

SIÇAN BEYİN G PROTEİNLERİNİN KARAKTERİZASYONU *

Hülya CABADAK, Beki KAN

Background and Design.- Heterotrimeric guanine nucleotide binding protein (G proteins) play a central role in regulation of signal transmission in the cell. G proteins which are localized in the inner surface of the cell membrane consist of α -, β - and γ - subunits. The α -subunit which binds guanine nucleotides (GTP and GDP) contains intrinsic GTPase activity. G proteins are divided into four families based on their α -subunits which confer their specificity: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ and $G\alpha_{12}$.

This study was designed to measure GTP binding activity and G protein expression in rat brain. Membrane extracts were prepared from whole brain and brain cortex. GTP binding activity in crude membrane fractions (P_{30}) and membrane extracts (S_{142}) was measured using [35 S] GTP γ S, the non-hydrolyzable analogue of GTP.

Conclusion.- We observed that [35 S] GTP γ S binding increased with time and with increasing amounts of membrane proteins. We also demonstrated that GTP γ S binding was strongly magnesium dependent and was maximum at 60mM $MgCl_2$ concentration. The presence of G protein α and $\beta\gamma$ subunits in whole brain and of $G\alpha_o$ and $G\alpha_i$ in brain cortex was shown by Western blot analysis.

Cabadak H, Kan B. Characterization of G proteins in rat brain. Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 200-205.

Hücreler birbirleriyle nörotransmitterler, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi çeşitli sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu moleküllere yanıt veren hücrelerin plazma zarlarında o moleküle özgü reseptörler bulunmaktadır. Hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzeyinde yerleşik G proteinleri, G protein kenetli reseptörler (GPCR) ile kenetlenerek pek çok hücre içi efektörler üzerinden sinyal iletimine aracılık etmektedir.^{1,2} G proteinlerinin yapısı, düşük yapılı canlılardan yüksek yapılı canlılara kadar iyi korunmuştur.³ G proteinleri ile kenetlenen reseptörler toplam hücre proteinlerinin %1-5'ini, memeli genomunun %1'ini oluşturmaktadır.^{3,4} G proteinleri adenilat siklazın uyarılması, fosfotidil inositol fosfatların hidrolizi ve iyon kanallarının fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır.¹ β adrenerjik ve çeşitli nöropeptid reseptörleri Gs proteini ile etkileşerek adenilat siklazı uyarmakta, muskarinik, somatostatin, α_2 adrenerjik ve opiate reseptörleri ise Gi proteini ile kenetlenerek adenilat siklazı inhibe etmektedir.² G proteinleri serotonin ile fosfolipaz C'nin uyarılmasına, γ aminobütirik asit ve serotonin reseptörleri ile potasyum kanallarının açılmasına ayrıca noradrenalin, γ aminobütirik asit ve somatostatin ile

voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının inhibisyonuna aracılık etmektedir.²⁻⁵

G proteinleri α , β , γ alt birimlerinden oluşmaktadır. Bu üç alt birimin her birini ayrı bir gen kodlamaktadır. α ve $\beta\gamma$ 'nin farklı alt tipleri belirlenmiştir. G protein süper ailesi, küçük monomerik ras benzeri ve heterotrimerik G proteinleri olmak üzere 2 büyük gruba ayrılır. Heterotrimerik G proteinlerin yapısal ve fonksiyonel sınıflandırılması α alt birimlerine göre yapılmıştır. $G\alpha$ 'nin 20'den fazla farklı alt tipi (39-52 kD), $G\beta$ 'nin 6 farklı alt tipi (~36 kD) ve $G\gamma$ 'nin 12 farklı alt tipi (6-9 kD) tanımlanmıştır.^{3,4} β ve γ alt birimleri sıkı kovalent bağlı olup monomer gibi hareket ederler.^{3,4} Memelilerde $G\alpha$; G_s , G_i , G_q ve G_{12} olmak üzere 4 büyük alt gruba ayrılmıştır. G_s ailesi G_s ve G_{olf} 'yi, G_i ailesi G_o ve G_z alt tiplerini G_q ailesi G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} ve G_{16} alt tiplerini, G_{12} ailesi G_{12} ve G_{13} alt tiplerini içermektedir. $G\alpha_i$ ve $G\alpha_o$ ailesinin üyeleri fosfolipaz C β 'nin ve iyon kanal aktivitesinin düzenlenmesinde rol almaktadır. $G\alpha_s$ ve $G\alpha_{olf}$ adenilat siklazı aktive eder. $G\alpha_q$ fosfolipaz C β 'nin düzenleyicisidir. $G\alpha_{12}$ fosfolipaz D'yi aktive etmektedir.³⁻⁵ Ayrıca $\beta\gamma$ dimerleri ile PI3K γ 'nin aktive olduğu bilinmektedir.^{6,7}

***Anahtar Kelimeler:** G proteinler, GTP bağlama, beyin; **Key Words:** G proteins, GTP binding, brain; **Alındığı Tarih:** 8 Ağustos 2005; Yrd. Dr. Hülya Cabadak, Prof. Dr. Beki Kan: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Tıbbiye Cad. No: 49 Haydarpaşa, İstanbul. **Yazışma Adresi (Address):** Yrd. Doç. Dr. Hülya Cabadak, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Tıbbiye Cad. No: 49 Haydarpaşa, İstanbul.

Heterotrimerik G proteinleri GTP bağlayan ve hidrolizleyen α , β ve γ alt birimlerinden oluşurlar. Ligandın reseptöre bağlanmasıyla reseptör G proteini ile etkileşir ve G proteinin α alt birimindeki GDP, GTP ile yer değiştirir. GTP'nin bağlanmasıyla α alt biriminin $\beta\gamma$ kompleksine olan ilgisi azalır. α alt birimi $\beta\gamma$ 'den ayrılarak aktif hale geçer. GTP bağlı α alt birimi ve $\beta\gamma$ dimer kompleksi farklı efektör proteinlerle etkileşmektedir.⁶⁻⁸ GTP, α alt biriminin GTPaz etkinliği ile GDP'ye hidrolizlenir. α alt birimi, $\beta\gamma$ alt birimleri ile tekrar birleşip aktif olmayan durumuna geri döner.^{4-6,8,9}

Bu çalışmada sıçan beyin ham zar (P_{30}) ve zar özüt (S_{142}) kesimlerinde GTP bağlama etkinliği incelendi; ayrıca Western emdirim analiz yöntemi ile sıçan beyin ham zar (P_{30}), zar özüt (S_{142}) kesimlerinde ve korteks bölgesinde G protein ekspresyonu belirlendi.

YÖNTEM ve GEREÇLER

Deneyler 8 adet sıçanın beyin dokusu kullanılarak yapılmıştır.

1. Sıçan Beyin Homojenatlarının Hazırlanması: Sıçan beyin dokusu çıkarıldıktan sonra 0°C 'de uygun homojenleştirme tamponu içine alındı. 1 gr beyin dokusu A çözeltisi (10mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8.0) ile kan ve miyelin tabakasından arındırıldıktan sonra B çözeltisi (10mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA pH 8.0, 300mM Sukroz, 0,1mM PMSF) içine alınarak Ultraturax (1000 devir/dak) da 4°C 'de homojenize edildi. Örnekler, 300 g'de 5 dak. santrüfuj edildikten sonra çökelek atıldı. Üst sıvı 30000 X g'de 30 dak. santrüfuj edildi. Çökelek (P_{30}) 0.2 mM PMSF içeren C çözeltisi (10mM Tris HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA pH 8.0, 300 mM sukroz) ile çözüldükten sonra 30000 X g'de 45 dak. santrüfuj edildi. Çökelek kesimi (P_{30}) TED tamponu (20 mM Tris-HCL pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0, 0.1mM PMSF, 1mM DTT) içine alınıp el poteri ile 3 kez homojenize edildi. %1 Na-dezoksikolat eklendi ve manyetik karıştırıcı ile 4°C 'de 30 dak. yavaşça karıştırıldıktan sonra 142000Xg'de 120 dak. santrüfuj edildi. Üst sıvı

(S_{142}) -70°C 'de saklandı.¹⁰ Zar kesimlerinde protein miktarı Lowry yöntemiyle belirlendi.¹¹

2. [^{35}S] GTP γ S Bağlama Testi: Sıçan beyin P_{30} ve S_{142} kesimlerinde guanin nükleotid bağlama etkinliği, GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu [^{35}S] GTP γ S varlığında belirlendi. 60 μl reaksiyon hacminde 25mM NaHepes pH 8.0, 30mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1mM DTT, 1 μM soğuk GTP γ S, GTP γ S (300000 sayım/dak) varlığında 30°C 'de 40 dak. inkübe edildi. Tepkime karışımına 2 ml 0°C yıkama tamponu eklendikten sonra, örnekler nitroselüloz filtrelelere (Millipore Tip HA, 0.45 μm) emdirildi; ve filtreler yıkama tamponu ile yıkandı. Filtre üzerinde tutulan radyoaktivite miktarı sıvı sintilasyon sayacında sayıldı.¹² Sintilasyon sayaç verimi %95 olarak belirlendi. Elde edilen sayım/dak değerleri fmol'e çevrildi. Özgün olmayan bağlanma 1mM GTP ile belirlendi.

3. Western Emdirim Yöntemi İle G Proteinlerin Saptanması: Sıçan beyin P_{30} ve S_{142} kesimlerinde bulunan proteinler SDS-gel elektroforezinde molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra elektroblot yöntemi ile nitroselüloz filtrelelere aktarıldı. Nitroselüloz filtre $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ antikorları ile ayrı ayrı etkileştirilip BCIP ve NBT substratları kullanılarak görüntüledi.^{13,14} Sıçan korteks zar kesimi G_o ve $G_{i1,2}$ antikorları ile etkileştirildi.^{15,16} Çalışmada kullanılan antikorlar Tablo I'de gösterilmektedir.

Tablo I. G protein antikorları

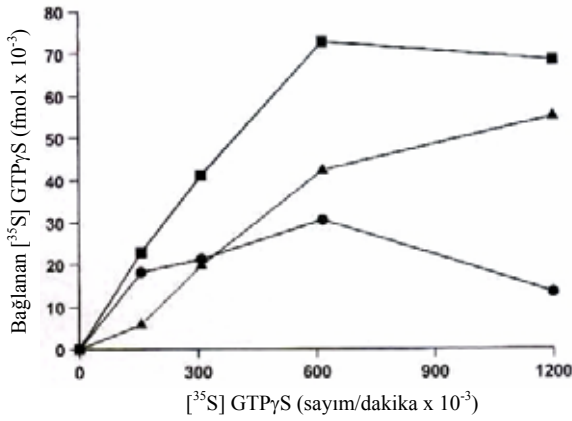
Antikor	Antijen	Etkileşim
P960	Sentetik peptit	$G\alpha$
S217	Sığır proteini	$G\beta\gamma$
GC/2	N-ucu peptidi	G_o
AS17	C-ucu peptidi	$G_{i1,2}$

BULGULAR

1. Sıçan Beyin Zar Kesimlerinde Guanin Nükleotid Bağlama Etkinliğinin İncelenmesi: Sıçan beyin dokusundan hazırlanan zar özütlerinde (P_{30} - S_{142}) guanin nükleotid bağla-

ma etkinliği GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu olan GTP γ S varlığında incelendi. 4 μ g beyin zar kesiminde, 40 dakikada bağlanan özgün GTP γ S miktarının 300.000 sayım/dak [35 S] GTP γ S varlığında yaklaşık 22.000 fmol, 600.000 sayım/dak [35 S] GTP γ S varlığında yaklaşık 45.000 fmol olduğu belirlendi. Sonraki deneylerde tepkime karışımına 300.000 sayım/dak [35 S] GTP γ S kullanıldı (Grafik 1).

Grafik 1. Sıçan beyin zar kesimlerinde GTP bağlama etkinliğinin [35 S] GTP γ S miktarına bağlılığı. 4 μ g protein içeren örnekler 2 μ M GTP γ S ve artan miktarlarda [35 S] GTP γ S ile 32°C'de 40 dak. inkübe edildi. Nitroselüloz filtrele bağlanan [35 S] GTP γ S miktarı fmol olarak belirlendi (■: Toplam; ●: GTP varlığında ▲: Spesifik).



GTP γ S bağlama etkinliğinin soğuk GTP varlığında doza bağımlı olarak inhibe olduğu saptandı (Grafik 2).

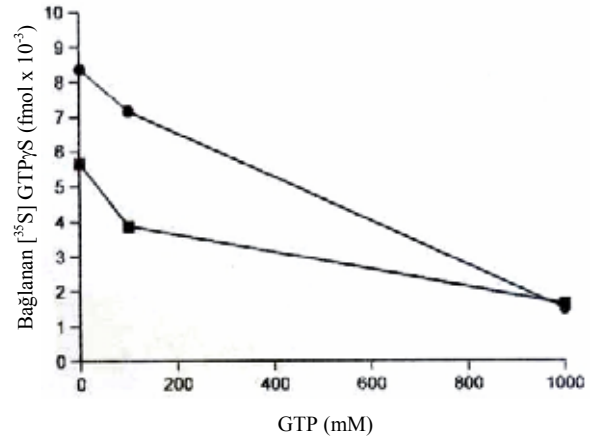
Sıçan beyin P₃₀ ve S₁₄₂ kesimlerinde GTP γ S bağlama etkinliğinin protein miktarı ile orantılı olarak artmakta olduğu saptandı (Grafik 3).

[35 S] GTP γ S bağlama etkinliğinin zar özüt kesiminde (S₁₄₂) 40 dak.'dan sonra doygunluğa eriştiği, ham zar kesiminde (P₃₀) ise 3 saat süreyle artmaya devam ettiği gözlemlendi. Aynı kesimlerinde GTP γ S bağlama kinetiği belirlendi (Grafik 4).

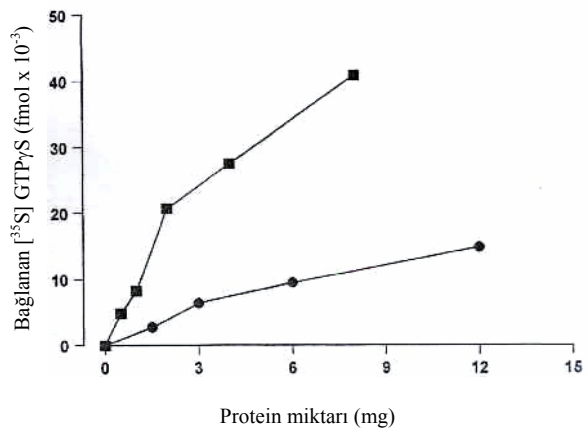
2. Western Emdirim Yöntemi ile G Proteinlerin Saptanması: Sıçan beyin homojenatlarından elde edilen beyin ham zar (P₃₀) ve zar

özüt (S₁₄₂) kesimlerindeki G proteinleri, G proteinlerine özgü antikorlar kullanılarak belirlendi. Resim 1'de P₉₆₀ antikorlarıyla etkileşen tüm G α alt birimleri ve S₂₁₇ antikoru ile etkileşen G $\beta\gamma$ alt birimleri görülmektedir.

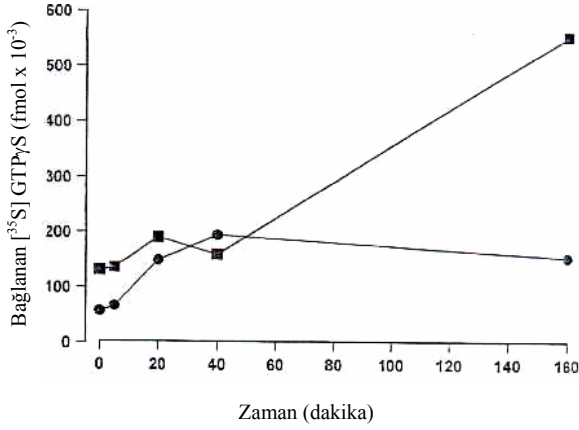
Grafik 2. GTP'nin beyin zar kesimlerinde [35 S] GTP γ S bağlama etkinliği üzerine etkisi. Sıçan beyininden hazırlanan ham zar (P₃₀) ve zar özüt (S₁₄₂) kesimlerinde GTP γ S bağlama tepkimesi 300.000 sayım/dak [35 S] GTP γ S içeren örneklerle 0.1-1mM GTP eklendikten sonra inkübasyon 32°C'de 40 dak. inkübe edildi (■: P₃₀; ●: S₁₄₂).



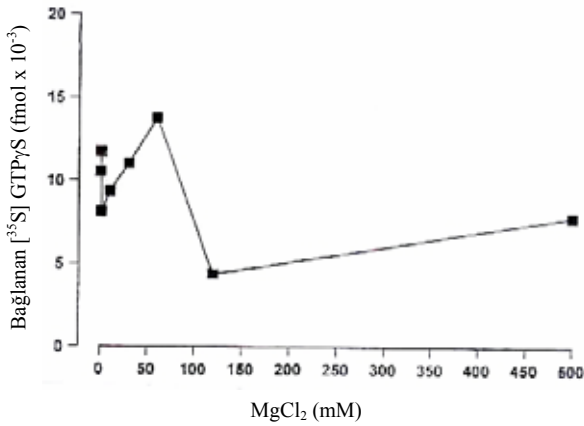
Grafik 3. Sıçan beyin ham zar (P₃₀) ve zar özüt (S₁₄₂) kesimlerinde [35 S] GTP γ S bağlama etkinliği derişim eğrisi. (0-8 μ g) protein içeren (P₃₀) ve (0-12 μ g) protein içeren (S₁₄₂) kesimleri, 300000 sayım/dak [35 S] GTP γ S içeren tepkime ortamında 32°C'de 40 dak. inkübe edildi (■: P₃₀; ●: S₁₄₂).



Grafik 4. Siçan beyin ham zar (P_{30}) ve zar özüt (S_{142}) kesimlerinde [35 S] GTP γ S bağlanma kinetiği. (P_{30}) ve (S_{142}) kesimleri, 300000 sayım/dak [35 S] GTP γ S içeren ortamda 32°C'de İnkübe edildi (■: P_{30} ; ●: S_{142}).



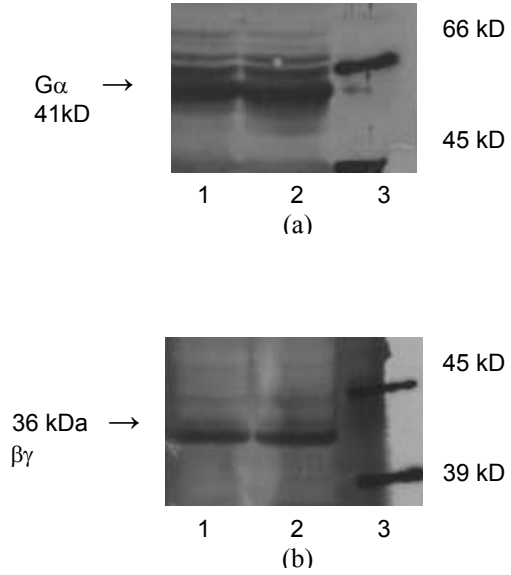
Grafik 5. Siçan beyin ham zar (P_{30}) kesimine [35 S] GTP γ S'in bağlanmasında Mg^{+2} 'un etkisi. 4 μ g protein içeren örnekler (0-500 mM) $MgCl_2$ varlığında 32°C' de 40 dak. inkübe edildi.



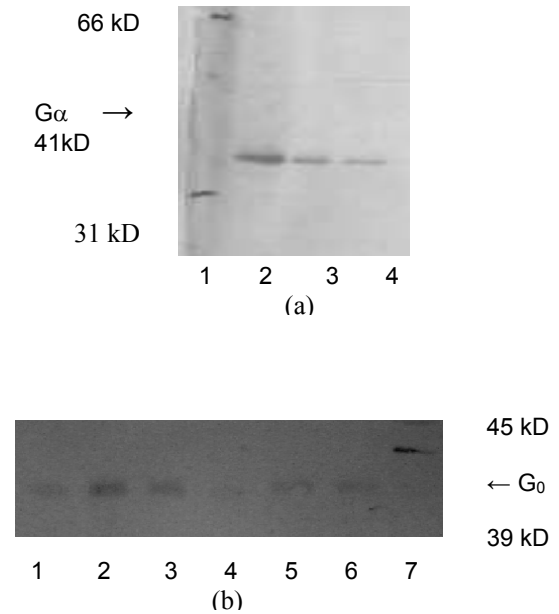
Magnezyumun GTP γ S bağlama etkinliğine etkisi incelendiğinde maksimum bağlamanın 60mM $MgCl_2$ varlığında olduğu belirlenmiştir (Grafik 5).

Beyin dokusundan korteks bölgesi ayrılarak zar özüt kesimleri hazırlandı ve bu kesimler $G\alpha_i$ ve $G\alpha_o$ alt birimlerine özgü antikorlarla etkileştirilerek bu proteinlerin varlığı gösterilmiştir (Resim 2).

Resim 1. Siçan beyin ham zar (P_{30}) ve zar özüt (S_{142}) kesimlerinin Western emdirme yöntemiyle belirlenmesi. a) P_{960} antikoru ile etkileştirilmesi. b) $G\beta\gamma$ alt birimlerine özgü S_{217} antikoru ile etkileştirilmesi (1- P_{30} , 2- S_{142} , 3- Molekül ağırlığı standartları).



Resim 2. Siçan beyin korteks bölgesinin $G\alpha_o$ antikoru ile etkileştirilmesi. a) 1- Molekül ağırlığı standartları, 2- 25 μ g, 3- 5 μ g, 4- 1 μ g zar kesimleri. b) $G\alpha_i$ antikoru ile etkileştirilmesi. 1- 5 μ g, 2-10 μ g, 3 -10 μ g, 4- boş, 5- 2.5 μ g, 6- 1.5 μ g, 7- Molekül ağırlığı standartları.



TARTIŞMA

Bu çalışmada, sıçan beyin ham zar (P_{30}) ve zar özüt (S_{142}) kesimlerinde G proteinlerin GTP bağlama etkinliğini ölçmek üzere optimum deney koşulları bulundu. GTP bağlama etkinliğinin, ortamda yüksek konsantrasyonda radyoaktif olmayan GTP ile inhibe olduğu belirlendi. Otto ve ark. sığır beyin zar özütlerinde radyoaktif olmayan GTP'nin GTP bağlama etkinliğini inhibe ettiğini göstermişlerdir.¹⁷ GTP bağlama etkinliğinin ham zar kesiminde (P_{30}) zar özütüne (S_{142}) göre daha yüksek olduğu saptandı. Zar G proteinleri dışında kalan protein sentezi elengasyon (uzama) faktörlerinin bu yükselmenin nedeni olabileceği düşünüldü. Farklı araştırmacılar Mg^{+2} iyonunun GTP bağlama tepkimesinde önemli rolü olduğunu bildirmiştir. Angela ve arkadaşlarının sıçan beyinde yaptığı bir çalışmada GTP bağlama etkinliğinin Mg^{+2} 'a bağımlı olduğunu belirtmektedir.¹⁸ Bu nedenle GTP bağlama tepkimesine 0-500mM Mg^{+2} 'un rolü incelendi ve 60 mM Mg^{+2} varlığında maksimum bağlanma saptanmıştır.

Sıçan beyin ham (P_{30}) ve saflaştırılmış zar özütlerinde (S_{142}) G proteinlere özgü antikoklarla α ve $\beta\gamma$ alt birimleri belirlenmiştir. Ayrıca sıçan beyin korteks bölgesinde $G\alpha_o$ antikoru ile $G\alpha_o$ 'nin varlığı ve $G\alpha_i$ 'ye özgü antikokla $G\alpha_i$ 'nin varlığı da belirlendi. Bulgularımız G_i ve G_o mRNA'larının varlığını korteks ve hipokampusta Northern emdirim yöntemi ile gösteren Brann ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyum göstermektedir.¹⁹

Sonuç olarak, bu çalışmada sıçan beyinde GTP bağlama etkinliğinin protein miktarına, zamana ve ortamdaki soğuk GTP miktarına bağlı olarak değiştiği ayrıca 60mM Mg^{+2} varlığında bağlanmanın maksimuma ulaştığı belirlendi. Western emdirim analizi ile sıçan beyin P_{30} , S_{142} kesimlerinde $G\alpha$ ve $\beta\gamma$ alt birimlerinin, sıçan korteks bölgesinde $G\alpha_o$ ve $G\alpha_i$ birimlerinin ekspresyonları saptanmıştır.

ÖZET

Heterotrimerik guanin nükleotit bağlayan proteinler (G proteinler) hücre sinyal iletiminde önemli rol oynamaktadır. Hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzeyinde yerleşik G proteinleri α , β , γ alt birimlerinden oluşmaktadır. α alt birimi guanin nükleotit (GTP ve GDP) bağlama ve GTP'yi hidrolizleme (GTPaz) etkinliğine sahiptir. G proteinleri özgünlüklerini belirleyen α alt birimine göre G_s, G_i, G_q ve G_{12} olmak üzere 4 büyük alt gruba ayrılmıştır.

Bu çalışmada sıçan beyinde GTP bağlama etkinliğini ölçmek için uygun koşullar belirlendi. Sıçan beyinden hazırlanan ham zar (P_{30}) ve zar özüt (S_{142}) kesimlerinde GTP bağlama etkinliği GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu [^{35}S] GTP γ S ile ölçüldü. GTP γ S bağlama etkinliğinin zamana ve protein derişimine bağlı olarak arttığı ve 60mM $MgCl_2$ varlığında maksimum olduğu saptanmıştır. Western emdirim yöntemi kullanılarak beyinde $G\alpha$ ve $\beta\gamma$ altbirimleri, beyin korteksinde $G\alpha_o$ ve $G\alpha_i$ proteinlerinin ekspresyonları gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Morris A, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological Reviews* 1999; 79: 1373-1430.
2. Vaughan M. Signalling by heterotrimeric G proteins Minireview Series. *J.Biol.Chem.* 1996; 273: 667-672.
3. Gilman AG. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 615-649.
4. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 2003; 99: 25- 44.
5. Mesters JR, Hogg T, Hilgenfeld R. G Proteins. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001; 1-6.
6. Milligan G. Signal sorting by G-protein-linked receptors. *Adv. Pharmacol.* 1995; 32: 1-29.
7. Chen J, Iyengar R. Inhibition of cloned adenylyl cyclases by mutant-activated G_i -alpha and specific suppression of type 2 adenylyl cyclase inhibition by phorbol ester treatment. *J.Biol.Chem.* 1993; 267: 12253-12256.
8. Nathanson NM. Muscarinic acetylcholine receptors. *Encyclopedia of Life Sci.* 2001; 1-6,

9. Milligan G, White JH. Protein-protein interactions at G - protein coupled receptors. Trends in Pharmacol. Sci. 2001; 22: 513-518.
10. Hulme EC. Interaction of muscarinic acetylcholine receptors with G proteins. In Receptor-Effector Coupling, A Practical approach, Oxford, IRL press, 1990; 1-100.
11. Lowry O, Rosebrough H, Farr AI, Randall RJ .Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
12. Northrup JK, Smigel MD, Gilman AG. The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 1982; 257: 11416-11423.
13. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head + of bacteriophage T₄. Nature 1970; 227: 364-365.
14. Mumby SM, Gilman AG. Synthetic peptide antisera with determined specificity for G- protein α or β subunits. Johnson, R.A., Corbin, JD. (Ed): In Methods. Enzymol. Sandiego Academic Press, 1991; 195: 215-223.
15. Homburger V, Brabet P, Audigier Y, Pantaloni C, Bockaert J, Rouot P. Immunological localization of the GTP binding protein Go in different tissues of vertebrates and invertebrates. Mol. Pharmacol 1987; 31: 313-319.
16. Grant KR, Harnett MM, Milligan G, Harnett W. Characterization of heterotrimeric G-proteins in adult *Acanthocheilonema vitae*. Biochem J. 1996; 320: 459-466.
17. Otto H, Buchner K, Beckmann R, Hilbert R and Hucho F. GTP-binding proteins in bovine brain nuclear membranes. Neurochem.Int. 1992; 21: 409-414.
18. Angela G-J, Richard CF, Bengt W and Johan F. Autoradiographic Characterisation of [³⁵S] GTP γ S Binding Sites in Rat Brain. Neurochem. Res. 1997; 22, 8: 1055-1063.
19. Brann MR, Collins RM, Spiegel A. Localization of mRNAs encoding the α subunits of signal-transducing G proteins within rat brain and among peripheral tissues. FEBS Letters 1987; 222: 191-198.

Teşekkür: P960 ve S217 antikorları Prof. Alfred Gilman tarafından hediye edilmiştir. AS17 antikorunu TÜBİTAK SBAG-1710 No'lu projeden sağlanmıştır.