Nitroblutetrazolyum (NBT)	Promega
Nonidet-P40	Sigma
Ponso-S	Sigma
Potasyum klorür	Merck
Potasyum hidrojen fosfat	Merck
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma
Sodyum asetat	Sigma
Sodyum azid	Sigma
Sodyum bikarbonat	Sigma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum hidrojen fosfat	Merck
Sodyum klorür	Merck
Tris	Sigma
Tripton	Merck
Tween-20	Sigma

5.1.2. Sığır Go α Kalıbı

pT7/Nde1/ G α kalıbı Dr. Joel Moss tarafından sağlanmıştır (National Institutes of Health) (67).

5.1.3. Primerler

RCH: geri (anti-sense)

5' GAC CCG AAG CTT CTA GTA CAA GCC 3'

RNS: ileri (sense)

5' GCA TGC GAG CTC ATC GGA TGT ACT 3'

5.1.4. Western Emdirimi Gereçleri

Nitroselüloz membran (0.45 µM)

Schleicher&Schuell

Protein molekül ağırlığı standartları

MBI-Fermentas

Önceden boyanmış Protein Standartları

MBI-Fermentas

Bio-Rad mini jel elektroforez düzeneği (dikey) ve elektroforetik aktarma düzeneği.

5.1.5. Antikorlar

Anti-G Protein Goα fare monoklonal antikoru

Chemicon

Alkalem fosfat az eşlenik keçi anti-fare IgG

Chemicon

5.1.6. Radyoaktif Maddeler

[³⁵S] GTPγS (Amersham), 1000 Ci/mmol, 100 µCi/100µl.

5.1.7. Klonlama İçin Kullanılan Kitler

Qiagen Mini Prep plazmid izolasyon kiti

Wizart PCR Preps DNA saflaştırma sistemi

Nucleospin Extract temizleme kiti (Macherey-Nagel)

5.1.8. Cihazlar

Çalkalayıcı	IKA
Çalkalayıcı inkübatör	Barnstead Labline
Derin Dondurucu (-70 °C)	So-low
Derin Dondurucu (-20 °C)	Siemens
Floresans Spektrofotometre	Photon Technology International
Güç kaynağı	Dan-Kar Corp.
Hassas Terazı	Oertling
Karbondioksit inkübatörü	Forma Scientific
Laminer akım kabini (Steril Kabin)	Kutay
pH metre	WTW
Santrifüj	Hettich ve Eppendorf
Spektrofotometre	LKB Biochrom
Su banyosu	Assistent WTE
Isı döngü cihazı	MJ Research

5.1.9. Tampon ve Çözeltilerin Bileşimi

5.1.9.1. Hücre Kültür ve Ekspresyonu Sırasında Kullanılan Çözeltiler

Luria-Bertani besi ortamı

%1 w/v Tripton

%0.5 w/v Maya özütü

%1 w/v NaCl, pH:7.2

Zenginleştirilmiş Luria-Bertani besi ortamı

%2 Tripton

%1 Maya özütü

%0.5 NaCl

%0.2 Gliserol

50 mM KH₂PO₄, pH:7.2

5.1.9.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözelti

Bakır EDTA çözeltisi

% 4 (w/v) oranında 0.1 N sodyum hidroksit içinde çözülmüş sodyum karbonat ve 250 mg bakır-disodyum EDTA, 200 ml 0.1 N sodyum hidroksit içinde çözülerek karıştırıldı ve karışım 1 lt'ye tamamlandı (68).

5.1.9.3. Saflaştırma İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Hücre Patlatma(lizat) tamponu

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

20 mM β-Met , 0.1 mM PMSF

10 mg/ml Lizozim

1 M MgCl₂

20 U/ml DNaz

1 tablet Proteaz inhibitör kokteyli

Ni-NTA Kolon Dengeleme Tamponu

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

20 mM β-Met

0.1 mM PMSF

100 mM NaCl

Yıkama Tamponu

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

20 mM β -Met

0.1 mM PMSF

100 mM NaCl

10 mM İmidazol

Toplama Tamponu

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

20 mM β -Met

150mM İmidazol

%10 Gliserol

Sephadex G-100 Kolon Dengeleme Tamponu (TK tamponu)

50 mM Tris-HCl pH: 7,4

100 mM KCl

**5.1.9.4. Elektforez ve Western Emdirimi Analizlerinde Kullanılan
Çözeltiler****Örnek tamponu (4X)**

0.25 M Tris-HCl pH 6.8

% 40 (v/v) Gliserol

% 5 (w/v) Sodyum dodesilsülfat (SDS)

% 0.01 (w/v) bromfenol mavisi

Akrilamit-Bis akrilamit özeltisi

(% 30) 29.2 gr Akrilamit

0.8 gr N, N-metilen bis akrilamit

Reaksiyon hacmi: 100 ml

Elektroforez Tamponu

6 gr Tris

30 gr Glisin

1 gr (% 20) SDS

Reaksiyon hacmi: 1000 ml

Aktarma Tamponu, pH 8.5

25 mM Tris, pH:8.3

192 mM Glisin

% 20 Metanol

Tris Tuz Tamponu (TBS), pH 8.0

136.75 mM NaCl

2.68 mM KCl

21.26 mM Tris

Blok tamponu

%1 BSA

% 0.05 Tween-20

TBST Tamponu

136.75 mM NaCl

2.68 mM KCl

21.26 mM Tris

% 0.05 Tween-20

Jel Boyama Çözeltisi

% 0.2 (w/v) "Coomassie" mavisi

% 50 (v/v) Metanol

% 10 Asetik asit.

Jel Boya Çıkarma Çözeltisi:

% 25 (v/v) İzopropil alkol

% 10 (v/v) Asetik asit

Geliştirici (Developer) Tampon:

100 mM Tris-HCl, pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

Ponso- S Boyama Çözeltisi:

% 0.1 (w/v) Ponso-S

% 5 Asetik asit

Birincil Antikor Tampon:

Go α monoklonal antikor (TBS ile 1:4500 seyreltilmiş)

%5 BSA

İkincil Antikor Tampon

Alkalen konjuge keçi anti-fare IgG (TBS ile 1:5000 seyreltilmiş)

% 0.05 Tween 20.

NBT/BCIP Geliştirici Tampon

100 mM Tris, pH:9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

66 μ l NBT (50 mg/ml)

33 μ l BCIP (50 mg/ml).

SDS-PAGE Ayırma Jeli (% 12)

Damıtık su	8.7 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	5 ml
% 20 (w/v) SDS	0.1 ml
30:0.8 Akrilamit/Bisakrilamit	6 ml
% 10 (w/v) Amonyum persülfat	0.2 ml
TEMED	0.008 ml

SDS-PAGE Yükleme Jeli (% 5)

Damıtık su	4.41 ml
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	0.75 ml
% 20 (w/v) SDS	0.03 ml
30:0.8 Akrilamit/Bisakrilamit	0.75 ml
% 10 (w/v) Amonyum persülfat	0.06 ml
TEMED	6 µl

5.1.9.5. Floresans Spektroskopisi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**Tampon A**

50 mM Sodyum-Hepes pH: 8.0

1 mM Sodyum EDTA

1 mM DTT

%0.1(v/v) Lubrol.

Tampon HEM

10 mM Sodyum-Hepes pH: 8.0

1 mM Sodyum EDTA

10 mM MgCl₂.

5.1.9.6. [³⁵S] GTP γ S Bağlama Testinde Kullanılan özeltiler

Örnek Seyreltme Tamponu

20 mM Na-Hepes, pH:8.0

1 mM EDTA

1 mM DTT

% 0.1 (v/v) Lubrol

50 μ M GDP

GTP γ S – Bağlama Karışımı

50 mM Na-Hepes, pH:8.0

60 mM MgCl₂

2 mM EDTA

200mM NaCl

2 mM DTT

2 μ M GTP γ S

[³⁵ S] GTP γ S, 300.000 sayım.dak⁻¹

Filtre Yıkama özeltisi

20mM Tris-HCl, pH:8.0

100 mM NaCl

25mM MgCl₂

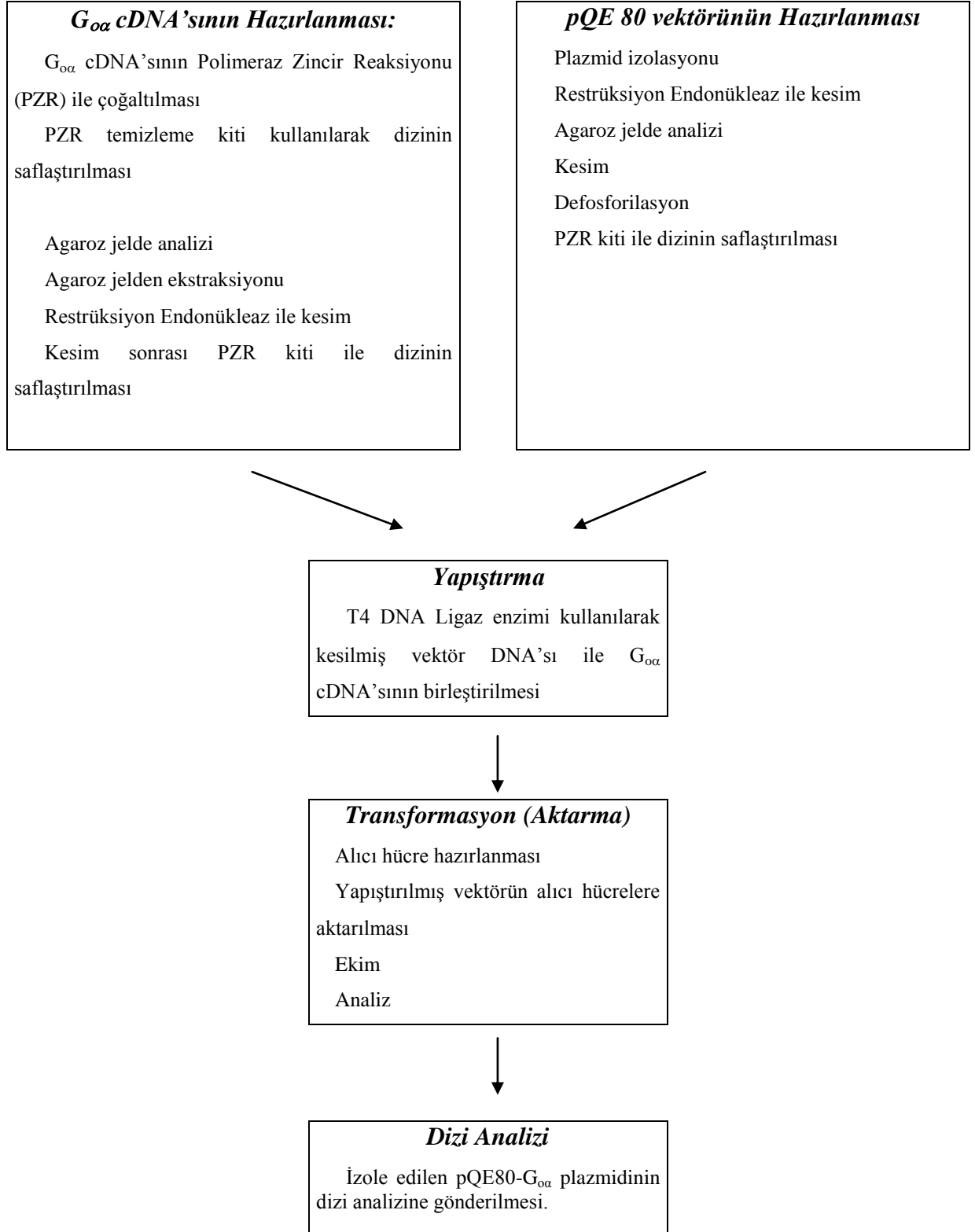
Sintilasyon Sayacı Sayım Sıvısı

100 ml Toluol

% 0.4 PPO

5.2. Yöntem

5.2.1. Alt-Klonlama



5.2.1.1. DNA Kalıbının Hazırlanması

Çalışılan vektör sisteminde “insert” elde etmek için pT7/Nde1/ G_{oα} kalıbı (67) ve RNS-RCH primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı. PZR koşulları düzenlenerek en uygun PZR protokolü belirlendi.

DNA Kalıbı: 2 µl (100 ng)

dNTP: 5 µl (2 mM)

RNS primer: 1 µl (10 pmol)

RCH primer: 1 µl (10 pmol)

10x Tampon: 5 µl

DMSO: 5 µl

dH₂O: 30.75 µl

High Fidelity Enzim: 0.5 µl

Toplam Hacim: 50 µl

PCR Programı:

94 °C → 4 dakika

94 °C → 1 dakika

67 °C → 1 dakika

72 °C → 2 dakika

72 °C → 5 dakika

30 döngü

Negatif kontrol olarak DNA kalıbı içermeyen bir PZR yapıldı. %1'lik agarozdan oluşan gelde 150 V'la yürütülerek gözlemlendi. Sonrasında PZR örnekleri %1'lik agarozdan oluşan Preparatif jelde 150 V'ta 45 dakika yürütüldü. PZR örneği (1062 bç) bu preparatif jelden ekstrakte edildi. Wizard PCR Preps DNA purification system kiti kullanılarak elde edilen bölge, enzim kesiminde kullanılmak üzere hazırlandı. HindIII, SacI enzimleri ile gece boyu enzim kesimi gerçekleştirildi. Enzim kesimi oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Kalıp

40 µl Kalıp DNA (Gelden ekstrakte edilip temizlenen)

2 µl SacI(1200 unit)

2 µl HindIII (5000 unit)

20 µl 10x Tampon

36 µl dH₂O

RH: 100 µl

Enzim kesim ürünleri, PZR temizleme kiti kullanılarak temizlendi.

5.2.1.2. pQE 80 Vektörünün Hazırlanması

pQE80 plazmidi Top10 hücrelerine transforme edilerek saklanmaktadır. Bu hücrelerdeki pQE80 plazmidi Qiagen Mini Prep kiti kullanılarak izole edildi. Elde edilen plazmid kalıp bölge ile yapıştırılmak üzere hazırlandı. Bunun için iki saat boyunca SacI ve HindIII enzimleri ile kesimi gerçekleştirildi.

Plazmid

20 µl Plazmid DNA

2 µl Sac

2 µl HindIII

10 µl 10x Tampon

16 µl dH₂O

RH: 50 µl

Elde edilen 10 µl kesilmiş plazmid DNA, 5 µl 10x tampon içerisinde 5 µl sığır barsağı alkalin fosfatase kiti kullanılarak 37°C'ta 50 µl reaksiyon hacminde defosforile edildi.

Tepkime 85°C'ta, 15 dakika inkübe edilerek durduruldu. Defosforile edilen plazmid Nucleospin Extract kit (Macherey-Nagel) kullanılarak temizlendi.

5.2.1.3. Yapıştırma

Defosforile edilmiş plazmid ile G_α cDNA'sı T4 DNA Ligaz enzimi (200 unit) kullanılarak yapıştırıldı (MBI Fermentas).

5.2.1.4. Transformasyon (Aktarma)

Aktarma “CaCl₂ aktarma protokolü” kullanılarak yapıldı. Aktarma iki aşamada gerçekleştirildi. Öncelikle plazmidin aktarılacağı Top10 alıcı hücreleri hazırlandı. Bu amaçla hücreler 10 ml’lik gece boyu kültürde büyütüldü. Ertesi gün 40 ml taze besi ortamına gece boyu kültürden 1 ml eklendi ve büyümeye bırakıldı. OD₆₀₀=0.12-0.2’ye ulaştığında kültür buza konuldu. Santrifüjde 3500xg’de 15 dak., 4°C’te çevrildi. Üst sıvı atılarak, çökelek toplam 5 ml soğuk 50 mM CaCl₂’de çözüldü. Buzda 1-1.5 saat bekletildikten sonra 4000 dev./dak., 10 dak., 4°C’te çevrildi. Çökelek, üzerine tekrar 5 ml CaCl₂ eklenerek çözüldü ve kullanmadan önce buzda en az 2, en çok 24 saat bekletildi.

Daha önce izole edilmiş G_{oα} cDNA’sını taşıyan plazmidin 25 µl’sine 150 µl alıcı hücre eklenerek 45 dak. buzda bekletildi. Karışım 42°C’te, 2 dak. tutularak membranın ısı şokuyla alıcı duruma gelmesi sağlandı. Buzda 5 dak. bekletme sonrası karışıma 1 ml, önceden 37°C’a getirilmiş, antibiyotiksiz besi ortamı eklenerek, hücrelerin 37°C’te 1 saat çalkalanarak büyümesi ve antibiyotik direncini yeniden kazanmaları sağlandı. Kültürler steril eppendorfa aktarılarak 3000xg’de 5 dak. çevrildi. Çökelekler 40 µl antibiyotiksiz ortam ile çözüldükten sonra antibiyotik içeren katı LB ortamına 10-30 µl halinde ekim yapıldı ve 37°C’te gece boyu bırakıldı.

Bu yöntemle µg plazmid DNA başına 5x10 arası transforme koloni elde edilebilir. Bu ise oldukça yüksek bir verimdir. Alıcı hücreler hazırlandıktan sonraki 12-24 saat içerisinde normalin 4 ya da 6 katı transformasyon etkinliğine sahiptirler.

Gece boyu 37°C’te inkübasyonun ardından koloni taraması yapıldı. Koloni taraması PCR kontrolü ile gerçekleştirildi. G_{oα} cDNA’sı bulunan kolonilerden kültür yapıp gliserol stok hazırlandı. Top10 hücrelerinde G_{oα} cDNA’sını taşıyan plazmid izole edilerek kontrol amacıyla dizi analizine gönderildi.

5.2.2. Kültür ve Ekspresyon

Dizi analizi sonucu G_{α} cDNA'sının pQE80 vektor sistemine klonlanmış olduğunun belirlenmesini takiben ekspresyon çalışmalarına başlandı.

Ekspresyon deneyleri için pQE80- G_{α} stoklarından 50 $\mu\text{g/ml}$ ampisilin içeren Luria-Bertani (LB)-Agar petri kaplarına ekim yapıldı ve gece boyu 37°C'ta inkübe edildi. Ertesi gün bu platelerden tek bir koloni alınarak 50 $\mu\text{g/ml}$ ampisilin içeren LB ortamında gece boyu büyütülerek bir n kültür hazırlandı. Bu kültürden 1:100 seyreltilen kültürler 37 °C'ta büyümeye bırakıldı ve 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğu 0.6 olduğunda farklı sıcaklıklarda (37 °C, 30 °C, 25 °C), farklı IPTG derişimleri ile (1 mM, 0.1 mM) indükleme yapıldı. Ekspresyon deneyleri sonucunda çözünür protein eldesi için en uygun koşul belirlenerek ekspresyon deneylerine bu koşullarda devam edildi.

5.2.3. Protein Miktar Tayini

Protein miktarları standart olarak sığır serum albumin'in (BSA) kullanıldığı *Lowry* yöntemi ile belirlendi.

5.2.4. Elektroforez

%1.25 2-merkaptoetanol ilave edilmiş örnek tamponu ile karıştırılan protein örnekleri (12-50 μg) kaynayan su içinde 5 dk denatüre edildi. Örnekler ve protein standardı (MBI-Fermentas) mini-jel elektroforez düzeneğinde hazırlanan SDS-PAGE (% 5 yükleme jeli, % 12'lik ayırma jeli) jeline yüklenerek elektroforez çözeltisi içinde, 150 volt'da yürütüldü.

5.2.5. Islak Elektroforetik Transfer Düzenegi ile Elektroforetik Transfer

11x8 cm boyutlarında dört tane filtre ve jelin büyüklüğüne uygun olarak nitroselüloz membran kesildi. Elektroforezden sonra jeller çıkarılarak üst jel kesildi. Jel ve nitroselüloz membran 15 dk, filtre kağıtları ve süngerler de 5 dk aktarma tamponu içinde bekletildi. Jel kasetindeki gri panelin (katot) üzerine sırasıyla sünger, 3MM filtre kağıdı, jel, nitroselüloz membran, 3MM filtre kağıdı ve sünger konularak kaset dikkatlice kapatıldı. Kaset aktarma tankına yerleştirilerek arkasına buz kalıbı konuldu ve tank, kasetin tümünü içine alacak şekilde aktarma tamponu ile dolduruldu. Transfer tankı içine manyetik balık konularak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildikten sonra, tank güç kaynağına bağlandı ve 180 mA'de 1.5 saat süresince aktarma yapıldı.

Aktarmanın gerçekleşip gerçekleşmediği anlamak için membranlar Ponso-S boyama çözeltisi ile boyanarak protein bantları gözlemlendikten sonra TBST tamponu ile yıkanarak, Western emdirimi analizine geçildi. Ayrıca jeller sırasıyla boyama çözeltisi (Coomassie Mavisi) ve boya çıkarma çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde 45 dk oda sıcaklığında ve % 10 asetik asit ile 1-1.5 saat, % 5 asetik asitte gece boyu yıkanarak da transferin ne kadar gerçekleştiği gözlemlendi.

5.2.6. Western Emdirimi Analizi

Özgün olmayan bağlamayı engellemek için membranlar %1 BSA ve %0.05 Tween 20 içeren TBST blok tamponunda gece boyu +4 C°'ta inkübe edildi

G_{oα} proteini Chemicon marka G_{oα} fare monoklonal antikoru ile 3 saat etkileştirildi. Sonrasında 3 kez 10'ar dakika TBST tamponuyla yıkama yapıldı. Daha sonra alkalen fosfataz eşlenik keçi anti-fare IgG ile 2 saat etkileştirildi. Renklenme reaksiyonu öncesi 3 kez 10'ar dakika TBST tamponuyla yıkama yapıldı. Renklenme reaksiyonu BCIP/NBT renk geliştirici tampon ile gerçekleştirildi.

5.2.7. Protein Saflaştırma İşlemi

Her aşamadan elde edilen kesimler SDS-PAGE ve Western Emdirimi ile analiz edildikten sonra protein saflaştırma işlemine geçildi.

5.2.7.1. Lizatın Hazırlanması

Bölüm 5.2.2’de anlatılan yöntemle bu kez geniş ölçekli hazırlanan kültür (4 litre) 600 nm’deki optik yoğunluğu 0.6’ya ulaştıktan iki saat sonra toplandı ve 4000xg 4°C’ta 10 dak. süreyle santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöktürülen bakteri peletleri önce tartıldı ve 1gr için 5 ml hücre patlatma tamponu ile parçalandı. Daha sonra 18 G iğneden geçirildi. Karışım, lizozim, proteaz inhibitörlerinin, DNaz ve MgCl₂ eklenmesini takiben 5 kez 30 saniye buz üzerinde **sonikasyona** (35xhız) tabi tutuldu. Hücre homojenatı 4000xg, 4°C’ta 1 saat süreyle çevrilerek üst sıvı toplandı. Bundan sonra saflaştırma aşamasına geçildi.

5.2.7.2. Ni-NTA Agaroz Kolon

Tüm saflaştırma işlemleri soğuk odada yapılmıştır. Saflaştırma öncesi kolon, kolon başlama tamponuyla 3 kez yıkanarak dengelendi. Lizat üst sıvısı (çözünür protein kesimi) içerisinde 3 ml Ni-NTA reçine bulunan dengelenmiş kolona verildi. Kolon 10 dak. çalkalayıcıda inkübe edildi. Kolona bağlanmayan kesim (Flow-Through) tekrar kolona verildi. Kolon 4 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra toplama tamponu ile protein elde edildi. **50 µM** GDP eklenen protein örnekleri -70 °C’a kaldırıldı. Saflaştırılan proteinlerin miktarları Lowry protokolü ile belirlendikten sonra analizleri SDS-PAGE ve western emdirimi ile gerçekleştirildi.

5.2.7.3. Sephadex G-100 Kolon

Damıtık H₂O içinde bir gece bekletilerek şişirilen Sephadex G-100 50 mM Tris-HCl pH: 7,4 ve 100 mM KCl içinde kolona (1x50 cm) dökülerek aynı tamponla dengelendi.

5.2.8. Dinamik Işık Saçılım Spektroskopik Ölçümleri

Dinamik ışık saçılımı yöntemi (DLS) seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Ni-NTA kolonunda saflaştırılan 1.8 mg/ml derişimli Go α proteini ölçümleri Zeta-sizer Nano ZS (Malvern Instruments) ışık saçılım spektroskopisi kullanarak Koç Üniversitesinde alındı. DLS ile bir çözeltideki proteinlerin boyut dağılımı belirlenebilir. Boyut dağılımını belirlerken çeşitli alternatif yöntemler kullanılabilir. Bunlar sayımı etkileyen örnek sayısı, örnek hacmi ve örnek şiddetidir. Şiddet dağılımında büyük boyutlu parçacıkların etkisi ön plana çıkmaktadır.

5.2.9. [³⁵S] GTP γ S Bağlama Testi

Saflaştırmanın çeşitli aşamalarından elde edilen protein kesimlerindeki guanin nükleotid bağlanma etkinliği GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu [³⁵S]GTP γ S varlığında saptandı (69). Örnek hacmi seyreltme tamponu ile 30 μ l'ye tamamlandı. Üzerine 30 μ l GTP γ S bağlama karışımı eklendi. Karışım 20°C'ta 40 dakika bekletildi. Karışım üzerine 2ml soğuk filtre yıkama çözeltisi eklenerek tepkime durduruldu. Daha sonra örnekler vakum ile nitroselüloz filtrelere emdirildi. Filtreler 4°C'ta soğutulmuş yıkama tamponu ile yıkandı.

5.2.10. Radyoaktivitenin Ölçülmesi

Bağlanan [³⁵S]GTP γ S miktarı %0.4 PPO içeren toluen sıvısı kullanılarak sıvı sintilasyon sayacı ile saptandı. Sayacın verimi %95 olarak belirlendi. Bir dakikalık sayım (cpm) aşağıdaki formül kullanılarak pmol'e çevrildi.

cpm x 100

pmol=

2.22 x sayım verimi (%) x spesifik aktivite(Ci/mol)

5.2.11. Floresans Spektroskopik Ölçümler

5.2.11.1. G_{oα} Proteininin Floresans Spektroskopik Ölçümleri

Go α 'nın proteininin içsel floresansını belirlemek üzere Tübitak MAM'da floresans spektroskopisi (Photon Technology International Spectrofotometer) kullanıldı (63,70,71).

400 nM G_{oα} hiçbir şey içermeyen, 1 μ M GTP γ S içeren ve 1 μ M GTP γ S + 10mM MgSO₄ içeren 400 μ l Tampon A ile 20°C'ta 30 dak. inkübe edildi. Uyarma monokromotörü 290 nm dalga boyuna ayarlandı. Yayılım monokromotörü 300 nm'den 410 nm'ye ayarlanarak floresans yayılım ölçümleri alındı.

5.2.11.2. G_{oα} Proteinine GTP γ S Bağlanma ve Mg⁺² Kinetiği

Uyarma monokromotörü: 290 nm, yayılım monokromotörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı. Tampon A içerisine 400nM derişimli Go α eklenerek 3 dak., 1 mM GTP γ S eklenerek 30 dak. ve 10 mM MgSO₄ eklenerek 30 dakika ölçüm alındı (64).

5.2.12. G_{α} Proteininin Floresansına GTP'nin Etkisi

Uyarılma monokromotörü: 290 nm, yayılım monokromotörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı. Tampon A içerisine 200 nM derişimde G_{α} eklenerek 4 dak., 2mM GTP eklenerek 9 dak. ve 1 M $MgSO_4$ eklenerek 10 dakika ölçüm alındı (65).

5.2.13. G_{α} Proteininin Floresansında GTP'nin Neden Olduğu Değişikliğe GDP'nin Etkisi

Uyarılma monokromotörü: 290 nm, Yayılım monokromotörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı. 10mM $MgSO_4$ içeren Tampon A içerisine 200 nM konsantrasyonlu G_{α} eklenerek 3,5 dak., 100 μ M GTP eklenerek 9 dak. ve 100 μ M GDP eklenerek 5 dakika ölçüm alındı (65).

5.2.14. BODIPY FL-GTP γ S Floresans Spektroskopik Ölçümler

5.2.14.1. BODIPY FL-GTP γ S – G_{α} Proteininin Uyarılma ve Yayılım Spektrum Ölçümü

Tampon HEM'e 50nM BODIPY FL-GTP γ S eklenerek 470 nm dalgaboyunda ölçüm alındı. Üzerine 400 nM G_{α} eklendi ve 25°C'ta 30 dak. inkübe edildikten sonra ölçüm alındı. Bu karışımın üzerine 20 μ M GTP γ S eklendi ve 25°C'ta 20 dakika. inkübe edildikten sonra ölçüm alındı (72,44).

5.2.14.2. BODIPY FL-GTP γ S – G_{α} Proteininin Etkileşim Kinetiği

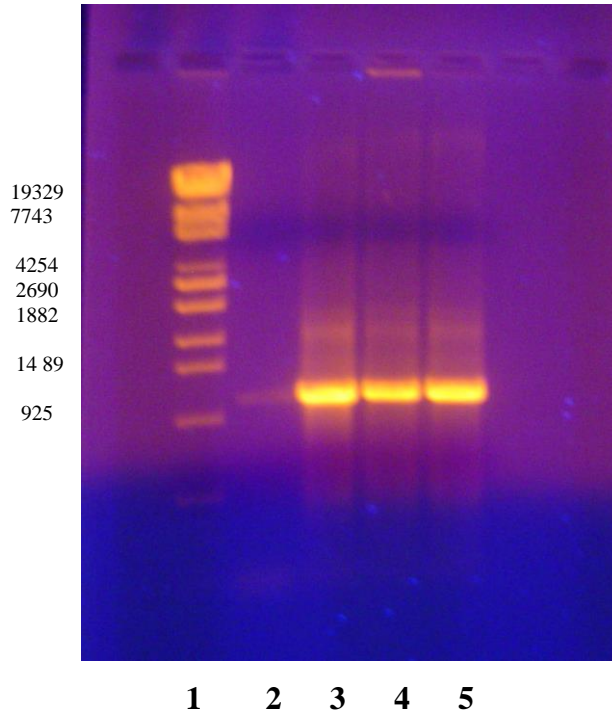
Tampon HEM'e 50nM BODIPY FL-GTP γ S eklenerek 470 nm dalgaboyunda 2 dak. ölçüm alındı. 2 dakika sonra 400 nM G_{α} eklendi ve 35 dakika ölçüm alındı. Üzerine 20 μ M GTP γ S eklendi ve 30 dakika ölçüm alındı (73).

6. BULGULAR

6.1. Klonlama

6.1.1. G_{α} Dizisinin PZR ile çoğaltılması

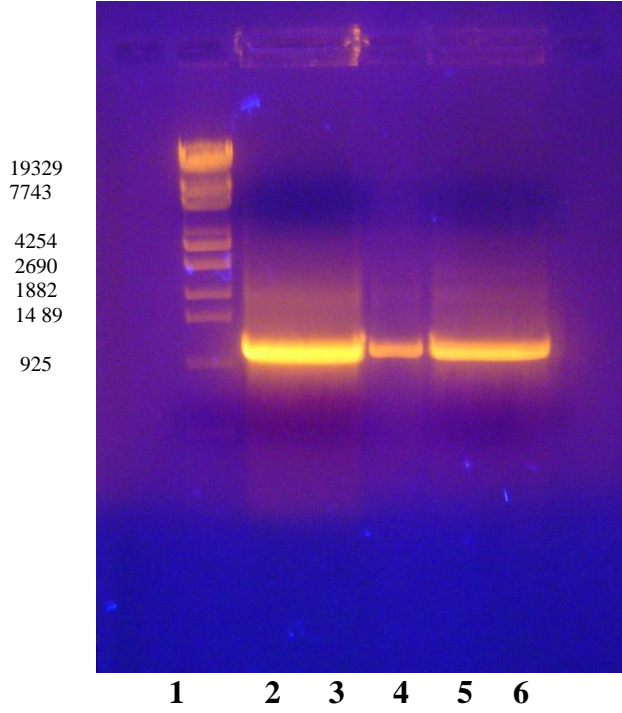
G_{α} cDNA'sını çoğaltmak için pT7/Nde1/ G_{α} kalıbı (ref)ve RNS-RCH primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Bölüm 5.2.1'de belirtilen PZR koşulları uygulanarak istenilen bölge (1067kDa) oğaltıldı (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. pT7/Nde1/ G_{α} vektöründen uygun primerler kullanılarak çoğaltılan G_{α} cDNA'sının gel görüntüsü. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüler elde edildi 1, Lambda DNA/Eco I301 (StyI) Marker 2, Negatif Kontrol 3-5, RNS ve RCH primerleri kullanılarak çoğaltılan G_{α} cDNA'sı (10 μ l, 100 ng kalıp)

6.1.2. PZR Ürününün Agaroz Gelden Ekstraksiyonu

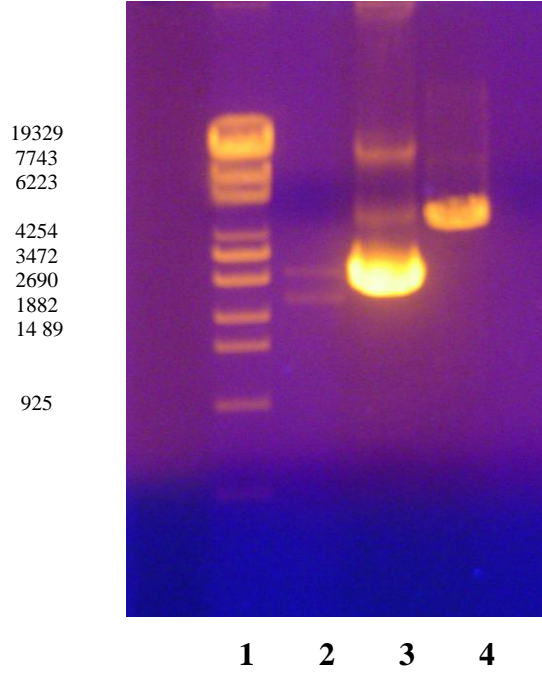
PZR ürününü %1'lik agaroz ile hazırlanan preparatif gelde 150 V'la yürütüldü. PZR ürününün(1062 bp) gelden ekstraksiyonu Wizard PCR Preps DNA purification system kiti kullanılarak yapıldı (Şekil 6.2) ve HindIII, SacI enzimleri ile enzim kesimi gerçekleştirildi. Enzim kesim ürünleri, PZR temizleme kiti kullanılarak temizlendi.



Şekil 6.2. PZR ürününün preparatif gel elektroforezi: G_{0α} cDNA'sını pT7/Nde1/ G_{0α} vektöründen RNS ve RCH primerleri kullanılarak çoğaltıldı. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüler elde edildi 1, Lambda DNA/Eco I301 (StyI) Marker; 2-6, 100 ng kalıp

6.1.3. pQE80 Plazmidinin Hazırlanması ve Yapıştırma

Top10 hücrelerindeki pQE80 plazmidi Qiagen Mini Prep kiti kullanılarak izole edildi. Elde edilen plazmidin iki saat boyunca SacI ve HindIII enzimleri ile kesimi gerçekleştirildi (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. pQE 80 plazmidi izolasyonu ve restriksiyon enzimleri ile kesimi.1, Lambda DNA/Eco I301 (StyI) Marker; 2, İzole pQE 80 (Prep I); 3, İzole pQE 80 (Prep II); 4, Prep II, Gece boyu Hind III-SacI kesimi.

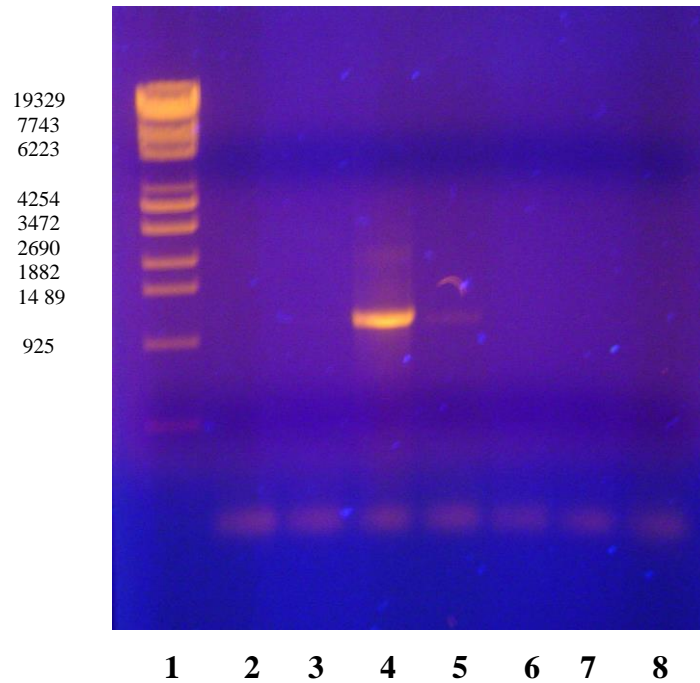
Elde edilen kesilmiş plazmid defosforile edildi. Defosforile edilmiş plazmid ile G_{α} cDNA'sı T4 DNA ligaz (MBI Fermentas) ile yapııştırıldı.

6.1.4. Aktarma ve Koloni Taraması

Plazmidin aktarılacağı alıcı hücreleri hazırlamak için Top10 hücreleri 10 ml'lik gece boyu kültürde büyütüldü. Ertesi gün 40 ml taze besi ortamına gece boyu kültürden 1 ml eklendi ve büyümeye bırakıldı. $OD_{600}=0.12-0.2$ 'ye ulaştığında kültür buza konuldu. Santrifüjde $3000\times g$, 15 dak., $4^{\circ}C$ 'ta çevrildi. Üst sıvı atılarak, çökelek toplam 5 ml soğuk 50 mM $CaCl_2$ 'de çözüldü. Buzda 1-1.5 saat bekletildikten sonra $3500\times g$, 10 dak., $4^{\circ}C$ 'ta çevrildi.

Alıcı hücrelerin hazırlanmasını takiben, aktarma $42^{\circ}C$ 'ta gerçekleştirilen ısı şokuyla plazmidlerin alıcı hücre içine girmesi sonucu gerçekleşti.

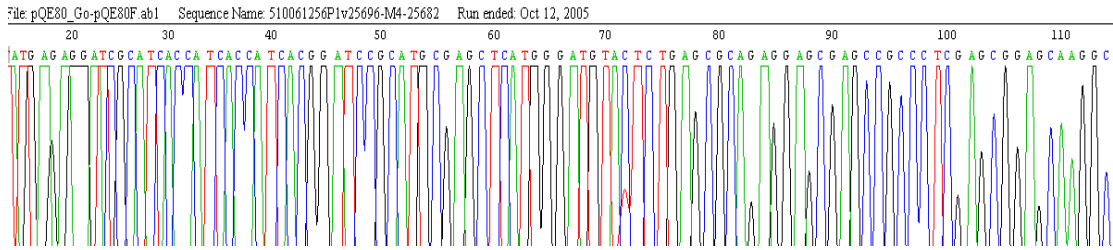
Aktarma sonrası bu transforme hücreler ampisilinli petri kaplarına yayılıp, gece boyu $37^{\circ}C$ 'ta inkübasyonun ardından koloni taraması yapıldı. Koloni taraması PZR kontrolü ile gerçekleştirildi (Şekil 6.4). Sadece bir kolonide G_{α} cDNA'sı bulundu. G_{α} cDNA'sı bulunan koloniden kültür yapıp gliserol stok hazırlandı.



Şekil 6.4. Transformasyon sonrası PZR koloni taraması.1, Lambda DNA/Eco I301 (StyI) Marker; 2-8, PZR ürünleri. Sadece 4. kuyuda pQE80- G_{α} PZR ürünü bulunmaktadır..

6.1.5. Dizi Analizi Bulguları

İzole edilen pQE80- G_{α} plazmidi kontrol amacıyla dizi analizine gönderildi. Dizi analiz sonuçları Chromas 1.45 programıyla değerlendirildi. 25. baz'dan itibaren 6 tane His etiketleri başlamaktadır: CAT CAC CAT CAC CAT CAC. 61. Bazdan itibaren ise G_{α} dizisi başlamaktadır: ATG GGA TGT ACT CTG AGC GCA (Şekil 6.5). Dizi'nin kontrolü sonucunda herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir. Dizi analizi sonucunda G_{α} cDNA'sının pQE80 vektor sistemine klonlanmış olduğunu belirlendi.

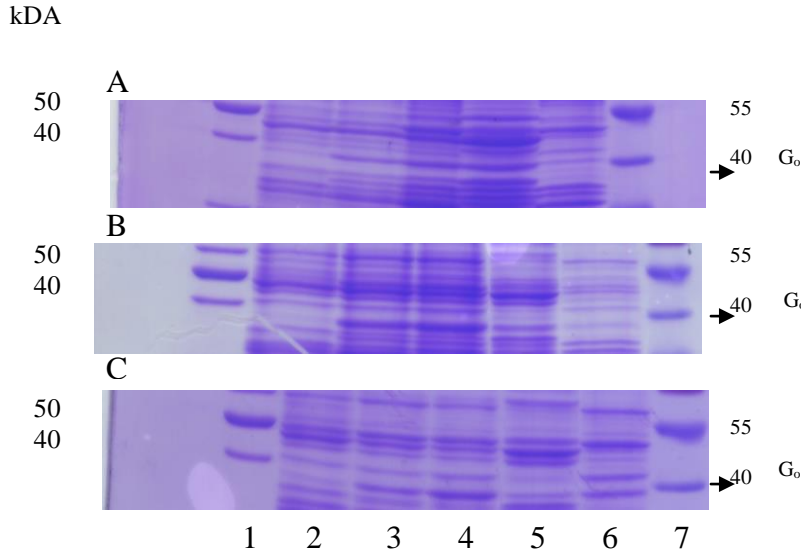


Şekil 6.5. pQE80- G_{α} dizi analizi sonuçları. G_{α} dizisinin bir kısmı görülmektedir.

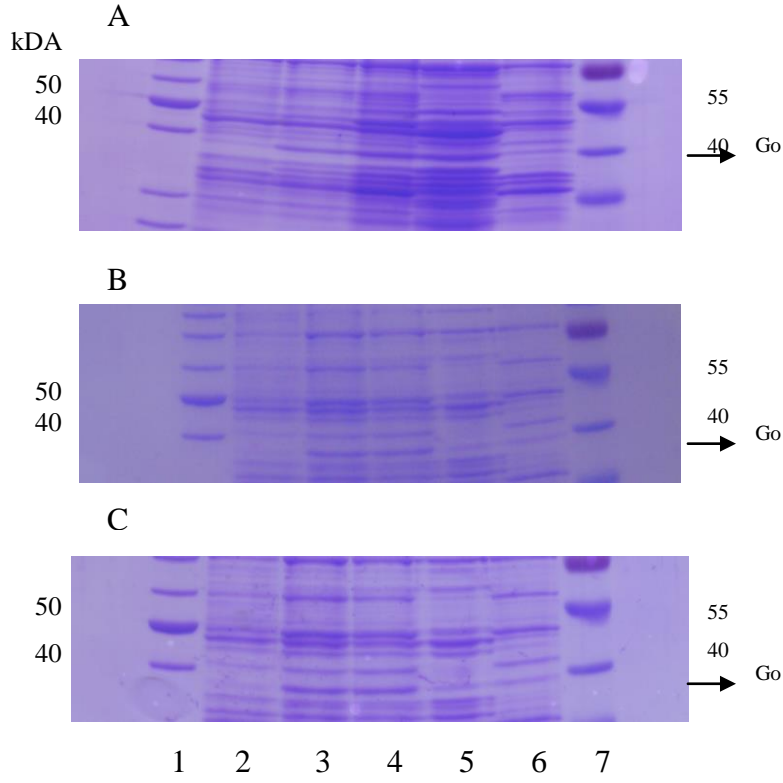
6.2. G_{0α} Proteininin Ekspresyonu

Protein ekspresyonunu kontrol etmek üzere farklı IPTG derişimleri ile (1 mM, 0.1 mM) farklı sıcaklıklarda (37°C, 30°C, 25°C), küçük ölçekli ekspresyon deneyleri başlatıldı. Ekspresyon deneyleri için gece boyu kültür yapıldı. Ertesi gün 1:100 seyreltilen kültürler 37°C'ta büyümeye bırakıldı ve 600 nm dalga boyunda ki optik yoğunluğu 0.6 olduğunda ekspresyon 1 mM ve 0.1mM IPTG derişimleri ile indüklendi. Kültürler daha sonra gece boyu farklı sıcaklıklarda büyümeye bırakıldı.

Her kesimden örnek alınarak SDS-PAGE analizleri yapıldı (Şekil 6.6, Şekil 6.7). Ok ile işaretlenmiş bölgeler 39 kDa ağırlığındaki G₀ alfa altbirimini göstermektedir. 1 mM IPTG derişimi ve 25°C sıcaklıkta eksprese olan proteinin önemli bir kısmının çözünür olduğu görüldü.

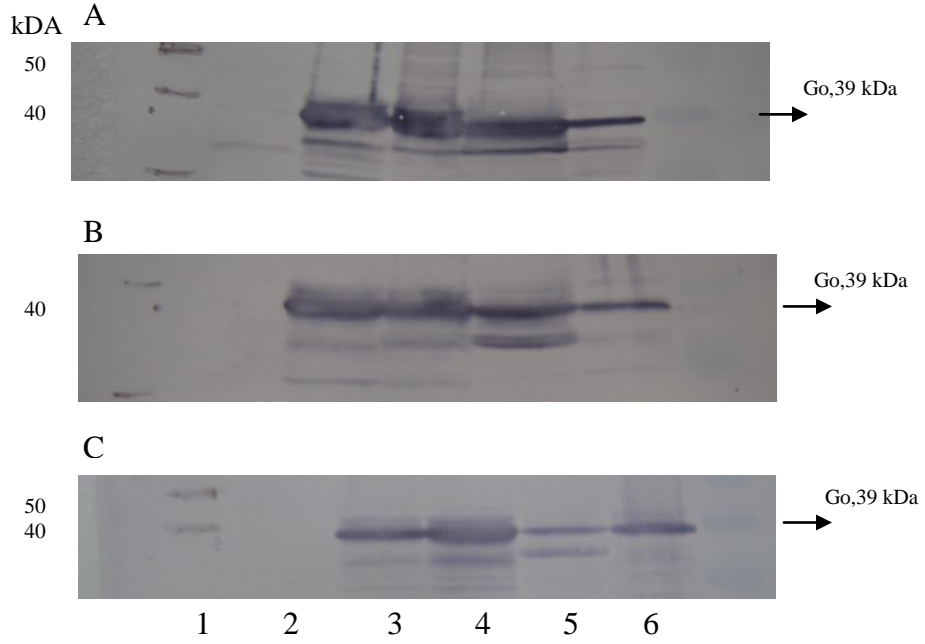


Şekil 6.6. Farklı sıcaklıklarda indüklenen G_{0α} ekspresyonu. 1, Protein standartları; 2, İndüksiyon öncesi; 3, Hücre lizatı (4 saat indüksiyon sonrası); 4, Hücre lizatı (Gece boyu indüksiyon sonrası); 5, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 6, Tüm hücre lizatından çözünür olmayan kesim; 7, Protein Standartları. Ekspresyon, 25°C (A), 30 °C (B), 37 °C'ta (C) gece boyu gerçekleştirildi. IPTG derişimi 1mM'dır. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edildi.

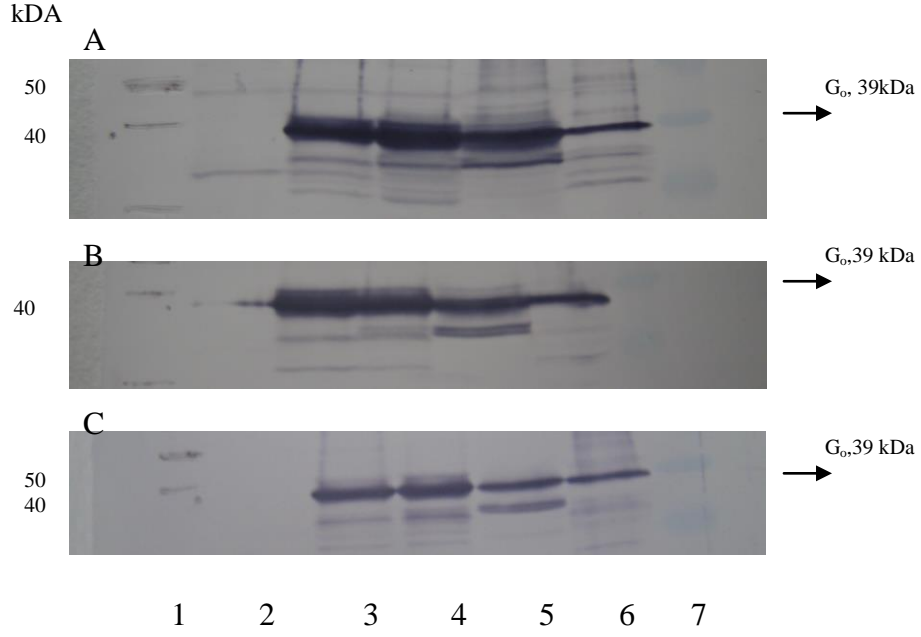


Şekil 6.7. Düşük IPTG derişiminde farklı sıcaklıklarda indüklenen $G_{\alpha\alpha}$ ekspresyonu. 1, Protein standartları; 2, İndüksiyon öncesi; 3, Hücre lizatı (4 saat indüksiyon sonrası); 4, Hücre lizatı (Gece boyu indüksiyon sonrası); 5, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 6, Tüm hücre lizatından çözünür olmayan kesim; 7, Protein Standartları. Ekspresyon, 25°C (A), 30°C (B), 37°C'ta (C) gece boyu gerçekleştirildi. IPTG derişimi 0.1mM'dır. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edildi

Farklı sıcaklık ve farklı IPTG derişimlerinde indüklenerek elde edilen kesimlerin Western emdirimi analizleri yapıldı (Şekil 6.8, Şekil 6.9). Analizlerde $G_{\alpha\alpha}$ proteinine özgül fare monoklonal antikor (Chemicon) kullanıldı. Daha sonra membranlar alkaleen bağlı keçi anti-fare IgG ile 2 saat etkileştirildi. Renklenme reaksiyonu BCIP/NBT renk geliştirici tampon ile gerçekleştirildi.



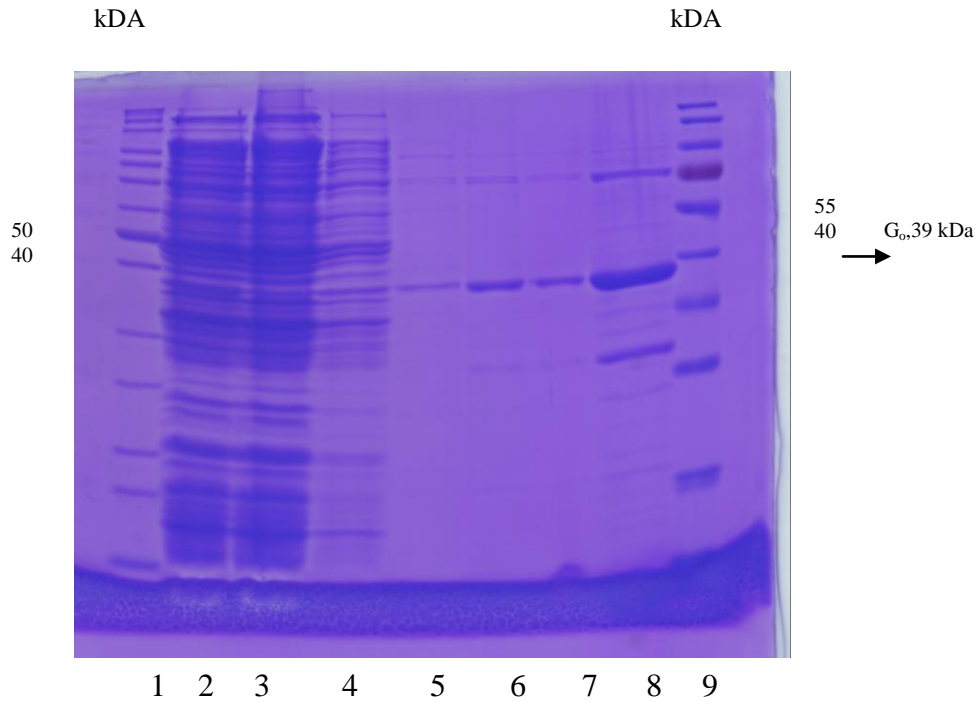
Şekil 6.8. Düşük IPTG derişiminde farklı sıcaklıklarda indüklenen G_{αα} ekspresyonunun Western emdirimi analizi. 1, Protein Standartları; 2, İndüksiyon öncesi; 3, Hücre lizatı (4 saat indüksiyon sonrası); 4, Hücre lizatı (Gece boyu indüksiyon sonrası); 5, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 6, Tüm hücre lizatından çözünür olmayan kesim; 7, Protein Standartları Ekspresyon, 25°C (A), 30°C (B), 37°C'ta (C) gerçekleştirildi. IPTG derişimi 0.1mM'dır. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edilerek nitroselüloz membrana aktarıldı.



Şekil 6.9. Farklı sıcaklıklarda indüklenen G_{αα} ekspresyonunun Western emdirimi analizi. 1, Protein Standartları; 2, İndüksiyon öncesi; 3, Hücre lizatı (4 saat indüksiyon sonrası); 4, Hücre lizatı (Gece boyu indüksiyon sonrası); 5, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 6, Tüm hücre lizatından çözünür olmayan kesim; 7, Protein Standartları Ekspresyon, 25°C (A), 30 °C (B), 37 °C'ta (C) gerçekleştirildi. IPTG derişimi 1mM'dır. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edilerek nitroselüloz membrana aktarıldı.

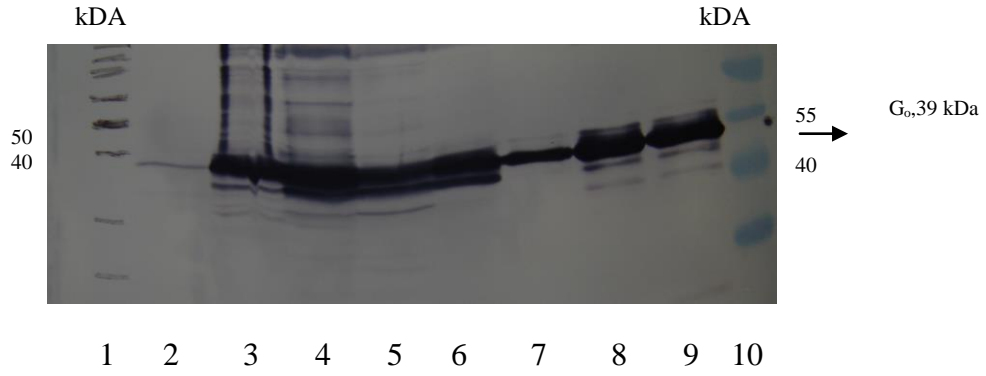
6.3. G_α Protein Saflaştırması

Küçük ölçekli yapılan ekspresyon deneylerinden, protein ekspresyon çalışmalarına 1 mM IPTG derişimi ve 25°C sıcaklıkta gece boyu yapılmasına karar verildi. Öncelikle küçük ölçekli ekspresyon yapıldı. Buradan elde edilen kesimlerden saflaştırma deneylerine geçildi. G_α proteini histidin etiketli olduğundan, saflaştırma deneylerinde Ni-NTA reçinesi kullanıldı. İlk saflaştırma deneylerinde 20 ml kültür kullanıldı. Bu kültürden elde edilen çözünür kesim kolona verildi. Elüsyon için optimum imidazol konsantrasyonunu belirlemek üzere farklı derişimlerde imidazol hazırlandı. %10 SDS PAGE gel elektroforezi analiziyle toplama için en uygun imidazol derişiminin 150 mM olduğu belirlendi (Şekil 6.10).



Şekil 6.10. Ni-NTA Reçinesi kullanarak histidin etiketli G_α Proteininin saflaştırması. 1, Protein Standartları; 2, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 3, Kolona bağlanmayan kesim; 4, Yıkantı; (5-8) sırasıyla 25mM, 50mM, 100mM, 150mM imidazol; 9, Protein Standartları. Ekspresyon, 25°C'ta 1mM IPTG ile gerçekleştirildi. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edildi.

Bu küçük ölçekli saflaştırma deneyinden elde edilen proteinlerin Western emdirim analizi yapıldı (Şekil 6.11).



Şekil 6.11. Histidin etiketli G_{α} Proteininin Ni-NTA kolonundan saflaştırmasının Western emdirimi analizi. 1, Protein Standartları; 2, İndüksiyon öncesi; 3, Hücre lizatı (Gece boyu indüksiyon sonrası); 4, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 5, Kolona bağlanmayan kesim; (6-9) sırasıyla 25mM, 50mM, 100mM, 150mM imidazol; 10, Protein Standartları. Ekspresyon, 1mM IPTG ile 25°C’ta gerçekleştirildi.

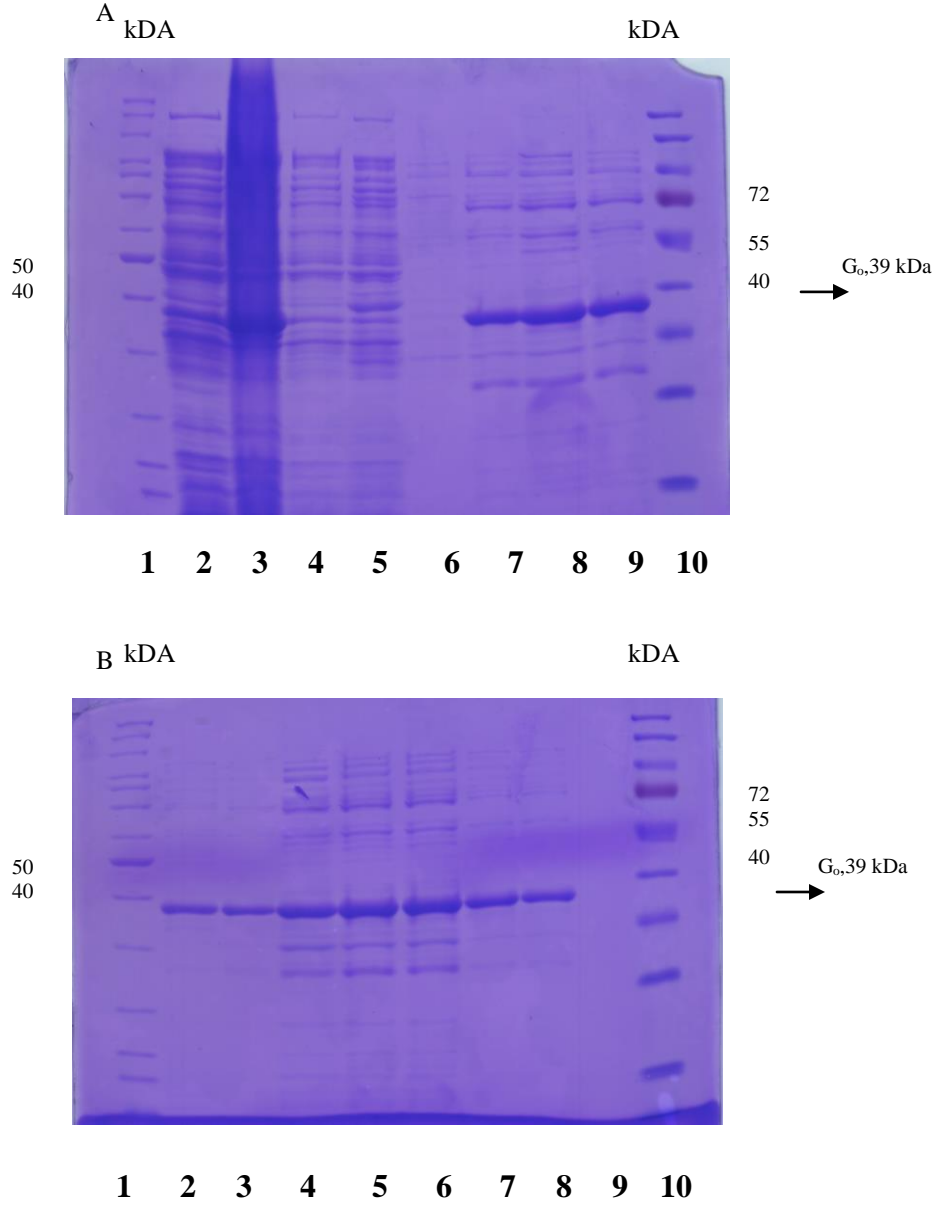
En optimal imidazol derişiminde, en yüksek miktarda saf proteininin elde edildiği protokol (Yöntem 5.2.7) sonraki deneylerde uygulandı.

Saflaştırma deneylerine büyük ölçekli kültürlerle devam edildi. Her saflaştırma deneyinde 4 litre kültür kullanıldı. Kültürlerden elde edilen pelletlerden yapılan saflaştırma işlemlerinde yüksek derişimde çözümlü protein elde edildi. Protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi (Tablo 6.1).

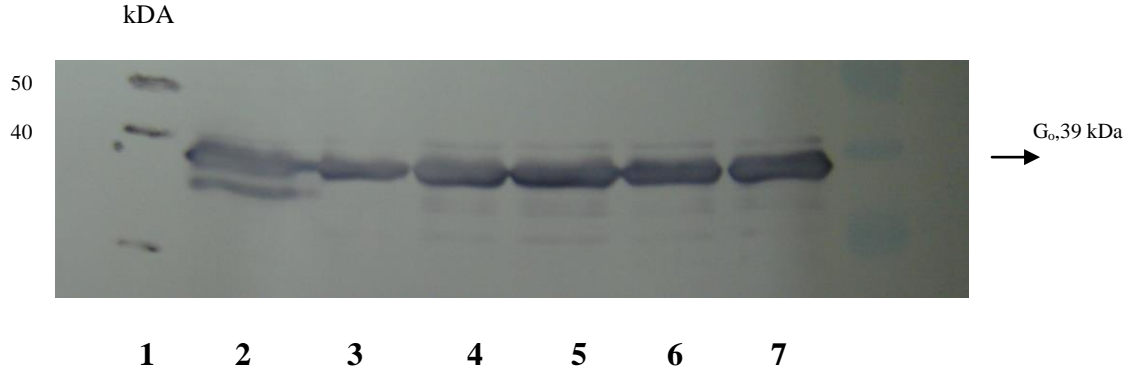
Tablo 6.1. Protein derişimleri.

	Protein Miktarları (mg/ml)	Hacim	Toplam Protein
İndükleme Öncesi	4,2	4000 ml	16800 mg
İndükleme Sonrası	10,43	4000 ml	41720 mg
Sitoplazmik kesim	8,95	80 ml	716 mg
Kolona Bağlanmayan Kesim	7,8		624 mg
Yıkantı 4	0,05	40 ml	2 mg
Toplama	2,5	30 ml	75 mg

Safılaştırılan proteinin analizleri SDS-PAGE ve Western Emdirimi ile yapıldı (Şekil 6.12, Şekil 6.13).



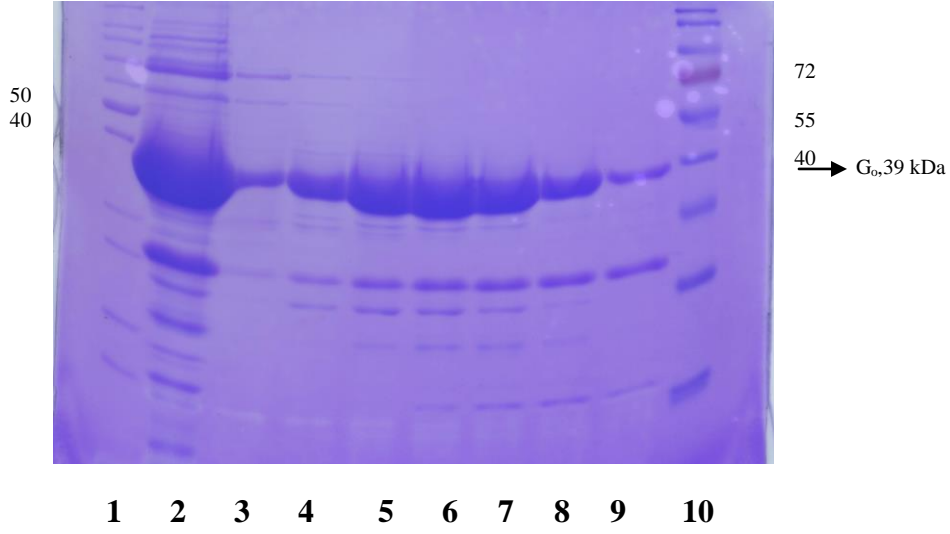
Şekil 6.12. Büyük ölçekli kültürde $G_{0\alpha}$ ekspresyonu. A) 1, Protein Standartları; 2, Tüm hücre ekstraktından sitoplazmik kesim; 3, Tüm lizat; 4, Kolona bağlanmayan kesim; 5, Yıkantı 1; 6, Yıkantı 4 ; 7, Elüsyon 1 ; 8, Elüsyon 2 ; 9, Elüsyon 3; 10, Protein Standartları. B) 1, Protein Standartları; 2, Toplama 4 ; 3, Toplama 5 ; 4, Toplama 6; 5, Toplama 7 ; 6, Toplama 8 ; 7, Toplama 9; 8, Toplama 10; 10, Protein Standartları. Ekspresyon, 1 mM IPTG ile 25°C'ta gerçekleştirildi. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edildi.



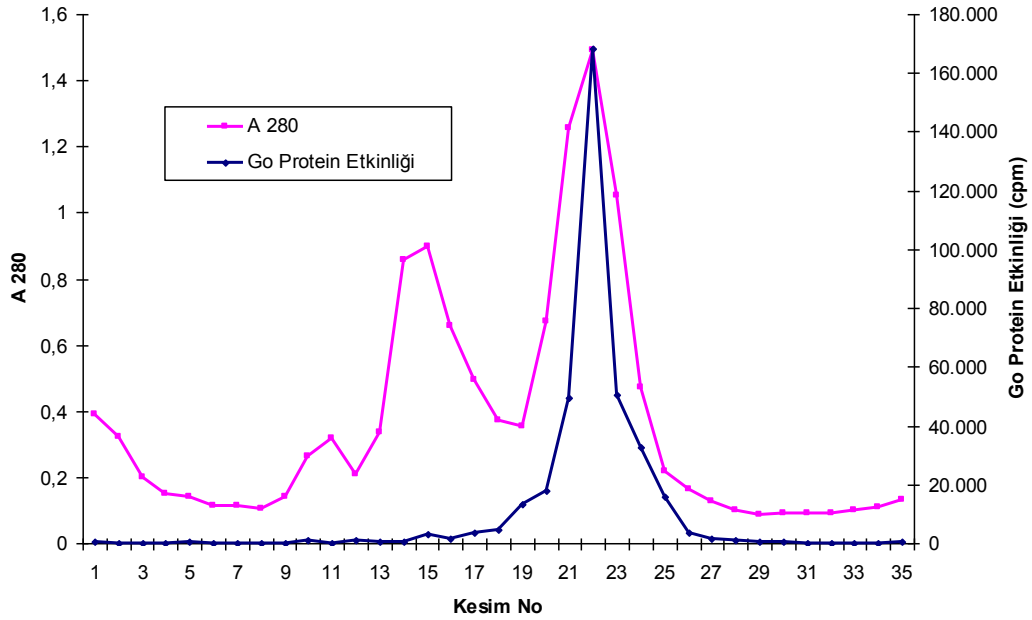
Şekil 6.13. Histidin etiketli G_{α} proteininin Ni-NTA kolonundan saflaştırmasının Western emdirimi analizi. 4 litrelik kültürden elde edilen hücre lizat üst sıvısı Ni-NTA kolonundan saflaştırıldı. 1, Protein Standartları; 2, Tüm hücre lizatından sitoplazmik kesim; 3, Toplama 1; 4, Toplama 2; 5, Toplama 3; 6, Toplama 4; 7, Toplama 5. Ekspresyon, 1mM IPTG ile 25°C’te gerçekleştirildi.

6.4. Moleküler Elek Kromatografisi (Sephadex G-100)

Ni-NTA kolonundan elde edilen proteinlerin derişimi Centricon konsantratör kullanılarak arttırıldıktan sonra TK tamponuyla dengelenmiş Sephadex G-100 kolonuna uygulandı. Protein absorbans (280 nm) değerlerinden 14.-17. ve 20.-24. kesimler arasında yüksek tepeler elde edildi. Yapılan SDS-PAGE analizleri sonucunda 20-24 kesimleri arasında G_{α} proteininin elde dildiği belirlendi (Şekil 6.14). [35 S]GTP γ S bağlanma ile en yüksek etkinliğin 22. kesimde olduğu belirlendi (Şekil 6.15).



Şekil 6.14. Histidin etiketli G_{0α} Proteininin Sephadex G-100 kullanılarak saflaştırılması. 1, Protein Standartları; 2, Konsantre G_{0α} proteini; (3-9), sırasıyla G-100 kolonundan alınan 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 nolu kesimler; 10, Protein Standartları. Örnekler %10 SDS-PAGE ile analiz edildi.



Şekil 6.15. Sephadex G-100 kullanarak histidin etiketli G_{0α} Proteininin saflaştırmasının kesimleri ve etkinlikleri.

6.5. Saflaştırma İşleminin Genel Değerlendirmesi

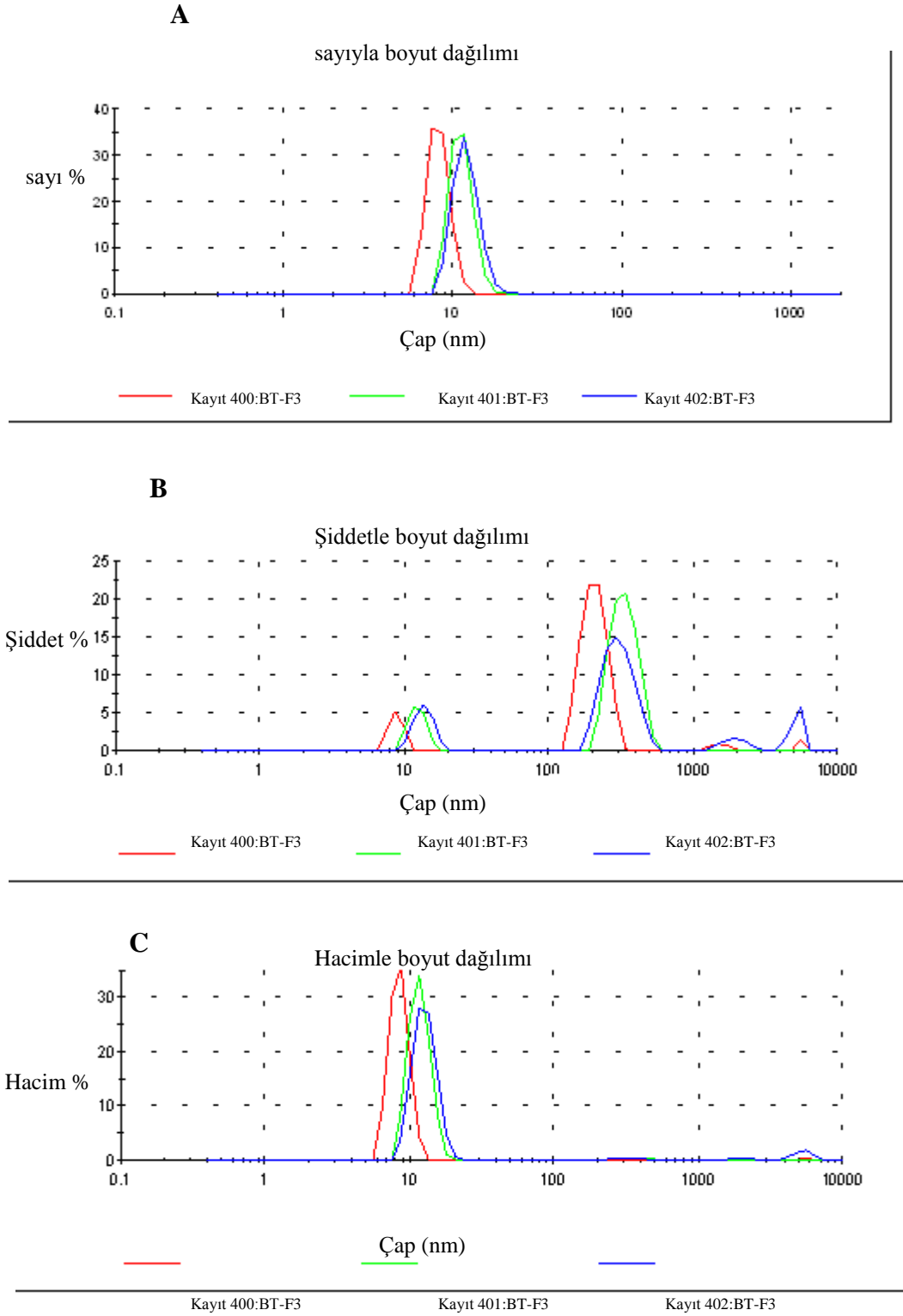
G_{α} proteininin özgün etkinliği yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra 213,2 kat artmıştır (Tablo 6.2).

Tablo 6.2. G_{α} protein saflaştırmasının genel değerlendirilmesi

Kesim	Toplam Protein (mg)	Hacim (ml)	Toplam Etkinlik(µmol)	Özgün Etkinlik (µmol/mg)	Saflaştırma Katı
Sitoplazmik	716	80	662586	925,4	1
Ni-NTA	60	15	4768000	79467	85,87
G-100	4,46	1	879975	197304	213.2

6.6. Dinamik Işık Saçılım Spektroskopisi Ölçümleri

Toplama tamponun bulunan 1.5 mg/ml konsantrasyonlu G_{α} proteininin 10 nm yarıçap büyüklüğünde ki parçacıkların çevresinde homojen tek bir dağılım göstermekte olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.16.B).



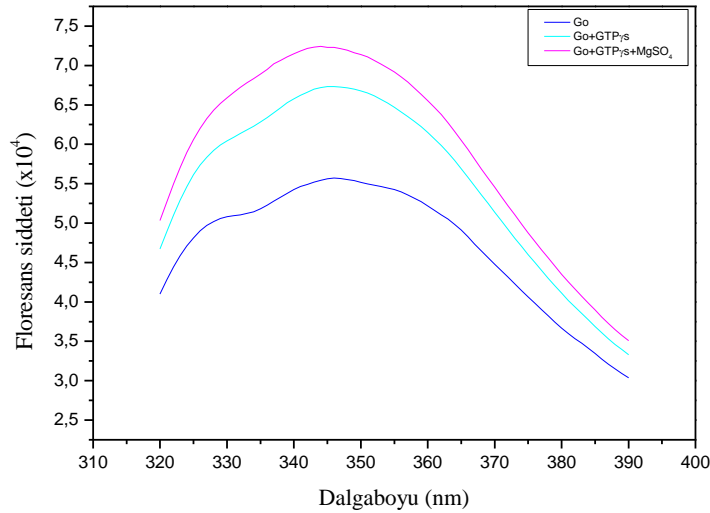
Şekil 6.16. G_{α} proteininin dinamik ışık saçılım spektroskopisinin % dağılımı. A, Sayı; B, Şiddet; C, Hacim. Ölçümlerde 1.5 mg/ml G_{α} kullanıldı.

6.7. Floresans Spektroskopik Ölçümler

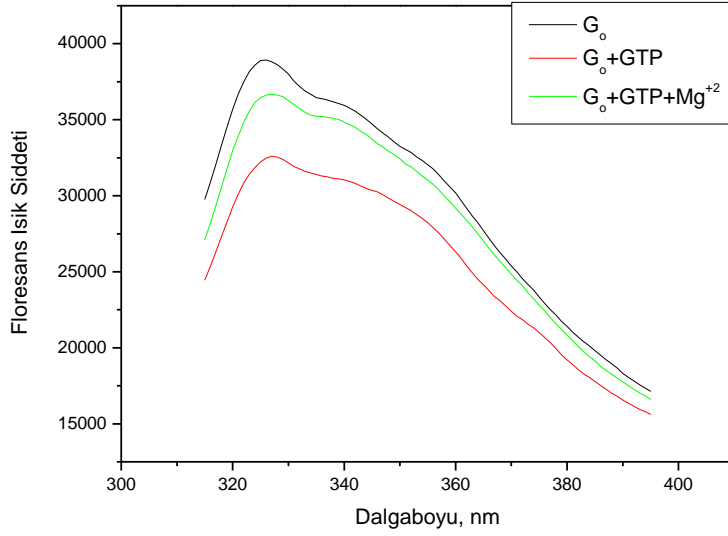
6.7.1. G_{α} Proteininin İçsel Floresans Spektroskopik Ölçümleri

G_{α} 'nın proteininin içsel floresansını belirlemek üzere floresans spektroskopisi (Photon Technology International Spectrofotometer) uygulandı. Tampon A içerisindeki G_{α} proteini 346 nm'de maksimum yayılım verdiği belirlendi (Şekil 6.17). G_{α} proteininin 1 μ M GTP γ S ile 20°C'ta 30 dakika inkübasyon edilip floresans ölçüm alındığında floresans şiddetinde %20 artış gözlemlendi. GTP γ S ile birlikte 10mM MgSO₄ eklendiğinde floresans şiddetinde %31 artış gözlemlendi.

G_{α} 'nın proteininin içsel floresansına GTP'nin etkisini incelemek için 290nm dalga boyunda emisyon ölçümleri alındı. Tampon A içerisine 200 nM derişimli G_{α} eklenerek birinci ölçüm alındı. 10 μ M GTP eklenerek ve 10mM MgSO₄ eklenerek ölçümler alındı (Şekil 6.18). GTP'nin eklenmesiyle floresans şiddetinde düşme gözlemlenirken, MgSO₄ eklenmesiyle artış belirlendi.



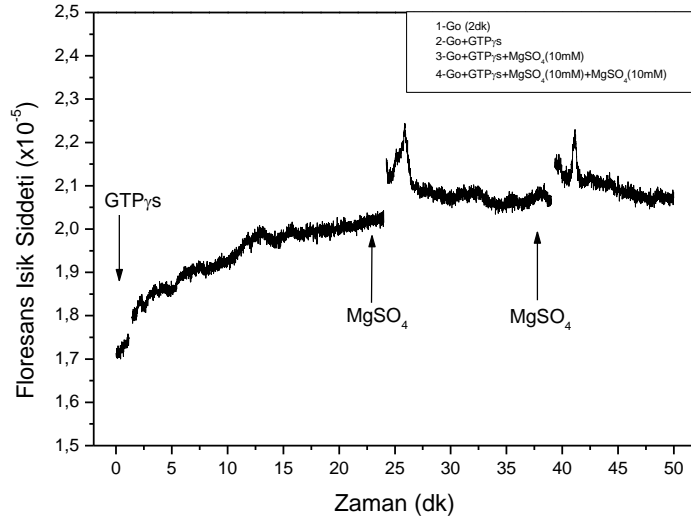
Şekil 6.17. G_{α} 'nın içsel triptofan floresansı. G_{α} (400 nM) çözelti A, çözelti A 1 μ M GTP γ S ve çözelti A+10mM konsantrasyonlu MgSO₄ ile inkübe edilmiştir. Uyarma monokromatörü: 290 nm, yayılım monokromatörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı.



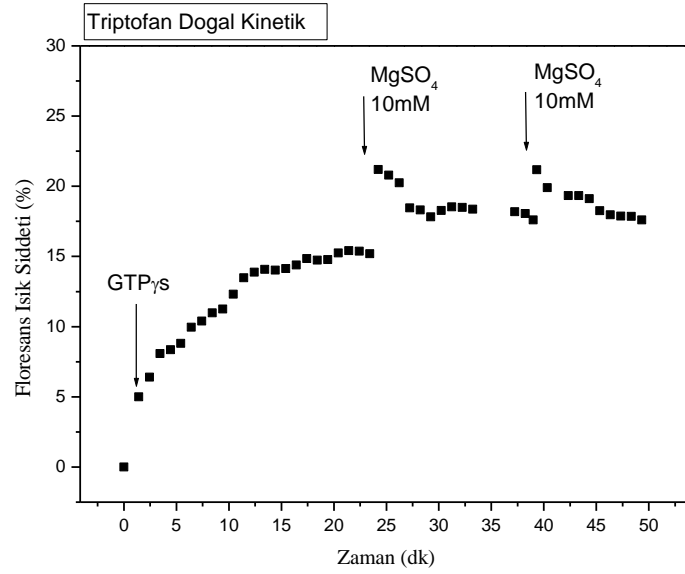
Şekil 6.18. G_α'nın proteininin içsel floresansına GTP'nin etkisi. Tampon A içerisine 200 nM konsantrasyonlu G_α eklenerek birinci ölçüm alındı. 10 µM GTP ve 10 mM MgSO₄ eklenerek diğer ölçümler alındı.

6.7.2. G_α Proteininin Floresansının Mg²⁺ Bağımlı Artışının Kinetiği

Uyarma monokromotörü: 290 nm, yayılım monokromotörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı. Tampon A içerisine sırasıyla 400nM G_α eklenerek 3 dak., 1mM GTPγS eklenerek 30 dak. ve 10 mM MgSO₄ eklenerek 25 dakika ölçüm alındı. 15 dakika sonra tekrar MgSO₄ eklenerek ölçüm alındı. G_α proteinine GTPγS eklenmesi floresans şiddetinde zamanla artışa yol açtı. Belirli zaman aralıklarında Mg²⁺ eklenmesi önce keskin bir artışa neden oldu, daha sonra bu artış azalarak GTPγS şiddetinden daha yüksek şiddette devam etti. Bu artış hem şiddet olarak hem de yüzde olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6.19, 6.20).



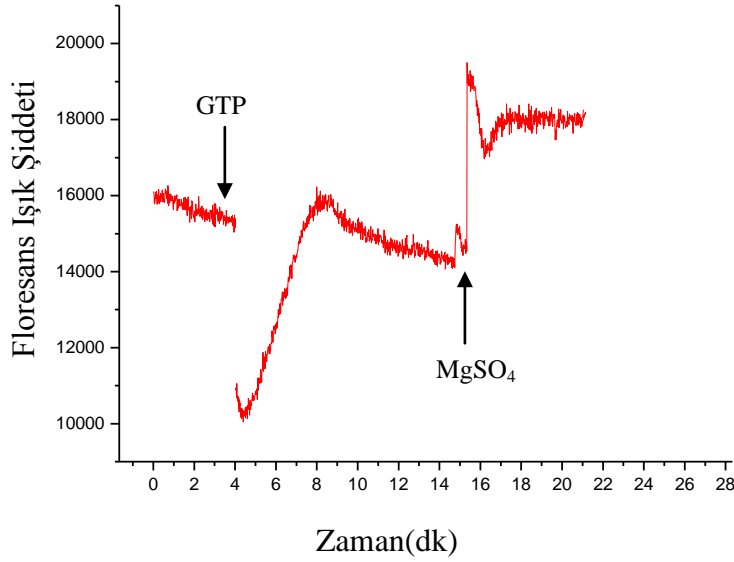
Şekil 6.19. $G_{0\alpha}$ 'nın içsel triptofan floresans Kinetiği. $G_{0\alpha}$ (400 nM) çözelti A, çözelti A+ 1 μ M $GTP\gamma S$ ve çözelti A+ 10 mM $MgSO_4$ ile inkübe edilmiştir.



Şekil 6.20. $G_{0\alpha}$ 'nın içsel triptofan floresans kinetiğinin yüzde artışı. $G_{0\alpha}$ (400 nM) çözelti A, çözelti A+1 μ M $GTP\gamma S$ ve çözelti A içerisinde 10 mM $MgSO_4$ eklenerek inkübe edilmiştir.

6.7.3. G_{α} Proteininin Floresansına GTP'nin Etkisi

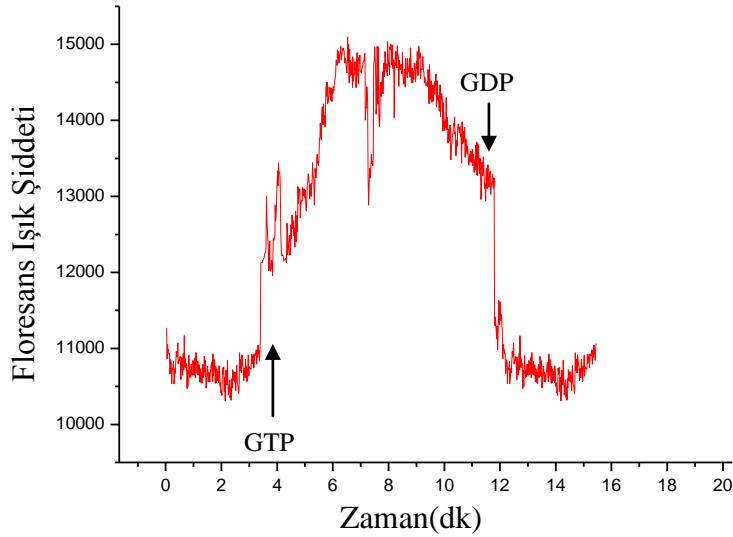
Uyarılma monokromotörü: 290 nm, yayılım monokromotörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı. Tampon A içerisine sırasıyla 200 nM konsantrasyonlu G_{α} eklenerek 4 dak., 100 μ M GTP eklenerek 12 dak. ve 20 mM $MgSO_4$ eklenerek 10 dakika ölçüm alındı. Floresans şidetinde GTP eklenmesiyle önce azalma gözlemlenirken, daha sonra artış gözlemlenmiştir. $MgSO_4$ eklenmesiyle ani bir artış sonra azalış gözlemlenmektedir (Şekil 6.21).



Şekil 6.21. G_{α} proteininin floresansına GTP'nin etkisi. Tampon A içerisine 200 nM G_{α} eklenerek 4 dak., 100 μ M GTP eklenerek 12 dak. ve 20 mM $MgSO_4$ eklenerek 10 dakika ölçüm alındı.

6.7.4. G_{α} Proteininin Floresansında GTP'nin Neden Olduğu Değişikliğe GDP'nin Etkisi

Uyarılma monokromotörü: 290 nm, Yayılım monokromotörü: 340 nm olacak şekilde ayarlandı. 10mM $MgSO_4$ içeren Tampon A içerisine 200 nM konsantrasyonlu G_{α} eklenerek 3,5 dak., 100 μ M GTP eklenerek 9 dak. ve 100 μ M GDP eklenerek 5 dakika ölçüm alındı. Floresans şiddetinde GTP'nin eklenmesiyle önce artış, sonrasında durağan durum, daha sonra azalış gözlemlenmiştir. GDP eklenmesiyle ani bir azalış gözlemlenmektedir (Şekil 6.22).

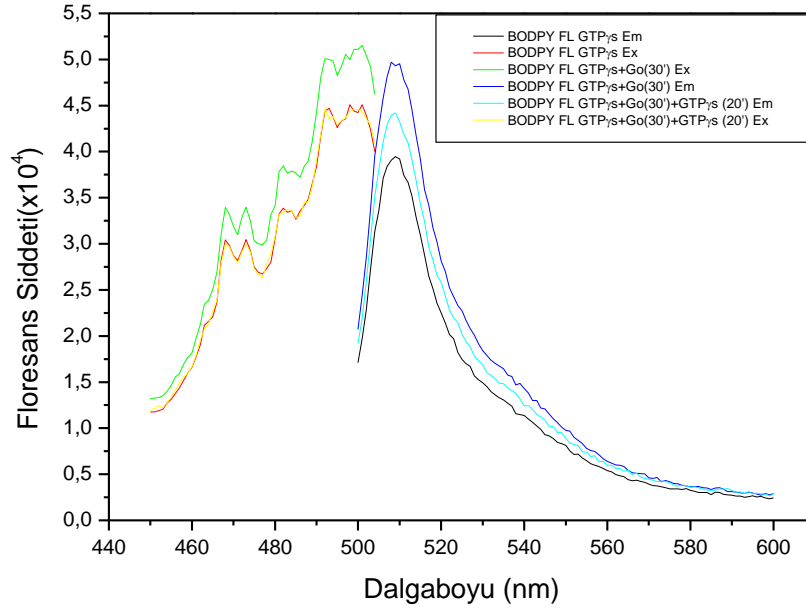


Şekil 6.22. G_{α} proteininin floresansına GTP'nin neden olduğu değişikliğe GDP'nin etkisi. 10mM $MgSO_4$ içeren Tampon A içerisine 200 nM konsantrasyonlu G_{α} eklenerek 3,5 dak., 100 μ M GTP eklenerek 9 dak. ve 100 μ M GDP eklenerek 5 dakika ölçüm alındı.

6.8. BODIPY FL-GTP γ S ile Floresans Spektroskopik Ölçümler

6.8.1. BODIPY FL-GTP γ S – G α Proteininin Uyarım ve Yayılım Spektrumlarının Ölçümü

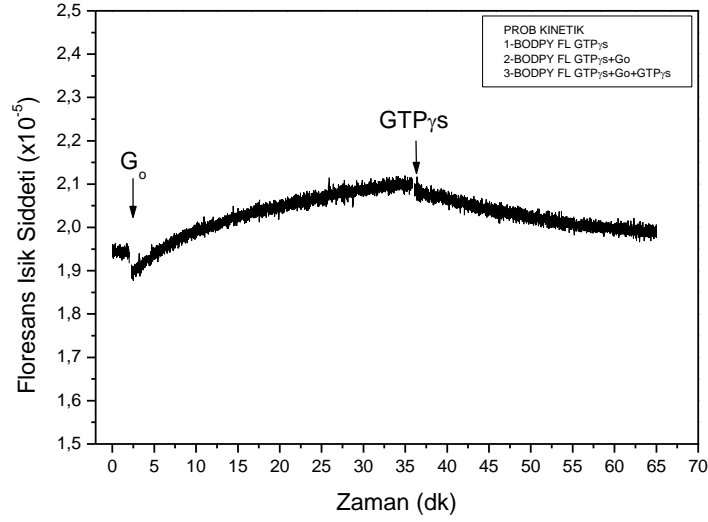
Tampon HEM'e 50 nM BODIPY FL-GTP γ S eklenerek uyarım ve yayılım spektrumlarının ölçümü alındı. Üzerine 400 nM G α eklendi ve 25°C'ta 30 dak. inkübe edildikten sonra ölçüm alındı. Bu karışımın üzerine 20 μ M GTP γ S eklendi ve 25°C'ta 20 dak. inkübe edildikten sonra yeni bir ölçüm alındı. G α , BODIPY FL-GTP γ S'in floresans şiddetini arttırdı. Ortama GTP γ S eklendiğinde floresans ışık şiddetinde azalma belirlendi (Şekil 6.23).



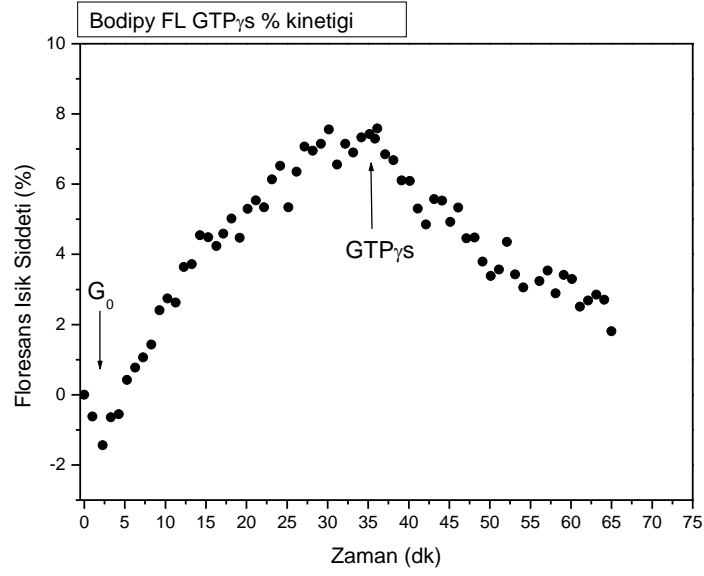
Şekil 6.23. BODIPY FL-GTP γ S'in floresans şiddetinin uyarım ve yayılım spektrumları. Yayılım spektrumu: BODIPY FL-GTP γ S(siyah) , BODIPY FL-GTP γ +G α (400 nM) (koyu mavi), BODIPY FL-GTP γ S+G α (400 nM)+1 μ M GTP γ S (turkuaz), uyarım spektrumu: BODIPY FL-GTP γ S(kırmızı) , BODIPY FL-GTP γ +G α (400 nM) (yeşil), BODIPY FL-GTP γ S+G α (400 nM)+1 μ M GTP γ S (sarı).

6.8.2. BODIPY FL-GTP γ S – G $_{\alpha}$ Proteininin Etkileşim Kinetiği

Tampon HEM'e 50nM BODIPY FL-GTP γ S eklenerek 2 dak. ölçüm alındı. 2 dakika sonra 400 nM G $_{\alpha}$ eklendi ve 35 dakika ölçüm alındı. Üzerine 20 μ M GTP γ S eklendi ve 30 dakika ölçüm alındı. G $_{\alpha}$ proteini eklendiğinde zamana bağımlı olarak floresans şiddetinde artış gözlemlenirken GTP γ S eklendiğinde bu artış geriye dönmektedir (Şekil 6.24, 6.25).



Şekil 6.24. BODIPY FL-GTP γ S – G $_{\alpha}$ proteininin etkileşim kinetiği. 50 nM BODIPY FL-GTP γ S ile 2 dakika ölçüm alındı. 2 dakika sonra 400 nM G $_{\alpha}$ eklendi ve 35 dakika ölçüm alındı. Üzerine 20 μ M GTP γ S eklendi ve 30 dakika ölçüm alındı.



Şekil 6.25. BODIPY FL-GTP γ S – G $_{0\alpha}$ proteininin etkileşim kinetiğinin yüzde artışı. 50 nM BODIPY FL-GTP γ S ile 2 dakika ölçüm alındı. 2 dakika sonra 400 nM G $_{0\alpha}$ eklendi ve 35 dakika ölçüm alındı. Üzerine 20 μ M GTP γ S eklendi ve 30 dakika ölçüm alındı.

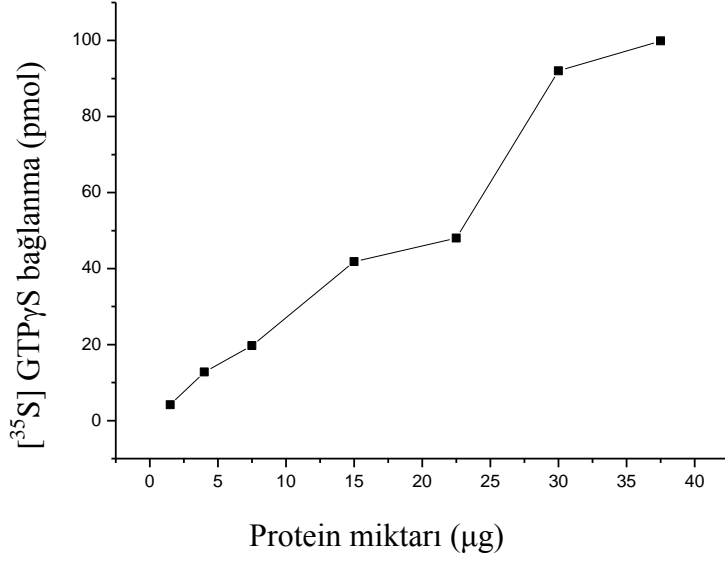
6.9. [35 S] GTP γ S Bağlama Testi Sonuçları

6.9.1. [35 S] GTP γ S Bağlama Etkinliğine Protein Derişimlerinin Etkisi

Saflaştırmanın çeşitli aşamalarından elde edilen protein kesimlerindeki guanin nükleotid bağlanma etkinliği GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu [35 S]GTP γ S varlığında saptandı.

Bağlanan GTP γ S miktarı %0.4 PPO içeren toluol sıvısı kullanılarak sıvı sintilasyon sayacı ile saptandı. Sayacın verimi %95 olarak belirlendi.

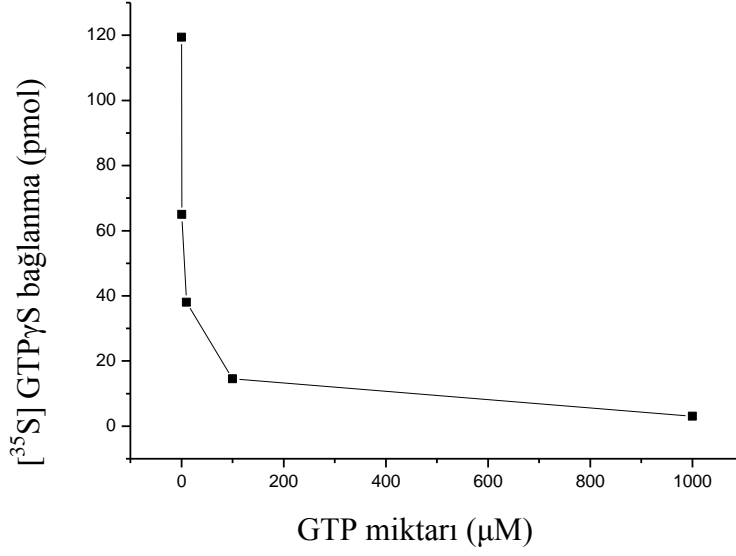
GTP γ S bağlanma etkinliğinin artan protein derişimleri ile arttığı belirlendi (Şekil 6.26).



Şekil 6.26. GTP γ S bağlanma etkinliğinin protein miktarına bağımlılığı. 300.000 cpm [35 S] GTP γ S içeren 60 μ l'lik tepkime karışımına artan miktarlarda G $_{\alpha}$ proteini eklendi.

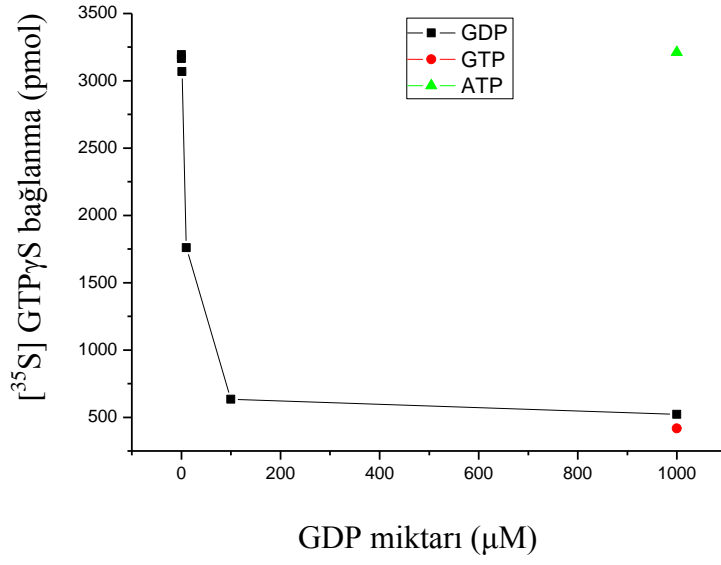
6.9.2. [³⁵S] GTP γ S Bağlama Etkinliğine Nükleotidlerin Etkisi

Tepkime karışımına artan derişimlerde (Derişimler sırasıyla; 1.5 μ g, 4 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g, 22.5 μ g, 30 μ g, 37.5 μ g). eklenen GTP'nin GTP γ S'in bağlanma etkinliğini azalttığı gözlemlendi (Şekil 6.27).



Şekil 6.27. GTP'nin GTP γ S bağlanma etkinliği üzerine etkisi. 300.000 cpm [³⁵S] GTP γ S içeren 60 μ l'lik tepkime karışımına artan miktarlarda GTP eklendi.

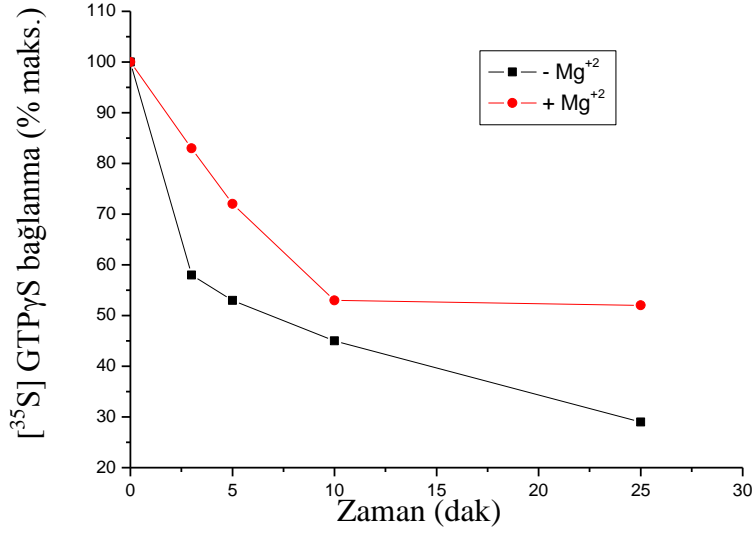
Tepkime karışımına artan derişimlerde eklenen GDP'nin GTP γ S'in bağlanma etkinliğini azalttığı gözlemlendi (Şekil 6.28). 1mM GTP konsantrasyonunda bağlanma etkinliği azalırken, 1mM ATP konsantrasyonunda bağlanma etkinliği değişmemektedir.



Şekil 6.28. GDP'nin GTPγS bağlanma etkinliği üzerine etkisi. 300.000 cpm [³⁵S] GTPγS içeren 60 μl'lik tepkime karışımına artan miktarlarda GDP eklendi. Ayrıca [³⁵S] GTPγS içeren 60 μl'lik tepkime karışımına 1mM GTP ve 1 mM ATP eklenererek ayrı ayrı ölçümler alındı.

6.9.3. Mg⁺²'un Goα Proteininden [³⁵S] GTPγS'in Ayrışmasına Etkisi

GTPγS bağlanma etkinliği Mg⁺² varlığında ve yokluğunda zamana bağlı olarak belirlendi (Şekil 6.29).



Şekil 6.29. Mg⁺²'un Goα proteininden [³⁵S]GTPγS'in ayrışmasına etkisi., 300.000 cpm, 1 µM [³⁵S] GTPγS içeren 60 µl'lik tepkime karışımı 10mM Mg⁺² varlığında ve yokluğunda, 20C°, 30 dakika inkübe edildikten sonra. 100µM GDP eklendi. Bağlanmış [³⁵S]GTPγS miktarı zamana bağımlı olarak belirlendi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rekombinant protein ekspresyon çalışmaları, protein yapı ve işlev çalışmaları açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmalarda yüksek derişimde ve saflıkta proteine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için de çalışılacak proteine özgü, verimi yüksek vektör sistemini tercih etmek gerekir.

Rekombinant G protein ekspresyonunda kullanılan ilk sistem Graziano ve arkadaşlarının kullandığı NpT7-5'dir (54). Bu sistemden elde edilen G_{sa} proteininin aktivasyonunun çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu vektör sisteminin ekspresyon seviyesi düşük olduğundan, yapı çalışmalarında kullanmak üzere daha yüksek ekspresyon düzeyine sahip vektör sistemleri araştırılmıştır. Lee ve arkadaşları pQE-6 ekspresyon vektörünü kullanmışlar ve G_{ia} , G_{oa} ve G_{sa} proteinleri için daha yüksek ekspresyon elde etmeyi başarmışlardır (55).

Labarotuarımızda daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda yüksek ekspresyon düzeyine sahip GST etiketli pGEX-4T2 ekspresyon sistemi kullanılmıştır (74). Bu vektör sistemiyle G_{oa} proteininin ekspresyonunu arttırmak mümkün olmakla birlikte çözünür protein elde edilememiştir. Çözünürlüğü arttırmak üzere yapılan çalışmalarda farklı sıcaklıklarda farklı IPTG konsantrasyonları ile indüklemeye yapılmıştır. Tüm koşullarda ekspresyon sisteminden çözünür protein eldesi mümkün olmamıştır. Proteinin inklüzyon cisimcikleri halinde zar kesiminde birikmekte olduğu gözlemlenmiştir. Bu inklüzyon cisimciklerinin saflaştırılması için yapılan deneylerde de çözünür protein eldesi mümkün olmamıştır.

Karşılaşılan bu sorunu gidermek üzere yeni bir ekspresyon sistemi arayışına girilmiştir. pQE vektörleri ile *E.Coli*'den yüksek seviyede protein ekspresyonu eldesi yanı sıra 6xHis etiketlerinin eklenmesi saflaştırmada avantajlar sağlamaktadır (52). Biz de çalışmamızda cis-lac^q genine sahip pQE80 vektör sistemini kullandık. Proteinin alt klonlanması gerçekleştirildikten sonra örnek dizi analizine gönderildi. Dizi'nin kontrolü sonucunda herhangi bir mutasyon belirlenmedi; böylece G_{oa} cDNA'sının pQE80 vektör sistemine klonlanmış olduğu doğrulandı.

Protein ekspresyon çalışmalarına küçük ölçekli kültürlerle başlandı. Farklı sıcaklık ve farklı IPTG koşullarında protein ekspresyon düzeyleri kontrol edilmiştir. Tüm koşullarda bir miktar çözümlü protein eldesi mümkün olmuştur. Yapılan SDS-PAGE gel analizleri sonucunda pQE80 vektör sisteminde 25°C’te, 1 mM IPTG ile gece boyu indükleme sonucunda en fazla çözümlü proteinin elde edildiği gözlemlendi. Bu sonuç Western emdirimi analizi ile de doğrulanmıştır. Küçük ölçekli ekspresyon deneyinden elde ettiğimiz bu olumlu sonuçla, büyük ölçekli ekspresyon deneylerine geçilmiş ve ardından saflaştırma çalışmalarına başlanmıştır. 4 litre kültürden 75 mg protein elde edilmiştir.

Çalışılan vektör sistemi proteine 6 tane histidin rezidüsü eklemektedir. Böylelikle, his-etiketli G_{α} proteini Ni-NTA afinite kromatografisi kullanarak saflaştırılabilmektedir. 6xHis etiketi diğer ilginlik etiketlerine göre çok fazla avantaj taşımaktadır. 6xHis etiketi diğer ilginlik etiketlerinden çok daha küçüktür ve fizyolojik pH’da yüksüzdür. 6xHis etiketi protein yapı ve fonksiyonunu etkilemez, sekresyonda etkili değildir ve uzaklaştırmak için proteaz kesimi gerekli değildir (51).

Yapılan G_{α} saflaştırma deneyleri sonucunda birkaç safsızlık dışında çözümlü saf protein eldesi mümkün olmuştur. Protein Sephadex G-100 kolonuna verilerek safsızlıkların bir bölümünden kurtulunabilmiştir.

Saflaştırılan G_{α} proteininin aktivitesini belirleyebilmek için proteinin [35 S] GTP γ S bağlama etkinliğine bakıldı. Protein miktarı arttıkça [35 S]GTP γ S bağlama etkinliğinin arttığı belirlendi. G_{α} proteininin [35 S]GTP γ S’i bağlamasının, adenin nükleotidlerden, ATP ile etkilenmediği, GTP ve GDP gibi guanin nükleotidleri ile özgün olarak inhibe olduğu belirlendi. [35 S]GTP γ S bağlanmasının ayrışma etkinliği Mg^{+2} varlığında ve yokluğunda zamana bağlı olarak belirlendi. Mg^{+2} varlığında nükleotidin ayrışması daha yavaş gerçekleşmektedir.

Proteinlerin nükleotid bağlanma bölgeleri triptofan rezidüleri içermektedir. Nükleotidin bağlanması ile bunlardan en az biri etkilenmektedir. G_{α} proteini 2 tane triptofan rezidüsü içermektedir. GTP bağlandığında proteininin floresans şiddeti

artmaktadır. G_{α} proteininin 212. pozisyonundaki triptofan nükleotid bağlanma paketine yakındır ve floresans sinyalinin sorumlu olma olasılığı yüksektir. Nükleotidin neden olduğu floresans değişimi proteindeki triptofanın toplam sayısı ile ters orantılıdır (70). G proteinlerine guanin nükleotid bağlandığında meydana gelen konformasyon değişikliği triptofan kalıntılarının floresans şiddetinde artışa neden olmaktadır. Meydana gelen bu floresans değişimleri nükleotid bağlanma kinetiğini ve GTP hidrolizini belirlemek için kullanılabilir (70, 71). G_{α} proteininin içsel floresansını belirlemek üzere yapılan floresans spektroskopik ölçümlerde G_{α} proteininin içsel floresansının GTP γ S eklenmesiyle arttığı, Mg^{+2} eklenmesiyle bu artışın yükseldiği belirlendi. GTP γ S eklenmesiyle gözlemlenen bu artış nükleotidin proteine bağlandığının bir göstergesidir. Mg^{+2} eklenmesi proteinde hızlı bir konformasyonel değişikliğe neden olmaktadır. Bu durumda floresans şiddetinde hızlı bir artış gerçekleşmektedir (70).

Yaptığımız kinetik çalışmalarda GTP γ S'in eklenmesi proteininin içsel floresansını zamanla doğru orantılı olarak arttırmıştır (70,71). Mg^{+2} eklenmesiyle floresans şiddetinde önce ani şiddetli bir artış, ardından kısa süreyle azalma ve daha sonra daha yavaş bir artış gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile uyumludur (65).

G_{α} 'nın içsel floresansına GTP'nin etkisini belirlemek üzere yapılan floresans ölçümlerinde GTP'nin proteininin içsel floresansını önce şiddetle düşürdüğü, daha sonra arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu şiddetli düşüş, Higashijima ve arkadaşlarının çalışmalarında da gözlemlenmiştir (63-65). Higashijima ve arkadaşları bu düşüşü eklenen nükleotidin floresans soğurma etkinliğine bağlamaktadırlar. Mg^{+2} içeren tepkime ortamına GTP'nin eklenmesiyle elde edilen floresans şiddetindeki hızlı artış, Mg^{+2} içermeyen ortama göre çok daha hızlı gerçekleşmektedir. G_{α} .GTP. Mg^{+2} , durağan durum konsantrasyonuna ulaştıktan sonra GDP'nin yüksek derişimlerinin eklenmesi ile bu floresans şiddetinin düştüğü belirlenmiştir. GTP'nin eklenmesiyle meydana gelen artış G_{α} .GTP. Mg^{+2} oluşumuna bağlıdır. Bu durumda yüksek derişimlerde GDP eklendiğinde gözlenen azalma, G_{α} .GTP. Mg^{+2} 'nin oluşumunun engellenmesi ve GTP'nin hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar rekombinant G_{α}

proteinin GTP bağlama etkinliğinin olduğunun bir göstergesidir. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Guanin nükleotid değişimi için eş zamanlı yapılan kayıtların eldesi hassas alet ve teknikler gerektirdiğinden oldukça zordur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda gerçek zamanlı ölçümler için floresans tekniklerin kullanılması yaygınlaşmıştır (72). BODIPY FL-GTP γ S probu bu işlev için kullanılan floresan işaretli bir GTP analogudur. Bu probun kullanılmasıyla yapılan floresans ölçümlerde, Go proteininin proba bağlanmasıyla floresans şiddetinde ani bir artışı gözlemlenmiştir. Bu artış, G $_{\alpha}$ proteininin GTP γ S ile etkileştiğinin bir göstergesidir. Ortama floresan işaretli olmayan GTP γ S eklediğinde, GTP γ S ile BODIPY FL-GTP γ S arasında yarışma nedeniyle, floresans şiddetinde düşüş gerçekleşmektedir (44,73). Elde edilen bu sonuç, Mcewen ve arkadaşlarının sonuçları ile uyum göstermektedir.

Dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Dinamik ışık saçılım spektroskopisi ölçümleri ile elde edilen sonuçlardan G $_{\alpha}$ proteininin 10 nm yarıçap büyüklüğünde ki parçacıkların çevresinde homojen tek bir dağılım göstermekte olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan pQE80 ekspresyon sistemiyle etkin ve yüksek saflıkta G $_{\alpha}$ proteinini eldesi mümkün olmuştur. Elde edilen proteinde bazı safsızlıklar mevcuttur. Protein yapı analizine gönderilmeden önce bu safsızlıkların giderilmesi gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Hepler J.R., Gilman A.G.: G-proteins. Trends in Biochemical Science,17: 383-387, 1992.
2. Hamm H.E., Rens-Domiano S.: Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. The FASEB Journal, 9: 1059-1069, 1995.
3. Gomberts B., Kramer I., Tatham P.: Signal transduction. Vol.4, s.71-77, Academic Press, Newyork, 2002.
4. Albert P.R., Robillard L.: G Protein specificity: Traffic direction required. Cellular Signaling, 14: 407-418, 2002.
5. Clapham D.E., Neer E.J.: G-protein $\beta\gamma$ subunits. Annual Review of Pharmalogical Toxicology, 37: 167-203, 1997.
6. Strittmatter S.M., Valenzuela D., Kennedy T.E., Neer E.J., Fishman M.C.: G_o is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. Nature, 344: 836-841, 1990.
7. Chen L.T., Gilman A.G., Kozasa T.: A candidate target for G protein action in brain. The Journal of Biological Chemistry, 274: 26931-26938, 1999.
8. Kato K., Asano T., Kamiya N., Haimoto H., Hosoda S., Nagasaka A., Ariyoshi Y., Ishiguro Y.: Production of the α -subunit of guanine nucleotide-binding G-protein G_o by neuroendocrine tumors. Cancer Research, 47: 5800-5805, 1987.
9. Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi S., Okamoto T., Murayama Y., Ogata E.: Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G_o . Nature, 362: 75-79, 1993.
10. Linder M.E., Gilman A.G.: Purification of recombinant $G_{i\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ proteins from *E.Coli*. Methods in Enzymology, 195: 202-215, 1991.
11. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W.: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology, 185: 60-89, 1990.
12. Gutkind J.S.: The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. The Journal of Biological Chemistry, 273: 1839-1842, 1998.

13. Preininger A.M., Hamm H.E.: G protein signaling: Insights from new structures. *Sciences Stke*, 218: 1-9, 2004.
14. Hann V., Chazot P.L.: G-proteins. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 15: 79-81, 2004.
15. Kristiansen K.: Molecular mechanism of ligand binding, signaling, and regulation of G protein coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology and Therapeutics*, 103: 21-80, 2004.
16. Morris A.J., Malbon C.: Physical regulation of G-protein-linked signaling. *Physiological Reviews*, 79: 1371-1429, 1999.
17. Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe J., Thomas T., Medkova M., Preininger A., Mazzaoni M.A., Hamm H.E.: Insights into G protein structure, function and regulation. *Endocrine Reviews*, 24: 765–781, 2003.
18. Itoh H., Kozosa T., Nagata S., Nakamura S., Katada T.: Molecular cloning and sequence determination of cDNA's for alpha subunits of the guanine-nucleotide binding proteins G_s , G_i , G_o from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 83: 3776-3780, 1986.
19. Meurs K.P.V., Angus W., Lavu S., Kung H., Czarnecki S., Moes J., Vaughan M.: Deduced aminoacid sequence of bovine retinal G_{α} : Similarities to other guanine nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 84: 3107-3111, 1987.
20. Nobles M., Benians A., Tinker A.: Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 102: 18706-18711, 2005.
21. Valenzuela D., Hans X., Mende U., Fankhauser C., Mashimo H., Huang P., Pfeiffer J., Neer E.J., Fishman M.C.: G_{α_o} is necessary for muscarinic regulation of Ca^{2+} channels in mouse heart. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 94: 1727-1732, 1997.
22. Jordan F.L.: Distribution and expression of G-protein in rat cerebral cortical cells. *Developmental Brain Research*, 67: 11-18, 1992.
23. Wettschureck N., Offermanns S.: Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85: 1159-1204, 2005.

24. Stanfield P.R., Nakajima S., Nakajima Y.: Constitutively active and G protein coupled inward rectifier K⁺ channels. Kir2.0 and Kir 3.0. *Review of Physiological Biochemical Pharmacology*, 145: 47-179, 2002.
25. Valenzuela D., Han X., Mende U., Fankhauser C., Mashimo H., Huang P., Pfeiffer J., Neer E.J., Fishman M.C.: G alpha(o) is necessary for muscarinic regulation of Ca²⁺ channels in mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 94: 1727-1732, 1997.
26. Dhingra A., Jiang M., Wang T.L., Lyubarsky A., SavchenkoA., Bar-Yehuda T., Sterling P., Birnbaumer L., Vardi N.: Light response of retinal on bipolar cells requires a spesific splice variant of Go_α. *The Journal of Neuroscience*, 22: 4878-4884, 2002.
27. Dhingra A., Lyubarsky A., Jiang M., Wang T.L., SavchenkoA., Pugh Jr., Birnbaumer L., Sterling P., Vardi N.: The light response of retinal on bipolar neurons requires Go_α. *The Journal of Neuroscience*, 20: 9053-9058, 2000.
28. Masu M., Iwakabe H., Tagawa Y., Miyoshi T., Yamashita M., Fukuda Y., Sasaki H., Hiroi K., Nakamura Y., Shigemoto R.: Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell*, 80: 757-765, 1995.
29. Wang S.S., Kazantzi V., Good T.A.: A kinetic analysis of the mechanism of beta-amyloid induced G protein activation. *Journal of Theoretical Biology*. 21: 269-278, 2003.
30. Brouillet E., Trembleau A., Galanaud D., Volovitch M., Bouillot C., Valenza C., Prochiantz A., Allinquant B.: The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *Journal of Neuroscience*, 19:1717-1727, 1999.
31. Jiang M., Spicher K., Boulay G., Wang Y., Birnbaumer L.: Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 98(6): 3577-3582, 2001.
32. Orun O.: A structural approach to G-protein signaling mechanisms: α-subunits. *Marmara Medical Journal*, 19: 10-14, 2006.
33. Masters, S. B., Miller,T., Chi, M.H., Chang, F.H., Beiderman, B., Lopez, N. C. Bourne. H. R. Mutations in the GTP-binding site of G_α,alter stimulationof adenylyl cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 15467-15474, 1994.

34. Tooze J, Branden C.: Introduction to protein structure. Vol.13, s.251-281, Garland Publishing, Inc., USA, 1999.
35. Denker B.M., Boutin P.M., Neer E.J.: Interactions between the amino- and carboxyl-terminal regions of G alpha subunits: analysis of mutated G alpha o/G alpha i2 chimeras. *Biochemistry*, 34: 5544-5553, 1995.
36. Stryer L.: Cyclic GMP cascade of vision. *Annual Review of Neuroscience*, 9: 87-119, 1986.
37. Iiri T., Herzmark P., Nakamoto J.M., Van Dop C., Bourne H.R.: Rapid GDP release from G α in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature*, 371: 164-168, 1994.
38. Posner B.A., Mixon M.B., Wall M.A., Sprang S.R., Gilman A.G.: The A326S mutant of G α 1 as an approximation of the receptor bound state. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 21752–21758, 1998.
39. Thomas T.C., Schmidt C.J., Neer E.J.: G-protein α subunit: mutation of conserved cysteines identifies a subunit contact surface and alters GDP affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10295–10298, 1993.
40. Marin E.P., Krishna A.G., Sakmar T.P.: Rapid activation of transducin by mutations distant from the nucleotide-binding site: evidence for a mechanistic model of receptor-catalyzed nucleotide exchange by G proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 27400–27405, 2001.
41. Remmers A.E., Engel C., Liu M., Neubig R.R.: Interdomain interactions regulate GDP release from heterotrimeric G proteins. *Biochemistry*, 38: 13795–13800, 1999.
42. Grishina G., Berlot C.H.: Mutations at the domain interface of G α impair receptor-mediated activation by altering receptor and guanine nucleotide binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 15053–15060, 1998.
43. Yang C.S., Skiba N.P., Mazzoni M.R., Hamm H.E. : Conformational changes at the carboxyl terminus of G α occur during G protein activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 2379–2385, 1999.
44. Cao Y., Huang Y.: Palmitoylation regulates GDP/GTP exchange of G protein by affecting the GTP-binding activity of G α . *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 637-644, 2005.

45. Wall M.A., Coleman D.E., Lee E., Iñiguez-Lluhi J.A., Posner B.A., Gilman A.G., Sprang S.R.: The structure of the G-protein heterotrimer $G_{i\alpha 1\beta 1\gamma 2}$. *Cell*, 83: 1047-1058, 1995.
46. Hamm H.E.: How activated receptors couple to G-proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 4819-4821, 2001.
47. Tesmer J.J., Sunahara R.K., Gilman A.G., Sprang S.R.: Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $G_{s\alpha}GTP\gamma S$. *Science*, 278: 1907-1916, 1997.
48. Berlot C.H., Bourne H.R.: Identification of effector-activating residues of $G_{s\alpha}$. *Cell*, 68: 911-922, 1992.
49. Osawa S., Dhanasekaran N., Woon C.W., Johnson G.L.: $G_{\alpha i}$ - $G_{\alpha s}$ chimeras define the function of a chain domains in control of G-protein activation and $\beta\gamma$ subunit complex interactions. *Cell*, 63: 697-706, 1999.
50. Slep K.C., Kercher W.H., Cowan C.W., Wensel T.G., Sigler P.B.: Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G-protein at 2.0 Å. *Nature*, 409: 1071-1077, 2001.
51. Stüber D., Bannwarth W., Pink J.R.L., Meloen R.H., Matile H.: New B cells epitopes in the plasmodium falciparum malaria circumsporozoite protein. *Eur. J. Immunol.*, 20: 819-824, 1990.
52. Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K.Jr.: Direct observation of the rotation of F_0F_1 -ATPase. *Nature*, 386: 299-305, 1997.
53. Graziano M.P., Casey P. J., Gilman A.G.: Expression of cDNA's for G proteins in *E.Coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 11375-11381, 1987.
54. Graziano M.P., Freissmuth M., Gilman A.G.: Expression of $G_{s\alpha}$ in *E.Coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 409-418, 1989.
55. Lee E., Linder M.E., Gilman A.G.: Expression of G protein α subunits in *E.Coli*. *Methods in Enzymology*, 237: 146-165, 1994.
56. Freifelder D: *Physical Biochemistry. Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, Absorption spectroscopy, Ch.14, s.377-382, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1976.

57. Bermek, E., Nurten, R., Tiryaki, D., Gökçe, S.: Biyofizik Ders Notları. Radyoaktivlik ve ışın biyofiziği, Basım 2, s.78-81, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 1997.
58. Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Introduction to fluorescence, Ch.1, s.1-11, Plenum Press, NewYork and London, 1986.
59. Demchenko A.P., Somogyi B., Galay J., Baysal K., Flenko A., Erçelen Ş.: Spectroscopy in Molecular and Cellular Biology. Principles of fluorescence spectroscopy, Lec.2, s.7-8, 1998.
60. Freifelder D.: Principles of Physical Chemistry with Applications to the Biological Sciences. Quantum mechanics and spectroscopy, Ch.17, 2nd Ed., s.639-643, Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston Portola Valley, 1982.
61. Demchenko A.P.: Ultraviolet Spectroscopy of proteins, Springer-Verlag, Berlin, s. 416-428, Heidelberg, NewYork, London, Paris, Tokyo., 1981.
62. Jameson E.E., Roof R.A., Whorton M.R., Mosberg H.I., Sunahara R. K., Neubig R.R., Kennedy R.T.: Real-time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. The Journal of Biological Chemistry, 280: 7712-7719, 2005.
63. Higashijima T., Ferguson K.M., Sternweis P.C., Ross E.M., Smigel M.D., Gilman A.G.: The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. The Journal of Biological Chemistry, 262: 752-756, 1987.
64. Higashijima T., Ferguson K.M., Smigel M.D., Gilman A.G.: The effect of GTP and Mg⁺² on the GTPase activity and the fluorescent properties of G_o. The Journal of Biological Chemistry, 262(2): 757-761, 1987.
65. Higashijima T., Ferguson K.M., Sternweis P.C., Smigel M.D., Gilman A.G.: Effects of Mg⁺² and the $\beta\gamma$ -subunit complex on interactions of guanine nucleotides with G proteins. The Journal of Biological Chemistry, 262: 762-766, 1987.
66. Demchenko A.P., Somogyi B., Baysal K., Flenko A., Erçelen Ş., Klymchenko A.: Spectroscopy in molecular and cellular biology. Instrumentation in light absorption and fluorescence spectroscopy, Lec.3, s.15-19, 1999.

67. Justice J.M., Bliziotes M., Stevens L. A., Moss J., Vaughan M.: Involvement of *N*-myristoylation in monoclonal antibody recognition sites on chimeric G protein α subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 6436-6439, 1995.
68. Lowry O., Rosebrough N.J., Farr, A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275, 1951.
69. Carty D.J., Iyengar R.: Guanosine 5'-O-(γ -Thio)triphosphate binding assay for solubilized G proteins. *Methods in Enzymology*, 237: 38-45, 1994.
70. Higashijima T., Ferguson K.M.: Tryptophan fluorescence of G proteins: analysis of guanine nucleotide binding and hydrolysis. *Methods in Enzymology*, 195: 321-328, 1991.
71. Cerione R.A.: Fluorescence assays for G-protein. *Methods in Enzymology*, 237: 409-423, 1994.
72. Mcewen D., Gee K.R., Kang H.C., Neubig R.: Fluorescence approaches to study G protein mechanisms. *Methods in Enzymology*, 344: 403-421, 2002.
73. Mcewen D., Gee K.R., Kang H.C., Neubig R.: Fluorescent BODIPY-GTP Analogs: Real time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Analytical Biochemistry* 291: 109-117, 2001.
74. Mega Tiber P., Nacar C., Orun O., Crossett B., Keith K., Brown K.A., Kan B. Attempts for proper folding of recombinant G α protein after inclusion body purification. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference 2-7 July 2005; Budapest, Hungary

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pınar MEGA TİBER

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul. 1974

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİMİ

1980 – 1984 : Deniz-İş İlköğretim Okulu

1984 – 1988 : Marmara Koleji

1988 – 1990 : Bilfen Koleji

1992 – 1997 : Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi
İngilizce Fizik Öğretmenliği

1997 - 2000 : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik A.B.D. Yüksek Lisans

2000 - : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik A.B.D. Doktora Programı

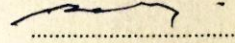


Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyofizik Anabilim Dalı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

İMZA

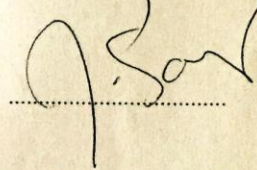
Tez Danışmanı : Prof.Dr.Beki KAN
Üniversitesi : Marmara



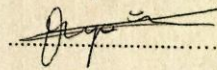
Üye : Prof.Dr. Rüstem NURTEN
Üniversitesi : İstanbul



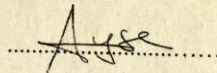
Üye : Prof.Dr.Zehra SAYERS
Üniversitesi : Sabancı



Üye : Yrd.Doç.Dr.Oya ORUN
Üniversitesi : Marmara



Üye : Yrd.Doç.Dr.Ayşe İ.GARİP
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2006 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür