

79536

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**G proteinlerine kenetli reseptörlerde, reseptör-G proteini
kenetinin sinyal transdüksiyon verimi bakımından
incelenmesi**

Dr. Kemal SAYAR

**FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ogun ONARAN

79536

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA, 1999



Bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımcı olan tez danışmanım Doç. Dr. Ogun Onaran'a, Doç. Dr. Hakan Gürdal'a, Dr. Özlem Uėur'a, CHO hücre klonlarını sağlayan Dr. Tommaso Costa'ya ve diğer farmakoloji Anabilim dalı ėretim üyelerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. ARAÇ VE YÖNTEMLER	10
2.1. Kimyasal Maddeler.....	10
2.2. Yöntemler	10
2.2.1. Hücre Kültürü	10
2.2.2. Membranların Hazırlanması	11
2.2.3. ScTMEcAMP İyotlanması.....	12
2.2.4. Pindolol'ün İyotlanması ve Saflaştırılması	13
2.2.5. İmmünoelot	17
2.2.6. cAMP ölçümü	18
2.2.7. Adenilatsiklaz Deneyleri	18
2.2.8. Adenilat Siklaz Aktivitesinin Termal İnaktivasyonu Deneyleri	19
2.2.9. Bağlanma Deneyleri.....	20
2.2.10. Tersinmez Antagonist Uygulaması.....	20
2.3. Analiz Yöntemleri	20
3. BULGULAR	22
3.1. Aynı Tür G Proteini Kullanan Reseptörlerde G proteinlerinin Paylaşımı	22
3.2. R-G Etkileşmesinin Ayrıntıları.....	26
3.3. Adenilat Siklazın Aktivasyon Durumu İle Termal İnaktivasyonu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.....	31
4. TARTIŞMA	37
4.1. Fonksiyonel Düzeyde Karşılıklı Etkileşim	37
4.2. Bağlanma Düzeyinde Çapraz Etkileşim.....	39
4.3. R-G Etkileşmesinin Ayrıntıları.....	41
4.4. CHO Hücrelerindeki β -Adrenerjik Reseptör-Gs-Adenilat Siklaz Sistemindeki Aktivasyon Mekanizmasının İncelenmesi	43
4.5. Adenilat Siklazın Aktivasyon Durumu İle Termal İnaktivasyonu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.....	45
5. SONUÇLAR	51
ÖZET	53
SUMMARY	55
KAYNAKLAR	57

1. GİRİŞ

G proteini aracılı sinyal ileti sistemi, hücre dışından hücre içine sinyal iletmekte kullanılan yapılar içinde en yaygın olanıdır. Bir çok hormon, nörotransmitter, kemokin, lokal mediyatör ve duyu uyarını gibi hücre içine giremeyen uyarın, hücre üzerindeki etkilerini hücre membranında yerleşmiş olan G proteinlerine kenetli reseptörlere bağlanarak ortaya çıkarır.

Bu sinyal ileti sistemi en az üç farklı işlevsel birimden oluşmaktadır:

1) Reseptör: Amino terminalleri hücre dışında, karboksi terminalleri hücre içinde kalacak şekilde membranı yedi kez alfa helikslerle geçen 400-600 amino asitlik glikoproteinlerdir. G proteinine kenetli reseptörler hücre dışına bakan kısımları ile ligandları bağlarlar ve hücre içine bakan kısımları ile bu sinyali kendileri ile ilişkili G proteinlerine iletirler. Yüzden fazla bu türden reseptör bilinmektedir. Bu reseptörler, fonksiyonel olarak ve ligandları açısından bir çok farklılıklar gösteren, fakat yapıları ve aktivasyon mekanizmaları birbirine benzeyen, büyük bir reseptör ailesi oluştururlar. Bu reseptörlere örnek olarak, retinada bulunan ve ışığın algılanmasından sorumlu rodopsin reseptörü, koku reseptörleri, adrenerjik , histaminerjik ve serotonerjik reseptörler gibi küçük biyojenik amin ligandlarla aktive olan reseptörler, bradikinin ve substans P gibi peptidlerle aktive olan reseptörler ve lüteinize edici hormon veya paratiroid hormonu gibi büyük glikoprotein hormonlarla aktive olan reseptörler verilebilir (Dohlman ve ark., 1991; Fraser, 1991; Bourne, 1998).

2) G proteini: Efektörlerin aktivasyonunda reseptörlere aracılık eden heterotrimerik proteinlerdir. Bir alfa ($G\alpha$) ve birbirlerine sıkı bir şekilde tutunmuş olan bir beta ve bir gama alt ünitelerinden ($G\beta\gamma$) oluşur. G proteininin $G\alpha$ alt ünitesi üzerinde guanin nükleotidlerinin bağlanabildiği bir bağlanma bölgesi vardır. Buraya bağlı nükleotidin türü G proteininin aktivasyon durumunu belirler. GDP ve benzeri inhibitör nükleotidler bağlı iken $G\alpha$ alt ünitesinin $G\beta\gamma$ 'ya afinitesi yüksektir ve G proteini inaktif heterotrimer halinde bulunur. Bu bölgeye GTP ve benzeri aktive edici guanin nükleotidlerin bağlanması halinde $G\alpha$ alt ünitesinin $G\beta\gamma$ 'ya afinitesi azalır ve heterotrimer aktif $G\alpha$ -GTP ve $G\beta\gamma$ olmak üzere iki kısma ayrılır. Bu ayrılan

alt birimler efektörlerin işlevlerini düzenlemekten sorumludurlar. İnhibitör nükleotid GDP'nin aktivatör nükleotid GTP ile yer değiştirmesi reseptör tarafından kontrol edilir. G proteininin aktivasyonunda hız kısıtlayıcı basamağın GDP'nin alfa alt ünitesinden disosiyasyon hızı olduğu düşünülmektedir. Aktif durumdaki reseptörün G proteini ile etkileşmesi, GDP'nin disosiyasyonunu hızlandırarak GTP'nin GDP ile yer değiştirmesini sağlar ve böylece G proteinini aktif hale getirir. G proteininin inaktivasyonu, G α 'nın GTPaz aktivitesi ile GTP'nin GDP'ye dönüşmesi ve G α ile G $\beta\gamma$ 'nın yeniden biraraya gelmesi ile gerçekleşir. Şimdiye kadar 20 α , 6 β ve 12 γ alt ünitesi saptanmıştır (Gilman, 1987; Birnbaumer, 1990a).

3) Efektör: Aktiviteleri kendilerine bağlanan G α -GTP veya G $\beta\gamma$ aracılığı ile düzenlenen enzim veya iyon kanallarıdır. Aktiviteleri G proteinlerine kenetli reseptörler tarafından düzenlenen bu efektörlere şunlar örnek olarak verilebilir: Adenilat siklaz, fosfolipaz C, A, ve D, cGMP spesifik fosfodiesteraz, çeşitli kalsiyum ve potasyum kanalları (Birnbaumer ve ark., 1990b).

Agonist ligandın reseptöre bağlanması ile efektör molekülün aktif hale gelmesi arasındaki ilişkiyi açıklamak için çeşitli aktivasyon modelleri ileri sürülmüştür. Günümüzde "ternary complex" modeli (TCM) (Deléan ve ark., 1980) ile "Collision coupling" modeli (CCM) (Tolkovsky ve Levitzki, 1978) ve bunların çeşitli varyantları, deneysel sonuçları açıklamak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

TCM benzeri denge modellerinde sistemi oluşturan bileşenler (ligand, reseptör, G α , G $\beta\gamma$, guanin nükleotidler ve efektör gibi) arasında allosterik bir denge durumu vardır. Agonist ligandlar, reseptörün G proteinine olan afinitesini arttırarak sistemi sonuçta aktif duruma getirirler. Yalın TCM olarak bilinen bu model, bağlanma çalışmalarında guanin nükleotidsiz ortamda, agonist ligandlarla aynı reseptör için yüksek ve düşük afiniteli iki farklı bağlanma bölgesinin gözlenmesini açıklayabilmektedir. Bu durumda düşük afiniteli bağlanma bölgesi çıplak reseptörü, yüksek afiniteli bağlanma bölgesi reseptör-G proteini kompleksini temsil etmektedir. Bu model reseptör-G proteini düzeyinde herhangi bir stokiyometrik sinyal amplifikasyonu öngörmemektedir.

CCM'de Reseptör ve G protein arasındaki ilişki katalitik olarak düşünülmektedir. Agonist bağlı yani aktif durumdaki reseptör birden fazla G proteini ile ardışık olarak etkileşerek GDP ile GTP'nin yer değiştirmesine yol açar. G proteininin bir kere aktive olduktan sonraki kaderi reseptörün aktivite durumundan bağımsızdır ve sadece G proteininin GTPaz hızına bağımlıdır. Bu model Reseptör-G proteini düzeyinde stokiyometrik sinyal amplifikasyonu öngörmektedir.

Her iki model de orjinal formlarında, Reseptör, G proteini ve efektörü membranda serbest olarak hareket edebilen ve etkileşimlerinin spesifikliği sadece protein-protein etkileşmesinden kaynaklanan bileşenler olarak görülür (Jacobs ve Cuatrecasas, 1976; Tolkovsky ve Levitzki, 1978). Fakat bir çok farklı yöntemle gerçekleştirilen deneyler, G proteinine kenetli sinyal ileti sisteminin hücre membranında organize bir yapı halinde bulunduğunu ve etkileşimlerin spesifikliğinden kısmen sistemi oluşturan elemanların membrandaki hareketlerinin kısıtlı olmasının sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Neubig, 1994). Bu deneyler iki ana başlık altında toplanabilir. Birinci grup, sistemi oluşturan elemanların dolaysız gözlemine dayanırken, ikinci grup deneyler dolaylı fonksiyonel gözlemlere dayanmaktadır.

A) Dolaysız gözleme dayanan yöntemler

1. Hedef büyüklüğü analizi (Target size analysis): Radyasyon inaktivasyonuna duyarlılığın işlevsel sistemin büyüklüğünün artmasıyla artması ilkesine dayanır. Eğer sistemi oluşturan parçacıklar birbirleriyle veya diğer membran elemanları ile birleşip büyük molekül yığınları oluşturursa radyoaktif parçacığın bu moleküllerden herhangi birine çarpması, enerji moleküller arasında transfer edileceği için, bütün bir yığının inaktivasyonu ile sonuçlanır. Eğer sistemi oluşturan parçacıklar böyle yığınlar oluşturmuyorsa herbirinin inaktivasyonu diğerlerinden bağımsız olacağı için inaktivasyon daha yavaş olacaktır. Glukagon reseptör-Gs-adenilat siklaz sisteminde Schlegel ve arkadaşları (1979) bu yöntem ile sistemi oluşturan parçacıkların monomerler halinde olmayıp moleküler ağırlıkları 1 milyonu aşan kompleksler halinde bulunduğunu göstermişlerdir.

2. İmmünohistokimyasal yöntemlerle reseptörler ve G proteinleri görülebilir hale getirildiğinde bunların membranda rastgele dağılmayıp kümeler halinde bulunduğu gözlenmiştir (von Zastrow ve ark., 1993; Wang ve ark., 1989).

3. FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) ölçümleri: Membrandaki hareketi gözlenmek istenen floresansla işaretlenmiş sistem elemanının, membranın küçük bir bölgesindeki floresansın yoğun bir lazer ışını ile söndürülmesinden sonra, bu bölgeye difüzyonla geri dönmesinin ölçülmesine dayanır. Eğer gözlenen yapı, membranda tamamen serbest olarak hareket edebiliyorsa, söndürülen bölgedeki floresans yoğunluğunun eski düzeyine dönmesi gereklidir. Bu yöntemle aynı zamanda proteinlerin membrandaki difüzyon hızlarında ölçülebilir. G proteinlerine kenetli reseptörlerde ve G proteinlerinin $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ alt ünitelerinde yapılan gözlemlerde ise floresansın tam olarak geri dönmediği ve difüzyon hızının yapay membranlardakine göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir (Neubig, 1994; Henis ve ark., 1982).

4. G proteinlerine kenetli reseptörlerin ve G proteinlerinin hücre iskeleti ve membranda bulunan kaveola yapıları ile yakın bir ilişkide bulunduğu biyokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir (Rasnick ve ark., 1990; Huang ve ark., 1997).

B) Dolaylı fonksiyonel gözleme dayanan deneyler.

1. Yanıt düzeyinde farklı reseptörlerin ortak bir G proteini ve efektör havuzunu kullanıp kullanmadığını inceleyen çalışmalar: Bu çalışmalarda farklı reseptörler aracılığı ile ortaya çıkan yanıtların aditif olup olmadığına bakılarak sistemin membrandaki organizasyonu hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Bu tür deneylerin varsayımı şudur, eğer her reseptörün diğer reseptörlerin ulaşamayacağı farklı bir G proteini ve efektör havuzu var ise iki farklı reseptörün aynı anda uyarılması ile elde edilecek yanıtlar, her bir sinyal ileti sistemi birbirinden tamamen bağımsız olduğu için, her bir reseptörün tek başına uyarılmasıyla elde edilecek yanıtların toplamına eşit olacaktır. Buna karşın, eğer farklı reseptörler ortak bir G proteini ve efektör havuzunu kullanıyor ve paylaşılan bu ortak havuz sistemin maksimum yanıtında sınırlayıcı ise, farklı reseptörlerin aynı anda uyarılması ile elde edilen yanıt reseptörlerin tek başlarına uyarılması ile elde edilen yanıtların toplamından daha az olacaktır. Literatürde farklı hücre ve dokularda yapılmış her iki

durumuda destekleyebilecek çalışmalar vardır. Ortak bir havuzu düşündüren çalışmalar için Birnbaumer ve ark., (1970) ve Houslay ve ark., (1986), farklı havuzları düşündüren bir çalışma için Simmons ve Mather, (1991) örnek olarak verilebilir.

2. Bağlanma çalışmaları ile farklı reseptörlerin ortak bir G proteini havuzu kullanıp kullanmadığını inceleyen çalışmalar: TCM'e göre G proteini ve agonist ligandlar reseptöre pozitif kooperatif olarak bağlanır. Yani bunlardan birinin reseptöre bağlı olması diğerinin bağlanma afinitesini artırır. Bu durum G proteinlerine kenetli reseptörlerde gözlenen yüksek ve düşük afiniteli bağlanma bölgelerini açıklamak için kullanılmaktadır. Bu durumda oluşacak yüksek afiniteli bağlanma bölgelerinin miktarı G proteininin reseptör çevresindeki lokal konsantrasyonuna bağlı olacaktır. G proteini konsantrasyonunun kısıtlayıcı olduğu durumlarda, eğer iki farklı reseptör aynı G proteini havuzunu kullanıyorsa, bir reseptörün agonistle bağlanması serbest G proteinlerinin bir kısmının bu reseptöre bağlanmasına yol açar ve ikinci reseptörün bağlayabileceği serbest G proteini konsantrasyonu azalır. Bu durum agonist bağlanmasında yüksek afiniteli bağlanma bölgesinin azalması şeklinde gözlenecektir. Ortak bir havuzu düşündüren bir çalışma için Dasso ve Taylor, (1992), farklı havuzları düşündüren bir çalışma için Graeser ve Neubig, (1993) örnek olarak verilebilir.

3. Reseptör-G proteini etkileşiminin spesifikliğı sağlam hücrelerde (Kleuss ve ark., 1991), yapay veziküllere (Rubenstein ve ark., 1991) göre daha fazladır.

Bu çalışmalar göstermektedir ki, sinyal ileti birimlerinin membranın bütünündeki konsantrasyonlarından yola çıkarak aktivasyon modelinin parametreleri hakkında tahminde bulunmak yanıltıcı olabilir. Yani aktivasyonun ortaya çıktığı, lokal membran bölgesindeki reseptör-G proteini-efektör stokiometrisi total membran sitokiometrisinden farklı olabilir. Bu durum incelenen sinyal ileti sisteminde geçerli olan aktivasyon modelinin test edilmesinde önem taşıyabilir.

Reseptör, G proteini ve efektörden oluşan bir sinyal iletim sistemi üzerinde çalışılırken göz önüne alınması gereken diğer bir durum sistemi oluşturan alt birimlerin bireysel aktivasyon durumları ve çeşitli faktörlerin bu durumlara etkisidir. Herhangi bir sistem elemanının aktivasyon durumu kendi içsel özellikleri ve diğer sistem birimleri ile etkileşmesi ile belirlenir. Bu diğer sistem

birimleri reseptör, G proteini ve efektör gibi büyük proteinler olabileceği gibi reseptöre bağlanan ligandlar ve G proteinine bağlanan guanin nükleotidler gibi küçük moleküller de olabilir. Ayrıca birimlerin her hangi bir uyarana olmaksızın bir bazal aktiviteye sahip olup olmamasıda göz önüne alınması gereken önemli bir faktördür.

Bir proteinin aktivasyon durumu hakkında iki uç durum düşünülebilir. Birincisinde, protein aktif ve inaktif olmak üzere iki durumdan sadece birinde bulunabilir. Bu durumda, proteinin aktif hale gelmesi, proteinle etkileşen diğer birimlerin proteinin aktif durumunu inaktif durumu aleyhine seçmesi sonucu ortaya çıkar. Bu görüşü destekleyen en önemli gözlemler iyon kanallarının açık (aktif) ve kapalı (inaktif) durumlarının doğrudan elektrofizyolojik yöntemlerle gözlenebilmesine dayanmaktadır. Bu gözlemlerde iyon kanalının sadece açık ve kapalı olmak üzere iki durumu izlenebilmekte ve çoğunlukla ara durumlar izlenememektedir. Kanalın aktivasyonu kanalın açık olarak bulunma olasılığının artması ile gerçekleşmektedir (Colquhoun ve Hawkes, 1983). G proteini aracılı sinyal ileti sistemlerinde deneysel yöntemlerin zaman çözünürlüğü kanallarla kıyaslandığında çok kötü olduğu için bu gözlemleri bu sistemlerde yapmak mümkün olmamaktadır. Bu görüşün tercih edilmesinin önemli bir nedeni de matamatiksel olarak modellenmesinin göreceli olarak daha kolay olmasıdır. İkinci durum, protein gibi karmaşık mikroskopik yapıların termal ajitasyon nedeniyle pratik olarak sonsuza yakın mikroskopik durumda bulunabilmesine dayanmaktadır. Bu durumda proteinin aktivasyon durumu bu mikroskopik durumların bir dağılımı ile temsil edilebilir (Onaran ve Costa, 1997). Aktive edici ligandlar bu dağılımı değiştirerek etki gösterirler. Her iki durum yeterince makroskopik olarak bakıldığında birbirlerinden ayırt edilemezler fakat ikinci durumda deney yapan kişinin gözlemsel çözünürlüğü arttıkça birbirlerinden ayrı olarak tanımlanabilecek durum sayısı artar.

Proteinin aktif ve inaktif durumu birçok fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından farklılıklar gösterebilir ve bu farklılıklar farklı aktivasyon durumlarını desteklemek için delil olarak kullanılabilirler. Bunlara örnek olarak şunlar verilebilir: proteinin kristalografik olarak izlenen mikroskopik yapısında değişiklikler olabilir, termal veya kimyasal maddelerle olan inaktivasyon hızında değişiklikler olabilir, kendi içsel veya yapay olarak eklenmiş floresans özelliklerinde değişiklikler olabilir, çeşitli proteazlara duyarlılığı değişebilir.

Bunlar ve benzeri yöntemlerin uygulanması sistemin farklı aktivite durumlarının birbirlerinden ayrılmasına yardımcı olabilir.

G proteinine kenetli sinyal ileti sisteminin alt birimlerinde de aktivasyon durumu ile proteinin konformasyonu/konformasyonları arasındaki ilişkiyi belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu sistemde moleküler yapısı en iyi bilinen birim G proteindir. Bu durumun en önemli nedeni G proteinlerinin reseptörlerden ve çoğu efektörden farklı olarak integral membran proteinleri olmaması ve kristal olarak elde edilebilmesidir. Bu proteinlerin kristal olarak elde edilebilmesi sayesinde X ışını kristalografisi bilgileri elde edilebilmiş ve bu bilgiler aracılığı ile moleküler yapısı büyük ölçüde ortaya çıkarılmıştır (Noel ve ark., 1993; Tesmer ve ark., 1997). Ayrıca G proteinleri hakkında NMR (Higashijima ve ark., 1991) ve floresans spektroskopik bilgiler de mevcuttur. Gilman grubu tarafından G_o ve G_i proteinlerinde yapılan floresans çalışmaları, GDP bağlı, aktive edici nükleotid (GTP ve hidrolize olmayan analogları) bağlı ve aktive edici nükleotid+ Mg^{+2} bağlı olmak üzere üç farklı floresans düzeyi gözlenmiştir. Bu farklı floresanslar molekülün üç farklı fonksiyonel konformasyonunu yansıtmaktadır (Higashijima ve ark., 1987).

G proteinlerine kenetli reseptörlerde kristalizasyon problemleri nedeni ile G proteinlerinkine benzer kristalografisi bilgileri elde edilememiştir. Buna karşın, yapısal olarak G proteinlerine kenetli reseptörlere benzeyen fakat fonksiyonel olarak tamamen farklı, kristal haline getirilebilen, bir integral membran proteini olan bakteriyorodopsinin üç boyutlu yapısına dair bilgilerden (Stoeckenius ve Bogomolni, 1982) ve G proteinlerine kenetli reseptörlerin amino asit dizilimlerinden yola çıkarak, bu proteinlerin moleküler yapısı hakkında moleküler mekanik ve moleküler dinamik simülasyonlar yapabilmek mümkün olmuştur (Strader ve ark., 1994). Ayrıca reseptörler hakkında biyokimyasal yöntemlerle elde edilen bilgileri açıklamak için reseptörün farklı aktif ve inaktif konformasyonlarını varsayan termodinamik ve kinetik modeller öne sürülmüştür. Proteinler üzerinde mutasyon yapmak ve bu mutasyonla fonksiyonlar arasındaki ilişkileri belirlemek gibi moleküler biyolojik yöntemlerde aktivasyon durumlarını ayırt etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle, bazı mutasyonların aktif konformasyonu inaktif konformasyon aleyhine seçtiğine dair gözlemler yapılmıştır (Samama ve ark., 1993).

Efektör moleküller, örneğin bu tez kapsamında sunulan çalışmalarda göz önüne alınan adenilat siklaz hakkında bilinenler reseptör ve G proteinleri ile karşılaştırıldığında göreceli olarak daha azdır ve daha dolaylıdır. Adenilat siklaz için bunun en önemli nedeni integral membran proteini olması ve modelleme için temel alınabilecek benzer bir proteine dair kristalografik bilgilerin mevcut olmamasıdır. Adenilat siklazın sadece hücre içindeki katalitik kısmını içeren kristalografi bilgileri mevcuttur (Zhang ve ark, 1997). Farklı aktivasyon durumlarındaki adenilat siklazın termal inaktivasyona duyarlılığındaki farkları gözleyen çalışmalar mevcuttur (Colvin ve Allen, 1991; Awad ve ark., 1983).

Sunulan çalışmalarda, G proteinlerine kenetli sinyal ileti sistemleri ile ilgili 3 grup soruya yönelik yanıtlar arandı.

1. G proteinine kenetli sinyal ileti sisteminde aynı G proteini ve efektörü kullanan reseptörler arasında fonksiyonel ve bağlanma düzeyinde çapraz etkileşim olup olmadığı: Bu alanda yapılan çalışmalarda, hücreden hücreye ve reseptörden reseptöre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu birbirine ters görünen sonuçların nedeni bu organizasyonun hücrenin fonksiyonlarına uygun olarak düzenleniyor olması olabilir. Günümüzde bütün bu gözlemleri bir çatı altında toplayabilecek genel bir kural ortaya konmamıştır. Bu alanda yapılan gözlemlerin birikmesi ile bu tür etkileşimleri düzenleyen genel kurallara ulaşmak mümkün olabilir. Bu nedenle bizde sıçan kalbinden elde edilen hücre membranlarında G_i aracılı yanıtlarda fonksiyonel düzeyde; sıçan kalbi ve kobay akciğer membranlarında G_s aracılı yanıtlarda bağlanma düzeyinde çapraz etkileşim olup olmadığını inceledik. Yine bu konuda diğer bir yaklaşım olarak, farklı miktarlarda β -adrenerjik reseptör taşıyan CHO hücreleri kullanılarak, içsel olarak farklı miktarda reseptör taşıyan membranlardaki ve reseptör miktarı başlangıçta aynı olup bir gruba tersinmez bir antagonistin uygulanmasıyla reseptör miktarı değiştirilen membranlardaki agonistle uyarılan siklik AMP yanıtları karşılaştırıldı. Bu şekilde reseptör miktarının içsel olarak farklı olduğu durumda, hücrenin bunu kompanse etmek için düzenleyici bazı mekanizmalar kullanıp kullanmadığı test edilmiş oldu.

2. CHO hücrelerindeki β -adrenerjik reseptör-Gs-Adenilat siklaz sistemindeki aktivasyon mekanizmasının incelenmesi: Aktivasyon modelleri, mevcut deneysel gözlemi açıklarken aynı zamanda, tamamen

kendi doğaları gereği, gözlemi açıklamak için kullandıkları parametrelerdeki değişimlerin nasıl sonuçlanacağını da tahmin ederler. Bu nedenle bu parametrelerin deneysel olarak değiştirilmesini takiben elde edilen sonuçların modelin tahminleriyle karşılaştırılması modelin doğruluğunu test etmek için kullanılabilir. Bu gerçeğe dayanılarak, β -adrenerjik reseptör taşıyan CHO hücrelerinde, bir aktivasyon parametresi olan reseptör sayısı, tersinmez bir antagonistle azaltılarak sistemin yanıtlarındaki değişiklikler gözlemlendi. Daha sonra bu gözlemler, bir katalitik model olan "encounter coupling model" (Stickle ve Barber, 1993) ve bir termodinamik denge modeli olan "quinternary complex model" (Onaran ve ark. 1992) çerçevesinde değerlendirildi.

3. Adenilat siklazın aktivasyon durumu ile termal inaktivasyonu arasındaki ilişkinin ve inaktivasyon sonucu değişen sistemdeki, bazal ve farklı şekillerde uyarılmış aktivitelerinin incelenmesi: Adenilat siklaz enzimi termal olarak inaktive olduğu iyi bilinen bir enzimdir. Enzimin bu özelliğine dayanarak, enzimin çeşitli aktivasyon durumlarının inaktivasyon hızına etkileri incelenebilir ve farklı aktivasyon durumları varsa bu yöntemle birbirlerinden ayırt edilebilir. Bu amaçla bazal aktivitesi yüksek fakat reseptörle aktivasyonu çok az olan kobay akciğer membranları ve bazal aktivitesi düşük fakat reseptörler aracılığı ile iyi uyarılabilen, insan β -adrenerjik reseptörü taşıyan CHO hücreleri kullanıldı. Bunun yanı sıra, elde edilen bilgilerden adenilat siklazın sinyal ileti sistemi içindeki fonksiyonel stokiyometrisi hakkında bilgi edinilmeye çalışıldı.

2. ARAÇ VE YÖNTEMLER

2.1 KİMYASAL MADDELER

Deneyleerde kullanılan Tris-baz, fosfoenolpirüvat (PEP), pirüvat kinaz (PK), İzobütülmethylksantin (IBMX), (-)-isoproterenol (ISO), sığır serum albümini (BSA), kloramin-T, sefadex G25 superfine, siklik adenozin monofosfat (cAMP), 2'-O-Monosüksinil adenozin 3'-5'-siklik monofosfat tirozin metil ester (ScTMEcAMP), Fenil metil sülfonil florid (PMSF), Forskolin, Dimetil sülfoksid (DMSO), amonyum persülfat, merkaptotanol, bromofenol mavisi, genetisin, penisilin, streptomisin, DMEM:F12 ve Na₂-Etilen dinitro tetraasetikasit (Na₂-EDTA) Sigma Chemical Co.'den, Etilenglikol-N,N,N',N' tetraasetikasit (EGTA), metanol Merc Chemical Co.'dan, guanozintrifosfat (GTP), guanozindifosfat (GDP), guanililimidodifosfat (Gpp(NH)p), Na- ve Tris-Adenozin trifosfat (ATP), Üridin difosfat (UDP) Ditiyotreitil (DTT), akrilamid ve bisakrilamid Boehringer Mannheim'dan, fetal serum Biochrom KG (seromed)'den, İyot-125 (NaI, 2000mCi/mmol) Amersham'dan satın alındı. (-)-pindolol, Tocris, (-)-siyanopindolol Sandoz, Propranolol-HCl Doğu İlaç, Bromoasetil alprenolol (BAAM) RBI Şirketlerinden sağlandı. IBMX ve PMSF %90 etanol, forskolin ve BAAM DMSO, pindolol ve siyanopindolol metanol, diğer tüm kimyasal maddeler distile su içinde çözüldü.

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Hücre Kültürü

Değişik düzeylerde insan β2-adrenoseptörü ifade eden CHO (chinese hamster ovary) hücre dizisi alt klonları Dr. Tommaso Costa (Istituto Superiore di Sanita, Roma, İtalya) tarafından, pC-DNA3.1 vektör içinde transfekte edilerek elde edilmiş ve canlı olarak laboratuvarımıza gönderilmişlerdir. Hücreler standart koşullarda, DMEM:F12 (1:1), %5 fetal buzağı serumu, penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/ml) ve transfekte hücre klonlarını seçmek için genetisin (200 µg/ml) den oluşan besi yerinde

üretildi. Bir bölüm hücre, besi yeri:dimetilsulfoksit (9:1 h/h) içinde donduruldu ve sıvı azot içinde saklandı. Pasajı devam eden hücreler deneylerde kullanıldı (1-18 pasaj). İkiye katlanma zamanı 24-30 saat olan bu hücreler, 75 cm² kültür şişelerinde (Greiner) (13 ml besi yeri) ortalama 2.5 günde bir besi yerleri değiştirilerek ve 5 günde bir 1:10 bölme oranıyla pasaj yapılarak üretildi. Yeterli sayıda konflüent kültür oluştuğunda hücre peletleri aşağıda anlatıldığı şekilde membran hazırlanmak üzere -70 °C'de dondurularak saklandı.

2.2.2 Membranların hazırlanması

Kobay Akciğer (parankima) ve sıçan kalp (ventrikül) membranları aşağıda belirtilen küçük ayrıntılar dışında benzer yöntemlerle hazırlandı. Kobay ve sıçanlar servikal dislokasyonla öldürülüp karotisleri kesilerek kanatıldıktan sonra akciğerleri ve kalbi kesilerek soğuk Krebs-Hanseleit tamponuna alındı. Makasla küçük parçalar ayrılan dokular hipotonik TRIS tamponuna (A) aktarıldı (5 mM TRIS, 0.2 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 µg/ml Aprotinin) ve aynı tampon içinde (1:10 g doku:ml tampon) ultraturax ile homojenize edildi (en yüksek hızda 3x20 saniye). Homojenat 4° C'de, 5 dakika, 400 x g'de (Sorvall, RC2-B) santrifüj edilerek süpernatant alındı. Kalan pelet bir kez daha aynı yöntemle homojenize edilip ayrıldıktan sonra elde edilen iki süpernatant birleştirilip 30000 x g de 30 dakika çevrildi. Pelet farklı bir tamponda (B) yeniden süspansiyon edildikten sonra (10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF, 1mM EGTA, 5 µg/ml Aprotinin, 2mM DTT, pH 7.4) 30000 x g de 30 dakika çevrilerek çöktürüldü ve pelet bu kez (C) tamponu (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF, 1mM EGTA, 5 µg/ml Aprotinin, pH 7.4) içinde tekrar süspansiyon edildi ve aynı koşullarda tekrar çöktürüldü. Bu pellet, D tamponu (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF, 1 mM EGTA, 5 µg/ml Aprotinin, %25 Sükroz (w/v), pH 7.4) içinde, protein derişimi yaklaşık 2 mg/ml olacak şekilde süspansiyon edildi. Süspansiyon, ependorf tüplere dağıtılıp hemen dondurulduktan sonra -70° C'de saklandı.

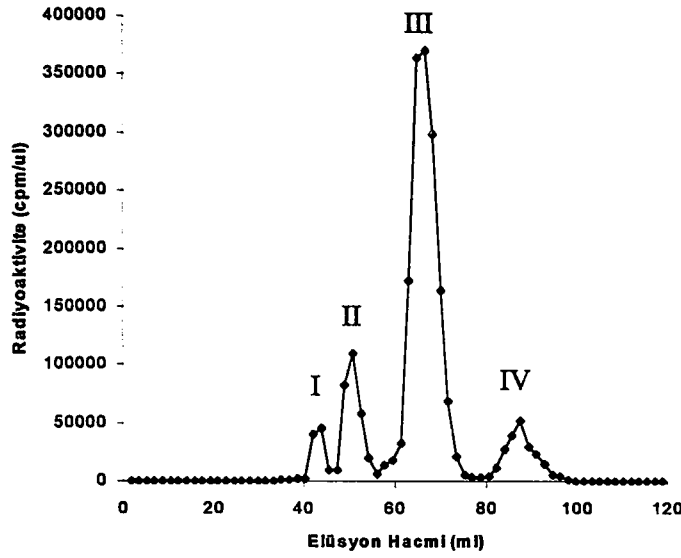
CHO hücre membranları konflüent kültürlerden hazırlandı. EDTA (1mM) içeren PBS tamponu ile kaldırılan hücreler (5 ml / 75 cm²), 200 x g de 3 dakika çevrilerek çöktürüldü ve -70 derecede yeterince pelet birikinceye kadar saklandı. Biriken hücre peletleri çözüldükten sonra yukarıda belirtilen hipotonik TRIS (A) tamponu içinde (4 µl/cm²) ultraturax (3x20 saniye) ve insülin enjektörü ile 22 gauge iğneden 30 kez geçirilerek homojenize edildi.

Hücre çekirdekleri ve parçalanmamış hücreler 400 x g de 5 dakika çevrilerek çöktürüldükten sonra süpernatant 30000 x g de 30 dakika çevrilerek çöktürüldü. Pellet B tamponunda yeniden süspansiyon edilip aynı koşullarda çöktürüldükten sonra D tamponu içinde süspansiyon edilip yukarıdaki gibi saklandı.

Membran preparatlarındaki protein miktarı Bradford (Bradford, 1976) yöntemiyle saptandı.

2.2.3 ScTMEcAMP iyotlanması

ScTMEcAMP, sonuç derişim 1 μM olacak şekilde Na fosfat tamponuna (0.5 M, pH 7.4) eklendi. Tamponlanmış ScTMEcAMP (25 μl), içinde özgün aktivitesi 2000 Ci/mmol, toplam 2 mCi ^{125}I -Nal (20 μl) çözeltisi bulunan tüpe eklendi. Bu tüpe birer dakika aralıklarla 3 kez 5 μl kloramin-T (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eklendi. Yükseltgenme reaksiyonu 30 μl Na-metabisülfid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eklenerek durduruldu. Oluşan mono- ve diiyodo-ScTMEcAMP'yi serbest iyottan ve birbirinden ayırmak amacıyla tüp içeriğı Na asetat tamponuyla (1 M, pH 5) dengelenmiş 1x50 cm Sefadex G25 (şişmiş partikül büyüklüğü 20-50 μ) kolonuna uygulandı. Elüsyon, 6-8 ml/saat akım hızıyla kolondan geçirilen Na asetat tamponuyla (1 M, pH 5) sağlandı ve elüat bir fraksiyon toplayıcısı yardımıyla 1.6 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Serbest iyot, monoiyodo-ScTMEcAMP ve diiyodo-ScTMEcAMP "peak" leri, fraksiyonlardan alınan örnekler gama sayacında (LKB Wallac 4261 Multigamma) sayılarak saptandı. Jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen kromatogram 1. şekilde gösterilmiştir. Mono- ve diiyodo-ScTMEcAMP "peak" leri (sırasıyla 3 ve 2 fraksiyon) birleştirildi. Bu materialer aynı hacimde izopropil alkol ile karıştırıldı ve 4° C'de saklandı. Aktiviteleri saptanan bu preparatlar daha sonraki RIA ölçümlerinde "tracer" olarak kullanıldı.



Şekil 1. Yükseltgenme tepkimesi durdurulduktan sonra jel fitrasyon kolonuna uygulanan toplam 90 μ l reaksiyon ortamının, asetat tamponuyla elüsyonundan sonra elde edilen kromatogram. Her fraksiyon 1.6 ml dir. Elde edilen "peak" ler I: serbest iyot, II: Tanımlanmadı, III: Monoiyodo-ScTMEcAMP, IV: Diiyodo-ScTMEcAMP.

2.2.4 Pindololün iyotlanması ve saflaştırılması

Aşağıda verilen iyotlama protokolünde pindololün indol halkasında tek iyotlu türün oluşumu maksimize edilmiştir. Bu protokol literatürde daha önce verilen ama verimi optimize edilmemiş protokollerden değiştirilerek belirlenmiştir (Barovsky ve Brooker, 1980: Wolf ve ark., 1981: Hoyer ve ark., 1984).

Tepkime için protokol

	Derişim	Vol (μ l)	toplam miktar
Na Fosfat (pH 7.5) mM	500	25	12500 nmol
NaI (0.01 N NaOH içinde) mM	0.05	20	1 nmol
PIN mM	5	5	25 Nmol
CA-T mg/ml	0.2	15	3 μ g
NaMBS mg/ml	2	30	60 μ g
Total vol =		95	

- 1) Fosfat tamponu iyot çözeltisi üzerine eklenir
- 2) Pindolol tamponlanmış iyodun üzerine eklenir
- 3) Kloramin T, karışımın üzerine eklenerek tepkime başlatılır
- 4) Üçüncü dakikada Na metabisüfit tepkime ortamına eklenerek tepkime durdurulur.

5) Durdurulmuş tepkime en kısa zamanda HPLC ile saflaştırılır.

Iyodopindololün saflaştırılması için HPLC protokolu

Literatürde iyodopindololün saflaştırılması için verimi çok düşük bir yöntem olan ince tabaka kromatografisi önerilmiştir (Kupfer ve ark., 1982). Bu nedenle ligandın saflaştırılması için hem verimi yüksek hem de radyoaktif madde ile çalışmak açısından güvenli olan bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi bu çalışmada geliştirilmiştir. Bu nedenle yöntem ve elde edilen sonuçlar ayrıntılı olarak sunulmuştur.

İzokratik Protokol:

Kolon: C18 125x4.2 (ID) mm

Mobil Faz: %60 K fosfat tamponu 10 mM pH 6.5
%40 Metanol

Deteksiyon: 216 nm absorpsiyon

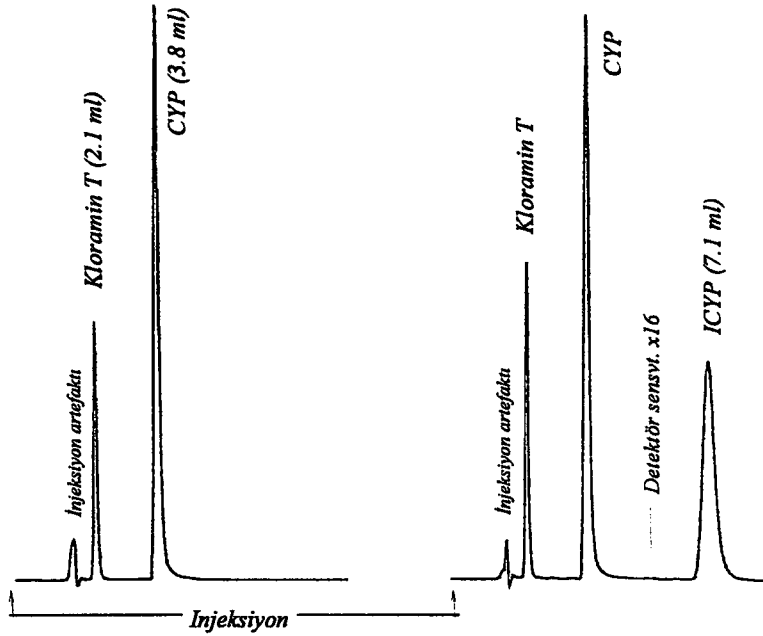
Akım Hızı: 1 ml/dak

iyotlama tepkimesinin 50 µl olarak injekte edildiği protokolde sözkonusu maddelerin elüsyon paternleri aşağıdaki gibi bulunmuştur:

Retansiyonlar (elüsyon ml)	Fraksiyon volümü (µl)	
CA-T	2.1	300
CYP	3.8	600
ICYP	7.1	800

Fraksiyonlar 200 µl olarak toplanmıştır

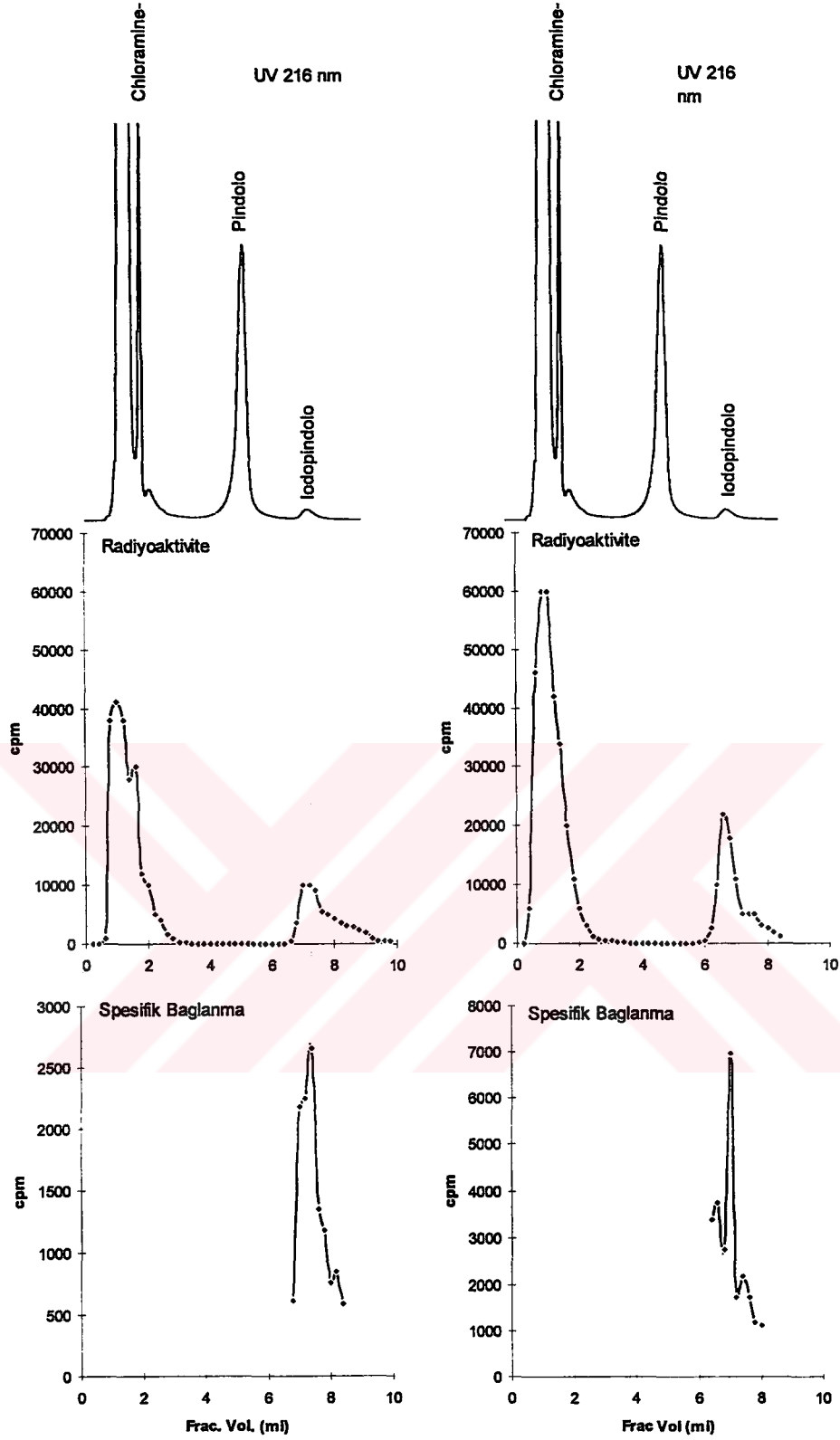
Bu örnekte pindolol yerine siyanopindolol kullanılmıştır fakat pindololün paterni farklı bulunmamıştır. Bu ayrıştırma protokolüne ait kromatogram örneği şekil 2 'de görülmektedir.



Şekil 2. Siyanopindolol ve iyodosiyanopindololün ayrılmasını gösteren kromatogram örneği. Birinci kromatogram, Na metabisülfidin tepkime ortamına önceden konularak iyotlamanın engellendiği, ikinci kromatogram ise iyotlama tekimesinin 3 dakika sürdürüldüğü ortamlardan alınmıştır. Oluşan iyodosiyanopindolol az olduğundan HPCL dedektörünün duyarlılığı bu madde gelmeden önce 16 kat artırılmıştır.

Bu örnekte, tepkime başlamadan önce ve tepkime başladıktan 3 dakika sonra tepkime ortamından alınan örnekler HPLC ye uygulanmıştır. Kromatogramdan da görülebileceği gibi bu koşullarda oluşan (mono) iyodosiyanopindolol, oluştuğu ölçülebilen tek üründür ve işaretlenmemiş siyanopindololden çok iyi ayrılmaktadır. Soğuk potasyum iyodürün kullanıldığı bu örnekte serbest iyot görülmemekle birlikte, radyoaktif iyot kullanılan preparasyonlarda serbest iyodun beklendiği gibi kolonda hiç tutulmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla, iyodosiyanopindololün serbest iyot ile kontaminasyon riski neredeyse sıfırdır. İşaretlenmemiş siyanopindololün iyodosiyanopindololden çok iyi ayrılması, bize tepkime ortamında siyanopindololün (iyoda göre) aşırı miktarda kullanılabilmesi olanağını sağlamış (en az on kat daha fazla siyanopindolol ya da pindolol) ve böylece hem tepkimenin verimi artırılmış hem de yan ürünlerin (birden fazla iyot içeren inaktif türler) oluşumu en aza indirilmiştir. Burada tepkime verimi iyot referans alınarak düşünülmektedir, çünkü bir mol siyanopindolol bir mol radyoaktif iyotdan çok daha ucuzdur.

Şekil 3 1 mCi ile elde edilen iki ayrı iyodopindolol preparatının verilerini göstermektedir. Bu şeklin birinci sırasında mor ötesi absorpsiyon detektörünün verdiği traseler görülmektedir (iki trase de birinci preparata aittir), ikinci sırada, toplanan fraksiyonlardaki (200 µl) radyoaktivite ve üçüncü sırada her fraksiyonla



Şekil 3 Pindololün iyotlama tepkimesinden sonra elde edilen Kromatogramlar: Birinci satır kolon çıkışındaki UV absorpsiyonunu, ikinci satır ilgili fraksiyonlardaki radyoaktiviteyi, üçüncü satır ise yine aynı fraksiyonlardaki beta adrenoseptöre bağlanabilme aktivitesini göstermektedir. Buradan serbest iyodun (ikinci satırdaki ilk pikler) ve işaretlenmemiş pindololün iyodopindololden çok iyi ayrılabilirdiği ve ikinci satırdaki ikinci pikin gerçekten iyodopindolol olarak yorumlanabileceği açıktır. İki kolon ard arda yapılmış iki bağımsız iyotlama tepkimesinden elde edilmiştir (yalnız birinin UV absorpsiyon trasesi gösterilmiştir).

kobay akciğer membranlarında (yoğun olarak β 2-AR içermektedir) elde edilen spesifik bağlanma görülmektedir. Fraksiyonların oluşturduğu spesifik aktivite, her fraksiyondan aynı hacim alınarak ölçülmüştür, ve her fraksiyonun radyoaktivite içeriğine göre düzeltilmemiştir. Dolayısıyla, bağlanmadaki azalma (pik etrafındaki fraksiyonlarda) spesifik aktivitenin düşük olmasına (yani safsızlıklara) değil, ligand miktarının azalmasına bağlıdır. Bu azalma radyoaktivite içeriğine göre düzeltildiği zaman pik etrafındaki bütün fraksiyonların aynı spesifik aktiviteye sahip olduğu (yani aynı derecede saf oldukları) görülmektedir (data gösterilmemiştir). Dolayısıyla, preparat bu fraksiyonlar bir araya toplanarak elde edilmektedir. Elde edilen preparata sonuç derişim %0.01 (a/h) olacak biçimde fenol eklenmesi ve preparatın 0° C'nin altında saklanması, preparatın ömrünü önemli ölçüde uzatmaktadır.

2.2.5 İmmünoblot

Membran preparatları önce %10 poliakrilamid sodyum dodesilsülfat jel elektroforezine uygulandı (Biorad, Power PAC300 güç kaynağı ile mini jel sistemi). Elektroforez için Laemmli protokolü biraz değiştirilerek kullanıldı (1970). Örnekler gliserol, bromofenol mavisini ve merkapto etanol ve SDS içeren tris tamponunda (pH 6.8) 100 santigrat derece 3 dakika denatüre edildi. Çözümleyici jel %10, yığıma (stacking) jel %5 akrilamid+bis-akrilamid olarak hazırlandı. Elektroforez tamamlandıktan sonra (25 mA 15 dak 1. aşama, 60 mA 60 dak 2. aşama) jel üzerindeki proteinler yine elektroforetik olarak nitroselüloz membranlara aktarıldı (Biorad transfer system ile 200 mA 1 saat). Transfer tamponu bileşimi: 6 g/L Tris, 29 g/L glisin, 1 g/L SDS, 200 ml/L metanol. İmmünoblot için RM/1 (anti G_{sa} antikor) kullanıldı (New England Nuclear Co.). Nitroselüloz membranlar %3 albümin ve % 8 yağsız süt tozu içeren tuzlu fosfat tamponunda (PBS) bir gece boyunca 4 °C'de bekletildi. Membranlar birkaç kez PBS ile yıkandıktan sonra yine PBS içinde RM/1 antikor ile (1/1000) 1-2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Membranlar birkaç kez PBS ile yıkandıktan sonra bu kez "horseradish" peroksidaz ile işaretlenmiş, eşek kaynaklı anti-tavşan IgG antikor (Amersham) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar PBS ile yıkanan membranlar, Amersham'ın yüksek verimli kemoluminesans reaktifi ile 1 dakika bekletildi ve 15 saniye ile 10 dakika arasında değişen maruziyet süreleriyle Röntgen filmi (Kodak) ile karşılaştırıldı.

2.2.6 cAMP Ölçümü

cAMP derişimi radyoimmünoesey (RIA) yöntemiyle (Brooker, 1988) ölçüldü. Kullanılan Anti-cAMP antikorlar daha önce bu laboratuarda elde edildi.

RIA toplam 300 μ l hacimde, 4° C'de yapıldı. Adenilatsiklaz eseylerinin yapıldığı tüplerin içeriği (toplam 200 μ l) ve standart olarak kullanılacak çözeltiler (her biri 50 μ l) Na asetat tamponu (0.1 M, pH 6.2) ile 500 μ l'ye tamamlandı. Tüplere 20 μ l asetik anhidrit - trietilamin karışımı (1:2 oranında hazırlanmış) eklenip hemen vorteks edilerek cAMP'nin asetilasyonu sağlandı. Bu çözeltilerin herbirinden 50 μ l'lik örnekler alınarak eseyin yapılacağı tüplere dağıtıldı. Tüplere 100 μ l Na asetat tamponu (Na asetat 0.1 M, CaCl₂ 2 mM, pH 5.8) ve 50 μ l anti-cAMP antikor çözeltisi eklendi. Antikor çözeltisi, antiserumların, kullanılan ¹²⁵I-ScTMEcAMP'nin %50'sini bağlayacak şekilde sığır serum albümini çözeltisi (BSA, % 0.2) ile seyreltilmesiyle elde edildi. Son olarak 100 μ l "tracer" (toplam 15000 cpm aktivite içerecek şekilde seyreltilmiş) eklendikten sonra tüpler 24 - 48 saat süreyle 4° C'de bekletildi. Bu sürenin sonunda 100 μ l BSA çözeltisi (% 0.2) ve ardından 1.5 ml etanol (% 90) eklenen tüpler 1500 x g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek presipite olan antijen-antikor kompleksinin tüp dibine çökmesi sağlandı. Süpernatant döküldükten sonra tüpte kalan aktivite gama sayacıyla okundu. Standart asetil-cAMP bağlanma eğrisi 4 parametrelili logistik modelin regresyonuyla saptandı. cAMP derişimleri, tahmin edilen modelin ters regresyonuyla belirlendi.

2.2.7 Adenilatsiklaz deneyleri

Tüm adenilatsiklaz deneylerinde değerlendirilen parametre ortalama enzim aktivitesi olduğundan, öncelikle deneylerin yapılacağı koşullarda cAMP oluşum hızının sabit olduğu süre belirlendi. Bu amaçla yapılan deneylerde bazal ve reseptör uyarımı sonucu oluşmuş cAMP miktarlarının zamanla değişimi ölçüldü. GTP (1 μ M) varlığında ölçülen değerler bazal, aynı derişimde GTP ile birlikte 100 μ M (-)Isoproterenol (ISO) varlığında ölçülen değerler reseptör uyarımı ile oluşan cAMP birikimi olarak değerlendirildi. Esey bir inkübatör (Heraeus) içinde 37° C'de, içlerinde adenilatsiklaz esey tamponu (sonuç derişimler (mM): Tris-HCl 50, KCl 100, PEP 5, MgCl₂ 10, IBMX 1, ATP 1, PK 0.01 mg/ml, pH 7.4), sözü edilen guanin nükleotidler ve uyarıların bulunduğu tüplere membran süspansiyonunun (sonuç derişim 1-

10 µg/tüp) eklenmesiyle başlatıldı. Başlangıçtan itibaren 2 dakikada bir her iki tüpten alınan 100 µl'lik örnekler, içlerinde 100 µl HCl (0.2 N) bulunan tüplere aktararak reaksiyon durduruldu ve oluşan cAMP miktarı RIA ile saptandı. Bu koşullarda cAMP oluşumunun 10 dakika süreyle doğrusal olduğu bulundu. Yapılan bazı deneylerde, kullanılan ATP rejenerasyon sisteminin cAMP birikimi üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğu görüldükten sonra, rejenerasyon sistemi eseyden çıkarıldı. Bu koşullarda cAMP birikiminin en az beş dakika doğrusal olduğunun gözlenmesi üzerine, deneylerin tümünde 5 dakikalık tepkime süresince biriken cAMP miktarı durağan adenilat siklaz aktivitesini değerlendirmek için kullanıldı. Durağan adenilat siklaz aktivitesi, birim zamanda (1 dakika) belirli bir membran miktarı başına (mg membran proteini) cAMP birikimi (pmol) olarak verildi.

Adenilat siklaz aktivitesinin çeşitli uyanlarla değişiminin ölçüldüğü deneylerde, uyan ile hücre membranları beş dakika birlikte inkübe edildikten sonra adenilat siklaz esey tamponunun bu karışım üzerine eklenmesiyle esey başlatıldı.

2.2.8 Adenilat siklaz aktivitesinin termal inaktivasyonu deneyleri

Bu deneylerde kullanılan kobay akciğer membranları ve CHO WT4 hücre membranları, 1 µg/50 µl olacak şekilde 5 mM Tris tampon içinde süspansiyon edildikten sonra, iki gruba bölündü. Bir gruba inaktivasyon hızına etkisi incelenen madde eklenirken, diğer gruba sadece çözücü eklendi. Daha sonra her iki grup 37 °C'ye ayarlı bir inkübatöre yerleştirildi. Inkübatörde bekleyen membran süspansiyonlarından çeşitli zamanlarda (0,5,15,30,60,90,120,180,240,300,360. Dakikalar) alınan 50µl'lik örnekler, yine inkübatörde 37°C'de bekleyen adenilat siklaz esey tamponuna (50µl) eklenerek esey başlatıldı. Reaksiyon 5 dakika sonunda tüplere 100 µl, 0.2 N HCl eklenerek durduruldu. Bu grup deneylerde isopretorenol gibi oksidasyona uğrayabilecek ligandların yıkımını önlemek için adenilat siklaz esey tamponuna finalde 1.4 mM olacak şekilde askorbik asit eklendi. Ayrıca, kontrol membranlarının içine konacağı esey tamponuna, inkübasyona eklenen ligandlar, finalde aynı konsantrasyonu verecek şekilde de eklendi. Bu şekilde, gözlenecek etkinin, ligandın adenilat siklazı termal inaktivasyondan koruduğu için mi, yoksa sistemin aktivasyon durumunun değiştirilmesi sonucu mu ortaya çıktığı paralel bir deneyle ortaya konmuş oldu. Her zaman noktasında esey çift veya üçlü olarak yapıldı. Bu deney sonuçlarından,

adenilat siklaz aktivasyonunun yarı ömrü, üssel bir fonksiyonun data'ya fit edilmesi ile belirlendi.

2.2.9 Bağlanma deneyleri

Membranlar (tüp başına 5-10 μg), tampon çözeltisi (100 mM KCl, 50 mM Tris, pH 7.4), işaretli ligand (^{125}I -IP, tüp başına 15-20000 cpm), değişen derişimlerde kompetitör ligand, ve bağlanma üzerine etkisi incelenen maddelerle, toplam 100 μl hacimde, 37°C'de, 1 saat süreyle inkübe edildi. Forskolin etkisinin incelendiği deneylerde kontrol tüplerine forskolinin çözücüsü olan DMSO aynı hacimde eklendi. İnkübasyon süresinin sonunda, tüp içerikleri soğuk tampon çözeltisiyle 3 ml'ye seyreltilip cam elyaf filtrelerden (Whatman GF/B) vakum altında Millipore 1225 filtrasyon manifoldu ile filtre edilerek bağlı ve serbest ligand ayrıldı. İki kez 8 ml soğuk tampon çözeltisiyle yıkandıktan sonra filtrelerde kalan aktivite gama sayacıyla okundu. Bağlanma eğrileri dört parametrelili logistik modelin regresyonuyla saptandı. Reseptör sayısının ölçülmek istendiği deneylerde işaretli ligand 100000-200000 cpm arasında derişimlerde kullanıldı.

2.2.10 Tersinmez antagonist uygulaması

Tersinmez antagonist ile reseptör miktarı azaltılacak olan CHO WT4 hücre membranları eritilip, 2 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ olacak şekilde bağlanma tamponunda (50 mM Tris, 100 mM KCl) süspanse edildikten sonra 10^{-5} M final konsantrasyon olacak şekilde BAAM eklenip inkübasyona konuldu (37 °C). Otuz dakikanın sonununda membranlar 4 °C'de, 16000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü (Heraeus biofuge). Bu membranlar iki kez daha 400 μL bağlanma tamponu ile süspanse edildikten sonra santrifüj edildi. Bu yıkama işlemleri sonucunda tersinmez olarak bağlanmamış olan BAAM ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Elde edilen membranlarda reseptörlerin ne kadarının tersinmez olarak bağlandığını saptamak için iodopindolol 200 000 cpm ile total reseptör bağlanması yapıldı. Kontrol membranlarına da, BAAM hariç, aynı işlemler eş zamanlı olarak uygulandı.

2.3 Analiz yöntemleri

Derişim yanıt eğrileri dört parametrelili logistik eşitliğin doğrusal olmayan regresyonu ile değerlendirildi. Tüm doğrusal olmayan regresyon

parametrelerinin standart hataları asimptotik standart hatalar olarak verildi ve Gauss-Markoff-Rao yaklaşımı ile hesaplandı. Ortalamalar arasındaki fark eşlenmiş ya da eşlenmemiş Student-t istatistiği ya da F istatistiği kullanılarak değerlendirildi. Tüm istatistikler için %5 den küçük olasılık anlamlı kabul edildi. “Quinternary complex” ve “collision coupling” modelleri kullanılarak yapılan simülasyonlar MS Excel programı ortamında Visual Basic kodlama kolaylığı kullanılarak gerçekleştirildi. “Quinternary Complex” modelinin sayısal çözümü için daha önce yayınlanan yordam kullanıldı (Onaran ve ark., 1992).

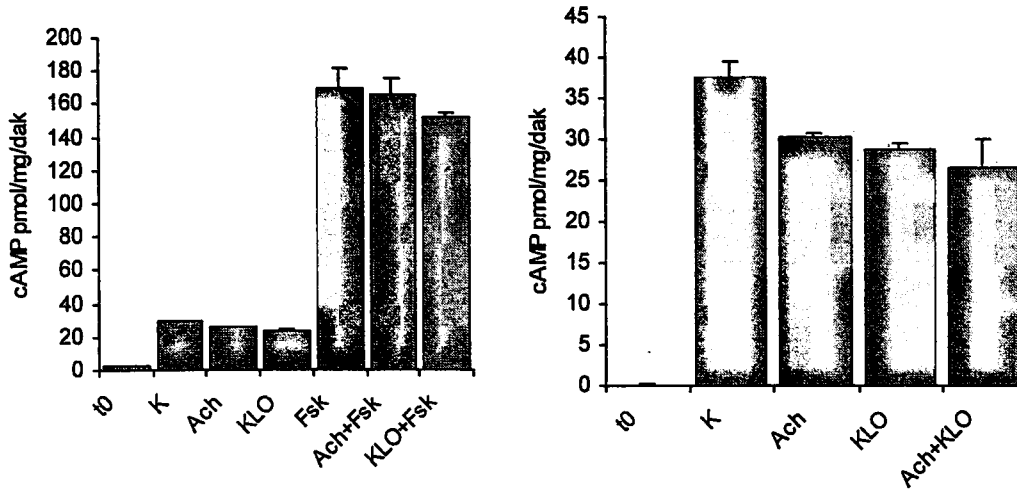


3. BULGULAR

3.1 Aynı tür G proteini kullanan reseptörlerde G proteinlerinin paylaşımı

G proteinlerine kenetli sinyal ileti sisteminin fonksiyonel birimlerinin membranda serbestçe ve sınırlanmaksızın hareket edebileceğini kabul eden aktivasyon modelleri, en azından bazı koşullarda, aynı tür G proteinini kullanan reseptör sistemlerinin birbirlerinin aktivasyon durumlarını etkileyebileceğini öngörmektedir. Bu etkileşimin nedeni şöyle özetlenebilir: iki farklı tür reseptör ortak bir G proteini havuzunu kullanıyorlar ise birinin aktivasyonu, aktive olabilecek serbest inaktif G proteini konsantrasyonunu düşürerek diğer reseptörün sinyal ileti verimini değiştirebilecektir, G proteini havuzunun farklı olduğu durumlarda böyle bir etkileşim gözlenmeyecektir. Bu bölümde sunulan fonksiyonel ve bağlanma çalışmaları bu olasılıkları incelemek için tasarlanmıştır.

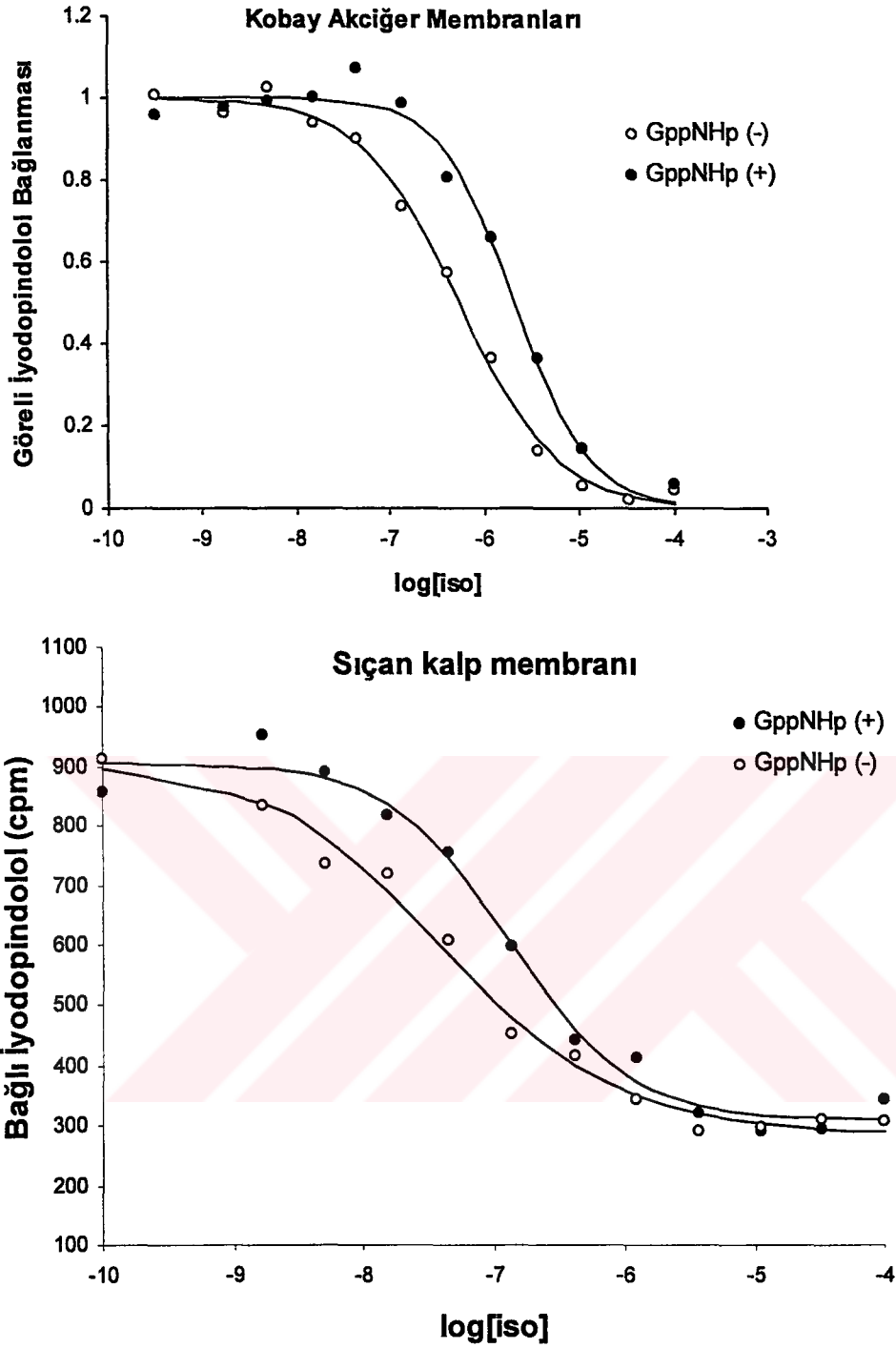
a) Fonksiyonel düzeyde karşılıklı etkileşimi inceleyen deneyler: Bu çalışmalarda sıçan kalbinden hazırlanan hücre membranları kullanılmıştır. Bu tez kapsamında sunulan çalışmaların genelinde Gs proteinlerine kenetli β -adrenerjik reseptörler incelenmekle beraber, bu çalışmalarda kalpte buldukları bilinen Gi proteinlerine kenetli muskarinik ve alfa2 reseptör sistemleri incelenmiştir. Bunun nedeni tartışma bölümünde ele alınacaktır. Muskarinik reseptör agonisti olarak asetilkolin ve alfa2 adrenoseptör agonisti olarak klonidinin kullanıldığı ilk grup çalışmada, bu reseptör sistemleri üzerinden oluşması beklenen adenilat siklaz inhibisyonu incelenmiştir. Her iki agonist de hem bazal hemde forskolinle uyarılmış adenilat siklaz aktivasyonunu baskılamıştır (şekil 4). Her iki durumda adenilat siklaz inhibisyonunda belirgin bir farklılık olmadığından agonistlerin birlikte uygulandığı deneyler bazal durumda gerçekleştirilmiştir. Her iki agonist birlikte uygulandığında, ayrı ayrı uygulandıklarında oluşturdukları yanıtların toplamından daha az yanıt oluşturmuşlardır. Bu durum sinyal ileti sisteminin reseptörlerin altındaki bir düzeyde tam olarak veya büyük ölçüde ortak olduğunu ve her iki reseptör tarafından oluşturulabilecek toplam stimulus (stimulus kavramı için Stephenson, 1956 önerilebilir) maksimum değerine ulaşmadan önce doyurulabildiğini düşündürmektedir. Ancak bu deney



Şekil 4. Asetilkolin (Ach) ve klonidin (KLO) ile değişik koşullarda oluşan adenilat siklaz inhibisyonu. Sol panelde inhibisyon hem bazal şartlarda hem forskolin varlığında değerlendirilmiştir. Sağ panelde ise bazal şartlarda ortak yanıtlar görülmektedir (ORT+SH, n=3)

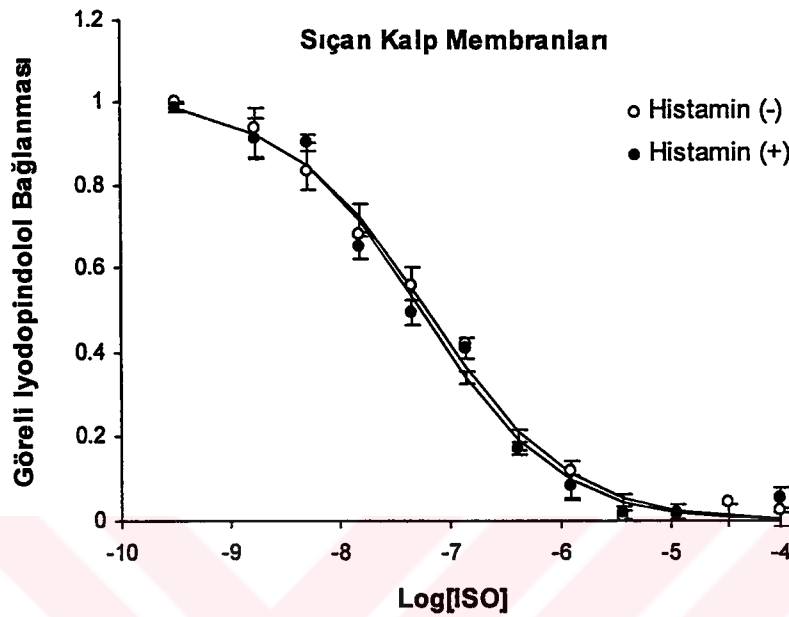
düzeneğinde doyan düzeyin Gi proteini mi yoksa adenilat siklaz mı olduğu ayırt edilememiştir.

b) Bağlanma düzeyinde karşılıklı etkileşimi inceleyen deneyler: Reseptör-G proteini-efektör kaskadında ortak kullanılan ve doyan aşamanın reseptör-G proteini düzeyi olduğunu göstermek için uygulanabilecek diğer bir teknik de efektörü aradan çıkararak doğrudan reseptör-G proteini kenetini incelemek olabilir. Termodinamik denge modellerine göre, guanin nükleotidlerinin yokluğunda ölçülen agonist afinitesinin guanin nükleotidlerinin eklenmesi ile azalmasının büyüklüğü, reseptör-G proteini kenetinin ölçütlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu durumda eğer iki farklı reseptör ortak bir G proteini havuzunu kullanıyorsa ve G proteini konsantrasyonu reseptörlerle karşılaştırılabilir düzeyde ise reseptörlerden birinin agonistle aktivasyonu serbest G proteini konsantrasyonunu azaltarak diğer reseptörün agonist afinitesini azaltacaktır. Reseptörler farklı G proteini havuzları kullanıyorlar veya G proteini konsantrasyonu reseptörlerden birine bağlanmayla azalmayacak kadar fazla ise böyle bir etki gözlenmeyecektir. Bu amaçla sıçan kalp mebranları ve kobay akciğer mebranlarında, Gs proteinine kenetli olan β -adrenerjik, histaminerjik ve PGE₂ reseptör sistemleri incelenmiştir. Referans reseptör olarak agonist bağlanma afinitesini ölçebildiğimiz β -adrenerjik reseptör kullanılmış ve birlikte uygulanan diğer agonistlerin bu afiniteye etkisi incelenmiştir. Her iki membranda da, β -adrenerjik reseptör sisteminde yüksek afiniteli agonist bağlanması ve guanin nükleotidlerine bağlı agonist afinitesinde azalma izlenebilmektedir (şekil 5). Bu membranlarda, agonist afinitesine G proteininin katkısı gözlenebilir



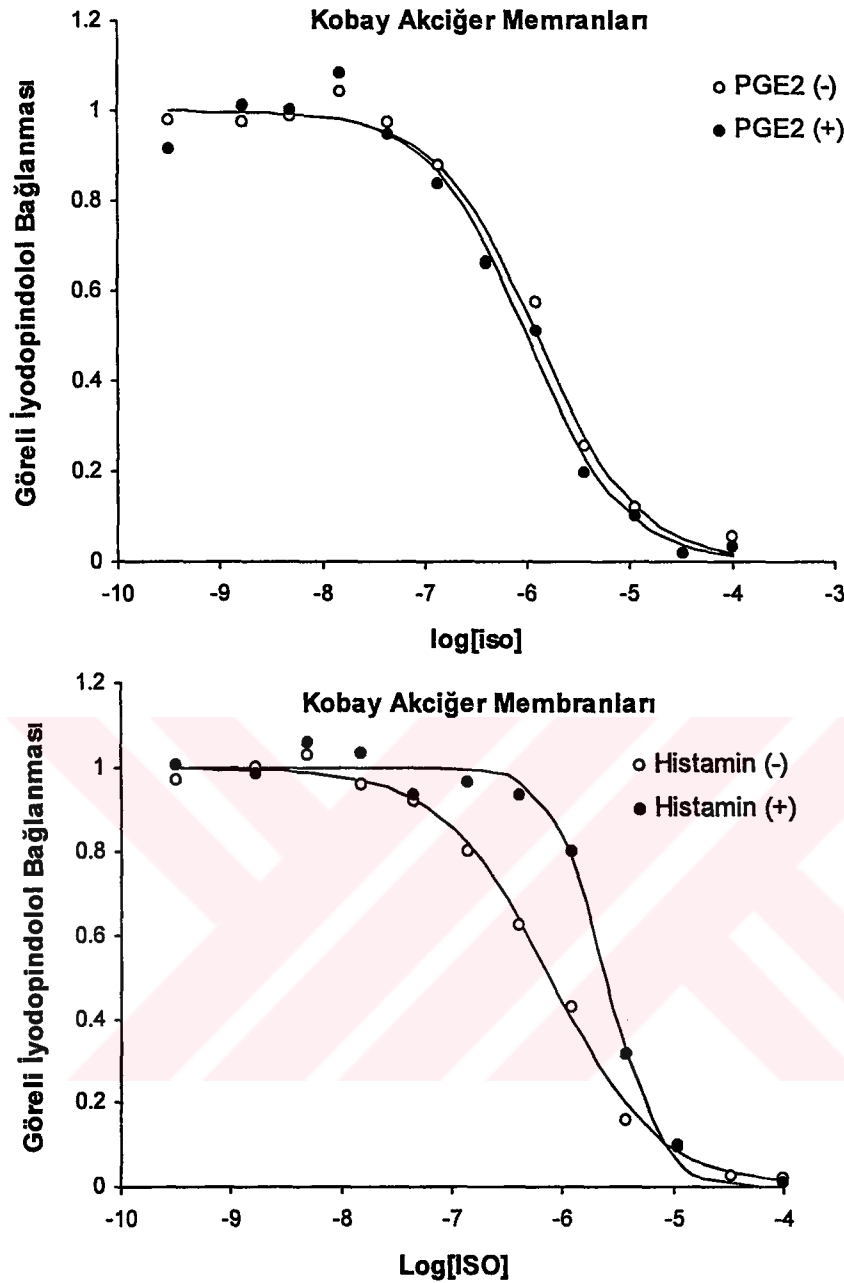
Şekil 5. Kobay akciğer ve sıçan kalp membranlarında isoproterenol bağlanmasına Gpp(NH)p nin etkisi. Isoproterenol bağlanması pindolol bağlanması ile olan yarışması cinsinden ölçülmüştür. Akciğer membranlarındaki bağlanma pindolol bağlanmasına rölâti olarak verilmiştir. Veriler, üç ölçümün ortalaması olan reprezentatif bir örnektir.

olduğundan, söz konusu deneyler için uygun olduğu düşünülmüştür. Sıçan kalp membranlarında yapılan deneylerde histamin (ya da PGE₂) varlığında isoproterenol afinitesi farklı bulunmamıştır (şekil 6).



Şekil 6 Isoproterenol bağlanmasına histamin (1 mM) varlığının etkisi. Isoproterenol bağlanması iyodopindolol bağlanması ile yarışması olarak ölçülmüş ve iyodopindolol bağlanmasına relative olarak verilmiştir. (ort ± sh, n=6)

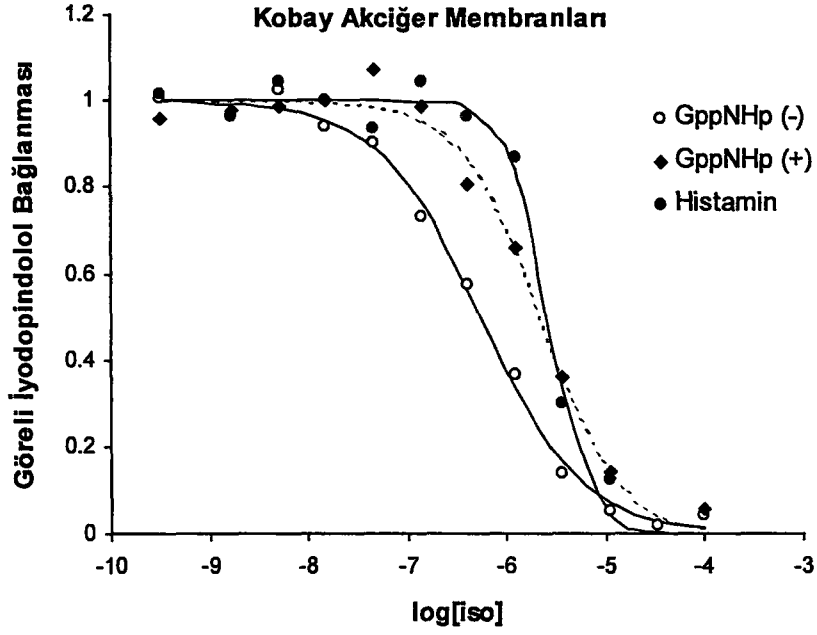
Oysa, kobay akciğer membranlarında yapılan deneylerde PGE₂ varlığında isoproterenol afinitesinde bir fark bulunmazken, histamin varlığında yüksek afiniteli isoproterenol bağlanması azalmıştır (şekil 7). Fakat bu durum üç nedenle histamin ve β -adrenerjik reseptörlerin ortak bir Gs havuzu kullandıkları lehine kullanılamaz: 1) Histaminin oluşturduğu afinite kayması guanin nükleotidin oluşturduğu afinite kaymasından büyük görünmektedir (şekil 8). Bu durum söz konusu modellerle açıklanamamaktadır. 2) Histaminin varlığı bir antagonist olan iyodopindololün hem spesifik hemde nonspesifik bağlanmasını etkilemektedir (şekil 9). 3) Histamin H1 (mepiramin) ve H2 (famotidin) antagonistleri histaminin bu etkisini geri çevirememiştir (data sunulmadı). Gözlenen etki histaminin fizikokimyasal etkilerine bağlı nonspesifik bir etki gibi görünmektedir.



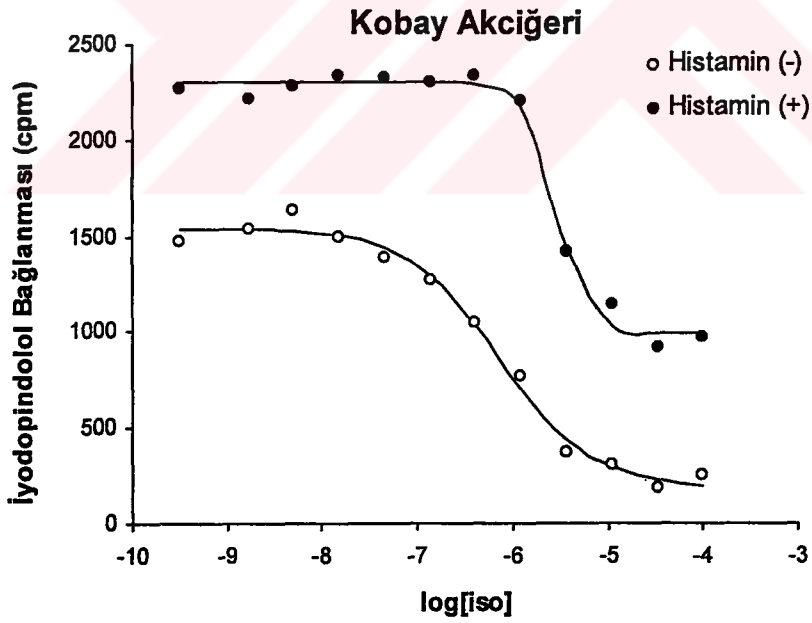
Şekil 7 Kobay akciğer membranlarında PGE2 (0.1 mM üst panel) ve histaminin (1 mM, alt panel) isoproterenol bağlanmasına etkisi. Isoproterenol bağlanması, iyodopindolol yarışması olarak ölçülmüş ve iyodopindolol bağlanmasına rölâf olarak verilmiştir. Veriler röprezantatif üç deneyin ortalamasıdır.

3.2 R-G etkileşmesinin ayrıntıları

β -adrenerjik reseptörleri içsel olarak farklı olan ve başlangıçta aynı olup tersinmez bir antagonistle farklılaştırılan CHO hücre membranlarında agonist potenslerinin karşılaştırılması: Bu çalışmalar farklı miktarlarda insan β 2-adrenerjik reseptörleri taşıyan CHO hücrelerinde yapıldı. Bu hücrelerdeki reseptör konsantrasyonları tablo I 'de gösterilmiştir.



Şekil 8 Kobay akciğer membranlarında histamin (ve GppNHp nin) isoproterenol bağlanması üzerine etkisi. Şekil 5 ve 7 deki veriler, histaminin ve GppNHp'nin oluşturduğu afinite kaymalarını göstermek amacıyla bir arada gösterilmiştir.



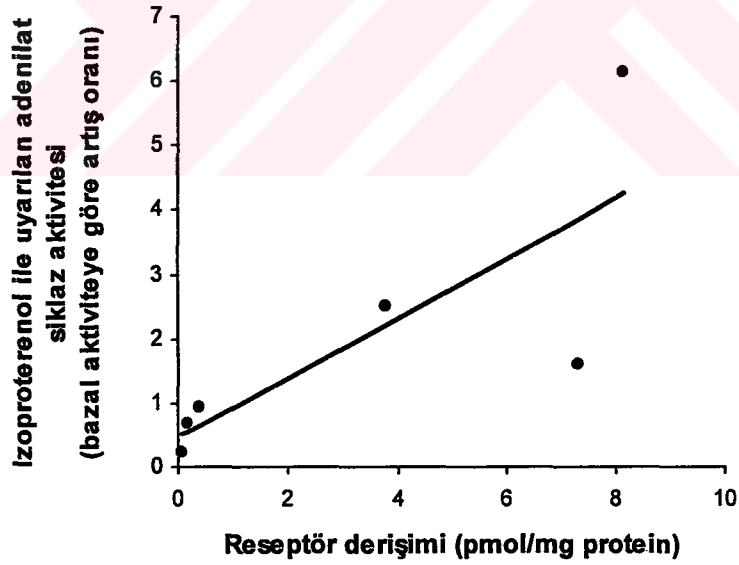
Şekil 9 Isoproterenol bağlanması üzerine histaminin etkisi mutlak bağlanma skalasında gösterilmiştir. Tüm deney koşulları şekil 7 deki gibidir.

TABLO I

Değişik CHO klonlarında ölçülen β -adrenoseptör yoğunlukları

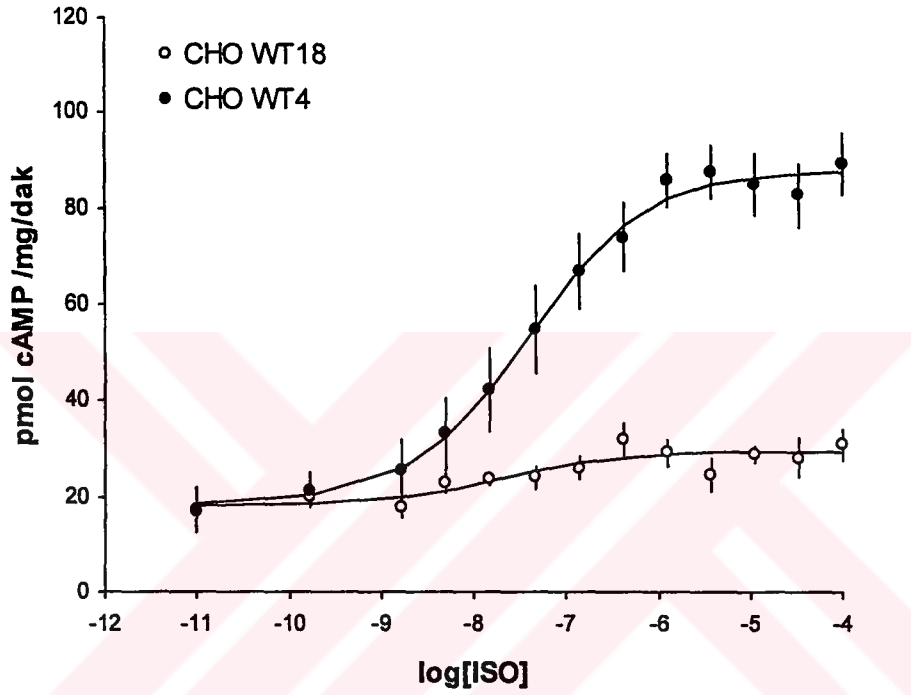
CHO klonu	R total pmol/mg
WT3	0.09
WT18	0.2
WT5	0.4
WT6	1.3
WT10	3.78
WT8	7.3
WT4	8.15

Hücre yüzeyindeki reseptörlerdeki artışın sinyal iletimine katıldığını göstermek için yapılan aktivasyon ölçümlerinde, reseptör konsantrasyonu ve isoproterenol ile uyarılan bazal aktiviteye göre artış oranı korele idi (şekil 10).



Şekil 10 CHO hücre membranlarında β_2 -AR ifade düzeyi (yatay eksen) ile isoproterenolün uyarabildiği adenilat siklaz aktivitesi (dikey eksen) arasındaki ilişki. Kullanılan 6 klonun reseptör yoğunlukları Tablo I de verilmektedir. İki değişken arasındaki korelasyon 0 dan farklıdır ($p < 0.05$)

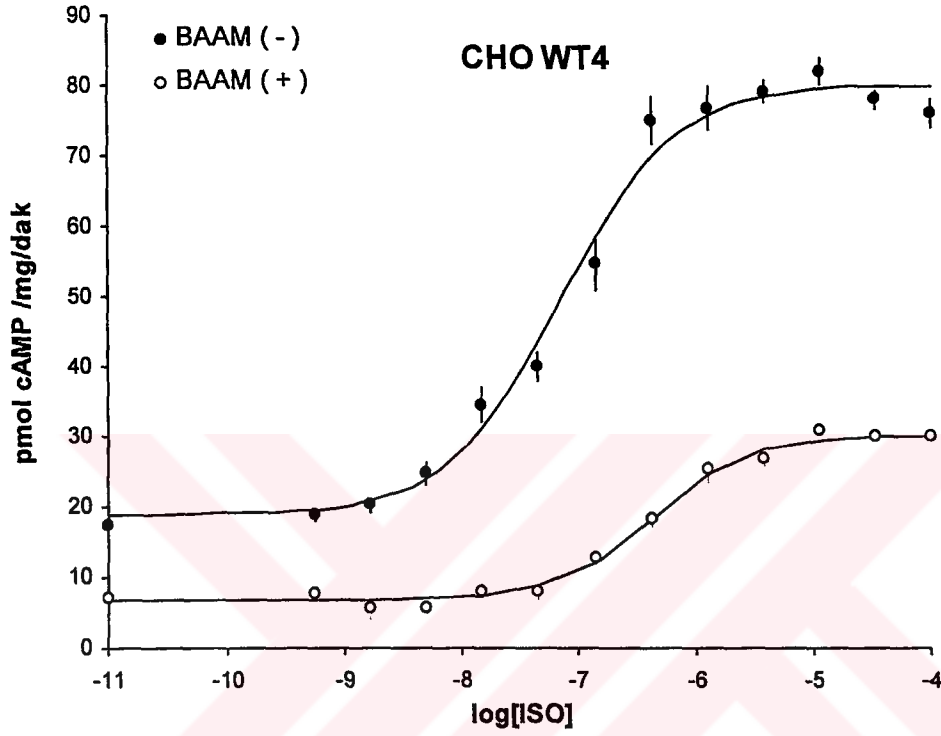
Endojen olarak farklı miktarda reseptör taşıyan klonlar olarak WT4 (8.15 pmol/mg) ve WT18 (0.2 pmol/mg) seçildi. Tersinmez antagonist uygulaması için WT4 klonu kullanıldı. Endojen olarak farklı miktarlarda reseptör taşıyan WT4 ve WT18 klonlarında isoproterenolle elde edilen konsantrasyon yanıt eğrilerinin EC_{50} 'leri ve bazal değerleri birbiriyle aynı idi, buna karşın isoproterenolle elde edilen maksimum yanıt WT18'de belirgin olarak azalmıştı (şekil 11).



Şekil 11 CHO WT18 ve WT4 klonları membranlarında isoproterenol ile uyarılabilir adenilat siklaz aktivitesi. İki derişim yanıt eğrisinin maksimum değerleri açıkça farklı iken isoproterenol EC_{50} leri (70 nM) her iki eğri için istatistiksel olarak aynı bulunmuştur. Veriler 6 adet üçlü deneyin ortalamasıdır (ort \pm sh).

Aynı deney normal WT4 hücreleri ve reseptör sayısı bir tersinmez antagonist olan BAAM ile ~%10'a kadar düşürülmüş WT4 hücrelerinde yapıldığında, aktivasyon modellerinde öngörülebildiği şekilde EC_{50} değeri sağa kaydı, isoproterenolle elde edilen maksimum yanıt azaldı ve bazal aktivite düştü (şekil 12). Bu sonuçlar CHO hücrelerinde β -adrenerjik reseptör-Gs-adenilat siklaz sinyal ileti sisteminin reseptör sayısı değişse bile EC_{50} ve bazal aktiviteyi koruyacak şekilde organize olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar tartışma bölümünde, bir katalitik model olan "encounter coupling

model" ve bir termodinamik denge modeli olan "quinternary complex model" çerçevesinde daha ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

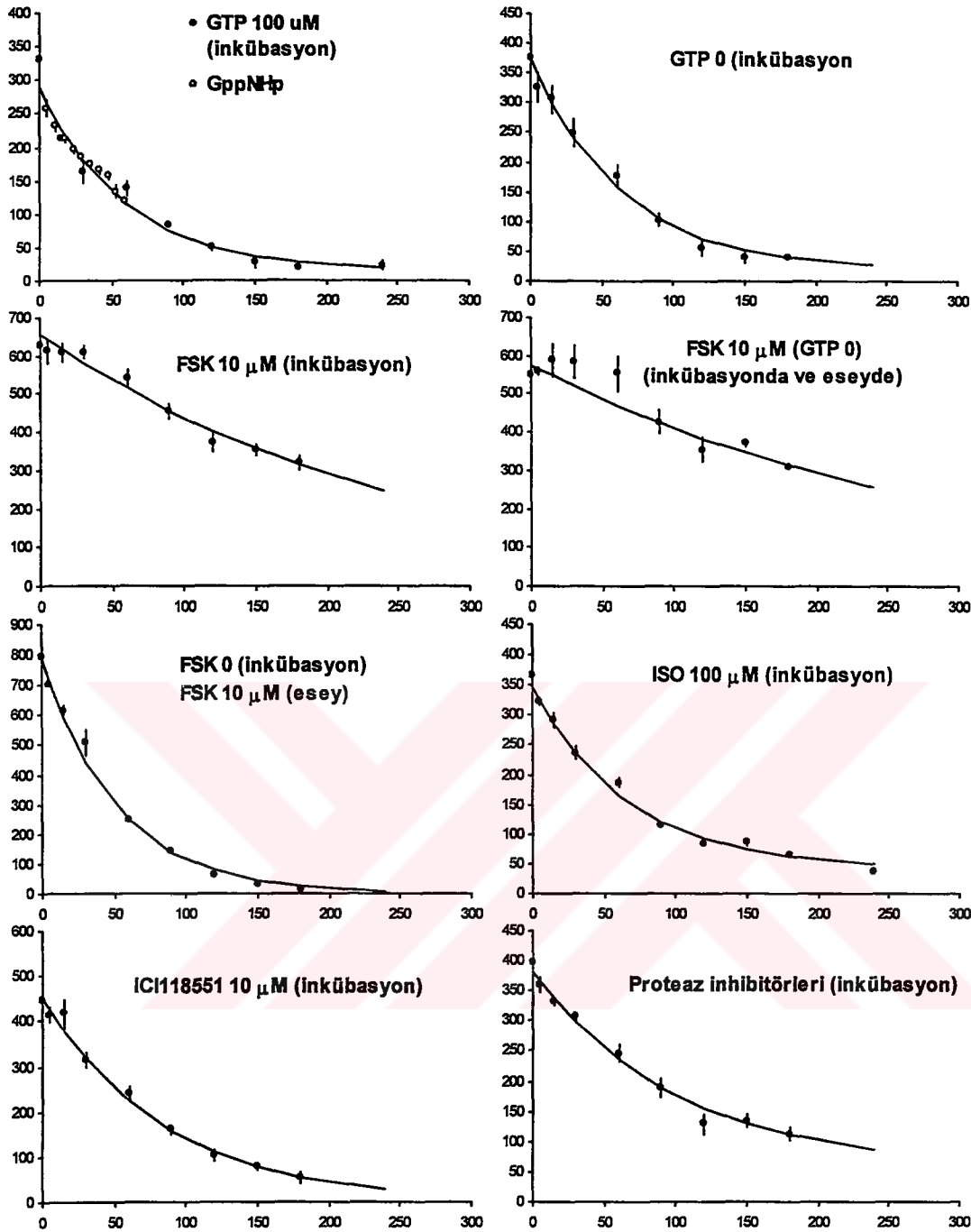


Şekil 12 CHO WT4 hücre membranlarında bromoasetilprenolol (BAAM 10^{-5} M, 30 dakika, 37°C) ile muamelenin isoproterenol yanıtları (adenilat siklaz aktivasyonu) üzerine etkisi. Yine şekil 11 deki gibi derişim yanıt eğrilerinin maksimumları açıkca farklıdır fakat bu kez isoproterenolün EC_{50} si BAAM ile muamele edilmiş membranlarda diğerlerine göre anlamlı olarak farklıdır (70 nM a karşı 425 nM) (ort \pm sh, n=6)

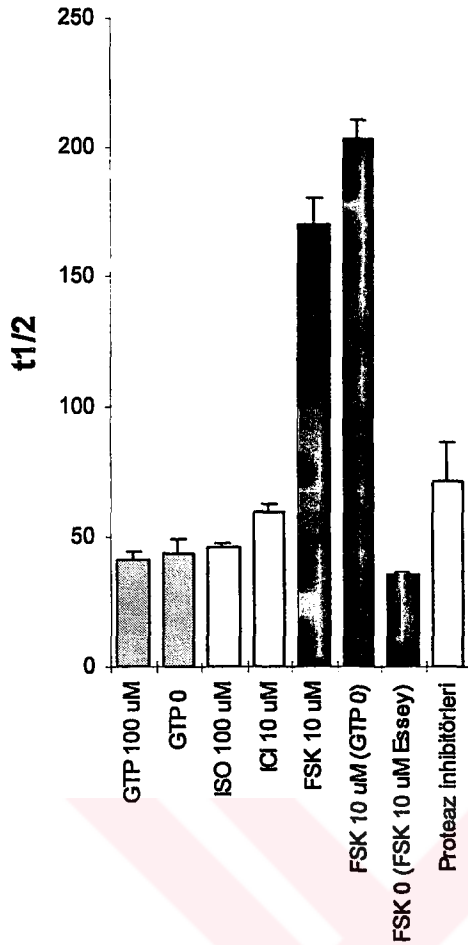
3.3. Adenilat siklazın aktivasyon durumu ile termal inaktivasyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi:

Çalışmanın bu bölümünde bazal aktivitesi yüksek fakat reseptörle aktivasyonu çok az olan kobay akciğer membranları ve bazal aktivitesi düşük fakat reseptörler aracılığı ile iyi uyarılabilen, yüksek konsantrasyonda insan β -adrenerjik reseptörü taşıyan CHO WT4 hücre membranları kullanıldı. Hücre membranları bazal şartlarda ve çeşitli aktivatör ligandlarla 37 °C'de inkübe edilerek bu şartların termal inaktivasyon hızlarına etkisi incelendi. İnaktivasyon hızları bir üssel işlevden tahmin edilen yarı ömür şeklinde verildi.

a) Kobay akciğer membranlarında elde edilen sonuçlar: kobay akciğer membranları bazal şartlarda inkübe edildiğinde yarı ömrü 48 dakika olacak şekilde adenilat siklaz aktivitesi azaldı. Sistemi Gs düzeyinde etkilemesi beklenen guanin nükleotidlerinin (GTP 100 μ M ve GppNHp 10 μ M) inkübasyon ortamına eklenmesi inaktivasyon hızında herhangi bir değişikliğe yol açmadı. Sistemi reseptör düzeyinde etkileyebilecek olan β -adrenerjik reseptör agonisti isoproterenol ve negatif antagonist olan ICI'nin inkübasyon ortamına eklenmesi de inaktivasyon hızında bir değişikliğe yol açmadı. Membran hazırlama işleminin proteazları büyük ölçüde uzaklaştırdığı bilinmekle beraber, bu olasılığı dışlamak için proteaz inhibitörlerinden oluşan bir kokteyl ile inkübasyon yapıldığında yine inaktivasyon hızında herhangi bir değişiklik saptanmadı. Böylece gözlenen inaktivasyonun enzimatik değil termal olduğu sonucuna varıldı. Bu deneylerde son olarak adenilat siklazla dolaysız olarak etkileşen ve adenilat siklazı aktive eden forskolin 10 μ M konsantrasyonda kullanıldı. Forskolinin inkübasyona eklenmeyip sadece esey ortamına eklendiği deneylerde yanıtların genel olarak daha yüksek olmasına rağmen inaktivasyon hızında herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Buna karşın forskolinin inkübasyon ortamına eklendiği deneylerde inaktivasyon hızında azalma gözlendi (yarı ömrü ~190 dak). Bu çalışmalar inkübasyon ortamına eklenen forskolinin adenilat siklazı termal inaktivasyondan koruduğunu göstermektedir. Tüm bu deneylerin verileri şekil 13 de ve elde edilen yarı ömürlerin bir özeti şekil 14'de sunulmuştur.



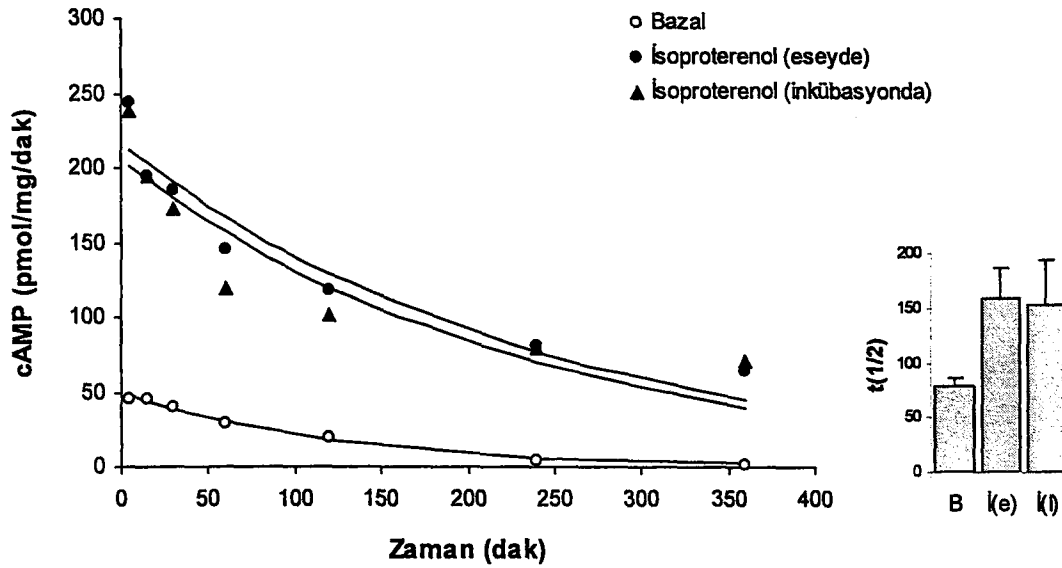
Şekil 13 Kobay akciğer membranlarının şekil üzerinde belirtilen koşullarda 37 °C de inkübasyonunun adenilat siklaz aktivitesi üzerine etkisi. Adenilat siklaz aktiviteleri yine belirtilen koşul ve zamanlarda inkübasyon ortamlarından alınan örneklerde ölçülmüştür. Inkübasyon ve adenilat siklaz eseyi ortamında yaratılan koşullar şekil üzerinde ayrı ayrı belirtilmişlerdir. Gösterilen veriler 4-6 bağımsız çift ya da üçlü deneyin ortalamalarıdır (ort \pm sh olarak gösterilmişlerdir). Sürekli eğriler verileri en iyi açıklayan tek bileşenli üssel ilişkilerin regresyonu sonucudur. Bu eğrilerin zaman sabitleri 14. Şekilde verilmiştir.



Şekil 14 Kobay akciğer membranlarının şekil üzerinde belirtilen koşullarda 37 C de inkübasyonunun adenilat siklaz aktivitesi üzerine etkisi. Düşey eksen ilgili koşullarda gözlenen siklaz aktivitesi azalmasının yarı zamanını göstermektedir. Bu değerler 13. Şekilde sunulan verilerin üssel regresyonundan saptanmıştır. Hata çubukları, regresyonda saptanan değerlerin asimptotik standart hatalarıdır (serbestlik dereceleri 18-52 arasındadır). Yapılan çapraz karşılaştırma inkübasyon ortamında forskolinin bulunduğu deneylerdeki yarı zamanın diğer tüm ölçümlerden farklı olduğunu, diğerlerinin ise kendi aralarında farklı olmadığını göstermektedir.

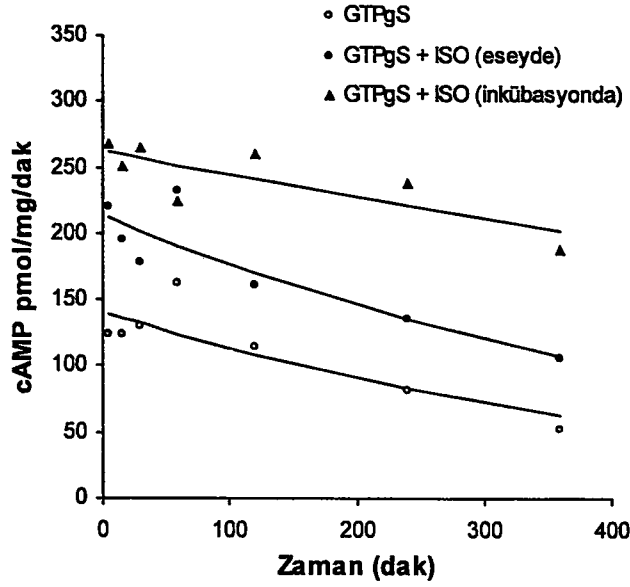
Kobay akciğer membranlarında agonistle uyarılabilen aktivite çok az olduğu için reseptör aracılı adenilat siklaz aktivasyonun termal inaktivasyona ve inaktivasyonun fonksiyonel yanıtlara etkisini incelemek için çalışmanın geri kalanında bazal aktivitesi düşük fakat reseptörler aracılığı ile iyi uyarılabilen, yüksek konsantrasyonda insan β -adrenerjik reseptörü taşıyan CHO WT4 hücre membranları kullanıldı.

b) WT4 hücre membranlarında elde edilen sonuçlar: WT4 hücre membranlarında da bazal adenilat siklaz aktivitesi yarı ömrü ~80 dakika olacak şekilde azaldı (37 derecede). Reseptör düzeyinde aktivasyonun adenilat siklazın termal inaktivasyon hızına etkisini incelemek için inkübasyon ortamına isoproterenol eklendiğinde ise siklaz inaktivasyon hızında görünüşte bir azalma oldu, ancak bu görünüş isoproterenolün inkübasyon ortamına konmayıp sadece esey ortamına konduğu paralel deneylerde de gözlemlendi (şekil 15).

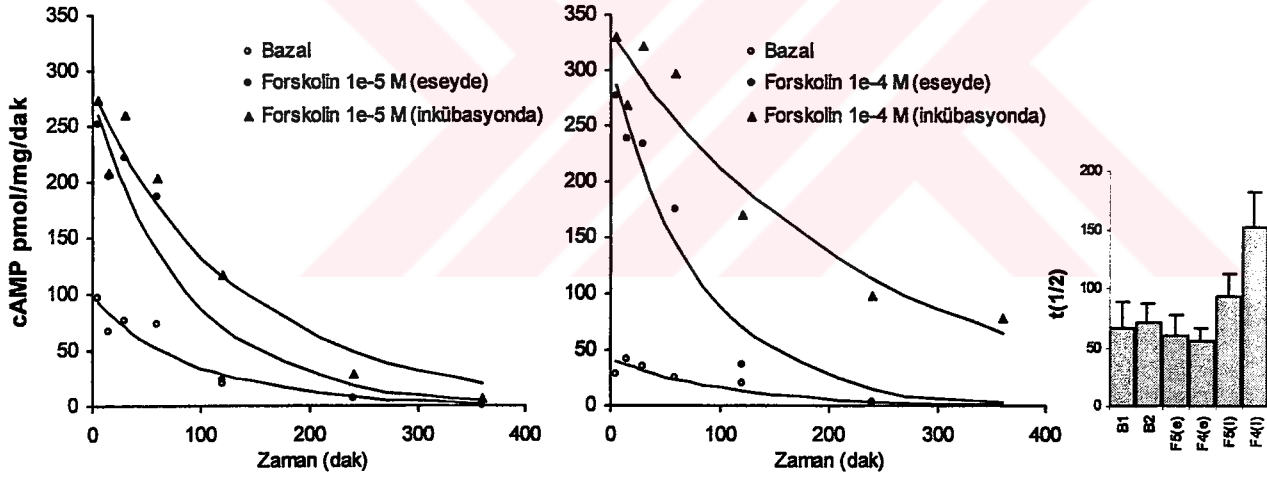


Şekil 15 CHO hücre membranlarının belirtilen koşullarda inkübasyonunun adenilat siklaz aktivitesi üzerine etkisi. Sol panelde adenilat siklaz aktivitesinin zamanla değişimi sağ panelde ise bu verilerin üssel regresyonundan elde edilen yarı zamanlar görülmektedir (burada B, l(e) ve l(i) sırasıyla basal, eseyde ve inkübasyonda isoproterenol anlamına gelmektedir). Deneyin genel tasarımı ve değerlendirmesi 15. şekildeki gibidir. Ancak bu deneyde veri sayısı daha azdır (n=3).

Her iki durumda elde edilen yarı ömürler tamamen aynı olduğu için, gözlenen bu etki reseptör aktivasyonunun termal inaktivasyon hızını azalttığı şeklinde yorumlanamaz ve tamamen farklı bir açıklama gerektirmektedir. Aktivatör olarak doğrudan G proteinlerini uyaran $GTP\gamma S$ ve isoproterenol kombinasyonu kullanıldığında ise benzer şekilde, hem bu maddelerin inkübasyon ortamına konmuş olması durumunda hem de yalnızca esey ortamında bulunduğu durumda inaktivasyon yarı ömrü arttı (şekil 16). Bu şartlarda yarı ömür çok fazla arttığı için bizim gözlediğimiz zaman noktaları inaktivasyon zaman eğrisinin çok küçük bir kısmını kaplayabildi. Bu nedenle, yarı ömürlerle ilgili yapılan tahminlerin güvenilirliği azdı. Bu tahminlerin yetersizliği nedeniyle $GTP\gamma S$ 'in inkübasyon ortamında bulunmasının gerçek bir koruma sağlayıp sağlamadığı ayırd edilemedi. Kobay akciğer membranlarında bir etkisi olduğu gösterilebilmiş tek madde olan forskolin denendiğinde, inkübasyon ortamında bulunması halinde doza bağımlı olarak inaktivasyon hızını azalttı. Buna karşın, forskolin sadece esey ortamına katıldığında (10 ve 100 μM konsantrasyonlarında), aktivasyonu arttırmakla beraber isoproterenol ve $GTP\gamma S$ 'den farklı olarak yarı ömürde her hangi bir değişiklik yapmadı (şekil 17).

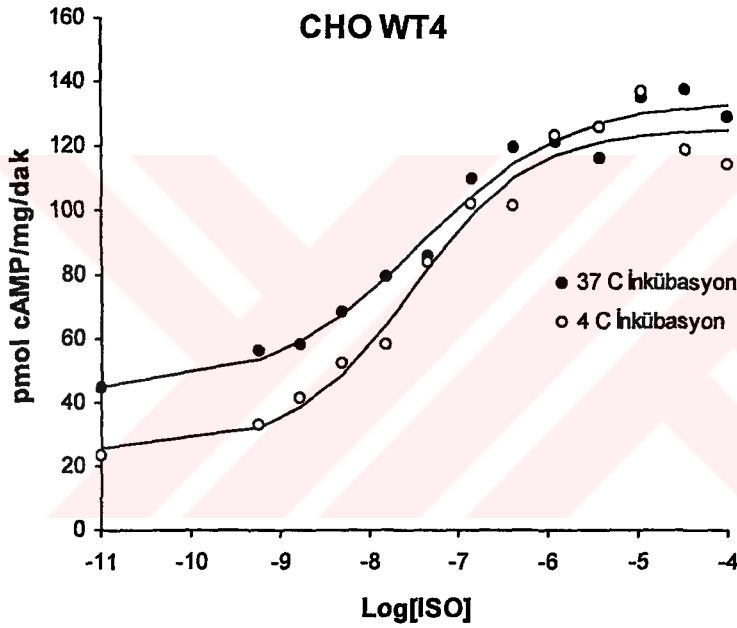


Şekil 16 CHO hücre membranlarının belirtilen koşullarda inkübasyonunun adenilat siklaz aktivitesi üzerine etkisi. Deney tasarımı ve değerlendirmesi 15. Şekildeki gibidir. Ancak bu koşullarda siklaz aktivitesindeki azalmanın deney süresine göre çok yavaş olması nedeniyle yarı zaman tahminleri yeterli güvenilirlikle yapılamamıştır.



Şekil 17 CHO hücre membranlarında forskolinin iki farklı derişiminin (ilk iki panel) inkübasyon ya da esey ortamında bulunmasının adenilat siklaz inaktivasyon zamanına etkisi. Deneyler 15. şekildeki gibi tasarlanmış ve sunulmuştur. Sağdaki bar grafikte inkübasyon ortamındaki forskolin derişimi ile inaktivasyon t $_{1/2}$ si arasındaki ilişki görülebilmektedir. Forskolinin esey ortamında bulunması [F5(e) ya da F4(e)] inaktivasyon hızını etkilememektedir. İki ayrı grup deneyden ölçülen bazal inaktivasyon yarı ömürleri ayrı ayrı gösterilmiştir (bu değerler arasında istatistiksel fark yoktur).

Bu sonuçlar, forskolinin bu sistemde de adenilat siklazı termal inaktivasyondan koruduğunu, ama diğer maddelerin adenilat siklazı forskolin ile aynı düzeyde aktive ettikleri halde enzimin aktivitesini "görünürde" korumadığını göstermektedir. Adenilat siklazın termal inaktivasyonunun, doz-yanıt ilişkisine etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, bazal aktiviteyi yarı yarıya azaltacak bir inkübasyon sonucunda, agonistle uyarılan maksimum yanıtta çok az bir azalma oldu ve agonistin potensi değişmedi (Şekil 18)



Şekil 18 CHO WT4 hücre membranlarının 37 ya da 4 °C de inkübasyonundan sonra elde isoproterenol derişim yanıt (adenilat siklaz aktivitesi) eğrileri. Diğer deneylerin sonuçları ile tutarlı olarak bazal aktivite beklendiği gibi bu sürede yaklaşık yarıya inmiş ancak maksimum yanıt değişmemiştir. İki eğrinin tahmin edilen EC₅₀ değerleri (~80 nM) arasında fark yoktur. Veriler, üçlü bir reprezentatif deneyin ortalamasıdır.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, G proteini aracılı sinyal ileti sisteminde sinyal ileti verimini etkileyecek çeşitli faktörler değişik açılardan incelendi. Bunlar üç ana başlık altında incelenebilir:

1. G proteinine kenetli sinyal ileti sisteminde aynı G proteini ve efektörü kullanan reseptörler arasında fonksiyonel ve bağlanma düzeyinde çapraz etkileşim olup olmadığı:
2. CHO hücrelerindeki β -adrenerjik reseptör-Gs-Adenilat siklaz sistemindeki aktivasyon mekanizmasının incelenmesi:
3. Adenilat siklazın aktivasyon durumu ile termal inaktivasyonu arasındaki ilişkinin ve inaktivasyon sonucu değişen sistemdeki, bazal ve farklı şekillerde uyarılmış aktivitelerinin incelenmesi:

4.1 Fonksiyonel düzeyde karşılıklı etkileşim:

Çalışmanın ilk kısmında, çeşitli hücre membranlarında aynı sinyal ileti sistemini kullanan farklı reseptörlerin ortak bir G proteini ve efektör havuzu kullanıp kullanmadığı incelendi.

G proteinlerine kenetli sinyal ileti sistemi birimlerinin hücre membranındaki konsantrasyonu diğer membran proteinlerine göre çok azdır. Bu sinyal ileti sisteminin çalışabilmesi kendini oluşturan birimlerin bir araya gelmesini gerektirdiğinden, bu sinyal ileti sisteminde verimi arttırmak için, alt birimlerinin membrandaki hareketlerinin kısıtlanıp lokalize edilmesi ereksel bir bakış açısından akla uygun gelmektedir. Sinyal ileti sistemi birimlerini çeşitli uygulamalarla görünür hale getirmeye dayanan yöntemlerde bu görüşü desteklemekte ve bu sistemlerin membranda organize yapılar oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu organizasyon içerisinde aynı sinyal ileti mekanizmasını kullanan farklı reseptörlerin ortak bir G proteini ve efektör havuzunu kullanıp kullanmadığına yönelik soruların cevapları ise daha çelişkilidir. Çeşitli hücreler ve reseptörlerde gerçekleştirilen çalışmalarda, her iki görüşü de destekleyebilecek gözlemler yapılmış ama problem için genel bir çözüme ulaşılamamıştır. Bazı gözlemler ortak bir havuzla açıklanabilirken, diğerleri farklı havuzları gerektirmektedir. Bu gözlemler, hücrelerin işlevsel

gereksinimleri doğrultusunda, her iki stratejide kullanabildiklerini düşündürmektedir.

Çok hücreli organizmalarda, hücrelerin bütün işlevleri çevreden gelen sinyallerle düzenlendiği için, hücre üzerine etkili sinyallerin hücre tarafından algılanması ve yanıtla dönüştürülmesi yaşamsal öneme sahiptir. Eğer hücre aynı sinyal iletimi ve efektör sistemini kullanan birden fazla reseptöre sahip ise iki farklı strateji ve bunların çeşitli oranlardaki karışımlarını kullanabilir. Birinci olasılık, farklı reseptörlerin G proteini ve efektör havuzlarının birbirinden tamamen ayrı olma durumudur. Bu durumda farklı reseptörlerin uyarılmasıyla ikincil haberci düzeyinde elde edilecek yanıtlar tamamen aditif olacaktır. Yani, her iki reseptörün aynı anda uyarılmasıyla elde edilecek ikinci haberci düzeyindeki yanıt, reseptörlerin tek başlarına uyarılması ile elde edilecek yanıtların aritmetik toplamına eşit olacaktır. İkinci olasılıkta ise, farklı reseptörler ortak bir G proteini ve reseptör havuzuna sahiptir ve bu havuz sistemin yanıtlarında doyurulabilir basamağı oluşturmaktadır. G proteini ve efektörün doyurulabilir olması nedeni ile böyle bir sistem reseptörlerin uyarısı ile satüre olacak ve iki farklı reseptörün birlikte uyarılması ile elde edilecek yanıt basitçe toplanabilir olmayacaktır. G proteini ve efektörün sistemin yanıtlarında doyurulabilir basamağı oluşturmaması, böyle bir gözlemin yapılabilmesi için, zorunlu koşuldur. Bu şartın yerine gelmediği, yani sisteme katılan bütün reseptörlerin maksimum uyarıldığında bile G proteini ve efektörü doymaktan uzak olduğu durumda, reseptörler ortak bir havuz kullanmasına rağmen, ikinci haberci düzeyinde elde edilen yanıt aditif olabilir. Bu nedenle, yanıtların aditif olarak gözlemlendiği bir yerde, bu iki olasılığı birbirinden ayırmak için reseptörün altındaki yanıt veren mekanizmanın, sonuçta doyurulabilir hale gelecek şekilde, konsantrasyonunun azaltılması gerekli olabilir.

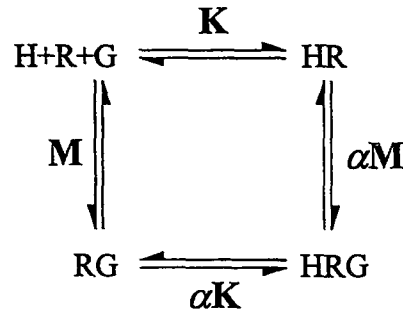
Bu çalışmada büyük ölçüde β -adrenerjik reseptör-Gs-adenilat siklaz sistemi incelenmiştir. Bununla birlikte, fonksiyonel düzeyde karşılıklı etkileşim çalışmalarında, Gi proteinine kenetli reseptörler kullanılmıştır. Bunun nedeni, Gi proteininin pertussis toksin aracılığı ile reseptörle olan kenetinin ortadan kaldırılabiliyor olması ve bu sayede gerektiğinde reseptör aracılığı ile aktive olabilecek Gi miktarının azaltılabiliyor olmasıdır (Fernando ve ark., 1985).

Sıçan kalbi membranlarında, muskarinik reseptör agonisti olarak asetilkolin ve α_2 adrenoseptör agonisti olarak klonidinin kullanıldığı ilk grup çalışmada,

bu reseptör sistemleri üzerinden Gi aracılı olarak oluşması beklenen adenilat siklaz inhibisyonu incelenmiştir. Her iki agonist de hem bazal hem forskolin ile uyarılmış adenilat siklaz aktivasyonunu baskılamıştır. İki agonist aynı anda uygulandıklarında ise ayrı ayrı oluşturdukları yanıtlardan ayırt edilemeyecek büyüklükte bir yanıt oluşturmuşlardır. Bu gözlem her iki reseptörün bu sistemde ortak bir sinyal ileti havuzu kullandığını düşündürmekle beraber, sistemin yanıtlarını kısıtlayan basamak hakkında bir şey söylememektedir. Aynı sonuçlar, reseptörlerin ortak bir doyurulabilir Gi havuzunu kullandığı durumda da, adenilat siklaz-Gi kenetinin her iki reseptör tarafından ayrı ayrı doyurulduğu durumda da elde edilebilir. Bu durumda iki reseptörün birlikte veya ayrı ayrı uyarılması ile oluşan yanıtların büyüklüklerindense, yanıtı oluşturan agonistlerin potenslerinin değişmesi beklenir. Ancak gözlediğimiz yanıtın ve potensde beklenen değişikliğin çok küçük olması nedeniyle bu iki olasılığı ayırt edebilecek deneyler gerçekleştirilememiştir.

4.2 Bağlanma düzeyinde çapraz etkileşim:

Fonksiyonel deneylerde karşılaşılan, G proteini-efektör kenetinin doyması sonucu ortaya çıkabilecek bu tür ayırt edilemeyecek durumları aşmak için uygulanabilecek diğer bir yöntem, efektörü aradan çıkararak doğrudan reseptör-G protein kenetini incelemek olabilir. Bu tür deneyler büyük ölçüde yalın TCM çerçevesinde değerlendirildiği için bu model hakkında bilgi vermek uygun olacaktır. TCM, bağlanma çalışmalarında aynı reseptör için, guanin nükleotidlerine ve agonist efikasisine duyarlı, iki farklı afinite durumunun gözlenmesini açıklamak için geliştirilmiştir. TCM, termodinamik denge modelleri içerisinde en basit olanıdır. Bu model birbirleri ile allosterik olarak etkileşebilen üç birim içerir; reseptör, G proteini ve agonist. Modele göre, G proteini ve agonist reseptörün farklı yerlerine bağlanarak birbirlerinin bağlanma afinitelerini artırırlar. Bu modelle ilgili bir şema şekil 19'da gösterilmiştir. Burada K çıplak reseptör ile agonist arasındaki afiniteyi, M çıplak reseptör ile G proteini arasındaki afiniteyi, α ise bu iki ligand arasındaki kenetlenme faktörünü göstermektedir. Agonist ligandlar için α birden büyüktür. Yani agonistin reseptöre bağlı olması reseptörün G proteinine olan afinitesini artırır. Standart serbest enerjinin korunması nedeniyle bunun tersi de doğrudur, Yani G proteininin reseptöre bağlanmasında agonist afinitesini aynı ölçüde artırır. Bu model çerçevesinde



Şekil 19 "Ternary Complex" tepkime şeması.

çıplak reseptör düşük afiniteli bağlanma bölgesi, reseptör-G proteini kompleksi yüksek afiniteli bağlanma bölgesi olarak düşünülebilir. Böyle bir sistemde agonistle yapılan bağlanmada ölçülen görünür afinite çıplak reseptöre olan afiniteden büyük olacaktır. Ortama guanin nükleotidlerin eklenmesi, G proteininin reseptöre olan kenetini ortadan kaldırarak agonist-reseptör kompleksinin düşük afiniteli forma dönüşmesine yol açar. Bağlanma düzeyinde bu durum konsantrasyon-bağlanma eğrisinin sağa kayması şeklinde gözlenir. Yüksek afinite, reseptör-G proteini kenetinin bir sonucu olduğundan, bu afiniteye guanin nükleotid eklendikten sonraki azalma miktarı, bu kenetin ölçütlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Reseptörler tarafından paylaşılan ve paylaşılmayan G proteinleri havuzları modellerinin böyle bir deney için farklı öngörülleri olabilmektedir. İki ayrı reseptörün ortak bir G proteini havuzunu kullandığı durumda, reseptörlerin birinin agonistle uyarılması agonist, reseptör ve G proteininden oluşan üçlü kompleksin miktarını artırarak ikinci reseptörün etkileşebileceği G proteini konsantrasyonunu azaltabilecektir. Buna bağlı olarak ikinci reseptörde yüksek agonist afinitesi bir miktar düşecek ve guanin nükleotidlere bağlı afinite kayması azalacaktır. Ancak bu durumun gözlenebiliyor olabilmesi için reseptöre bağlanmanın G proteini konsantrasyonunda belirgin bir azalma yapması gereklidir. G proteini miktarı reseptörlere göre çok yüksek ise reseptörlere bağlanma serbest G proteini konsantrasyonunda belirgin bir azalma yapmayacak sonuçta diğer reseptörde gözlenen yüksek afiniteli bağlanma etkilenmeyebilecektir. Farklı reseptörlerin farklı havuzlar kullandığı durumda ise G proteinleri paylaşılmadığı için bağlanma düzeyinde etkileşim görülmeyecek ve iki farklı reseptörün kendi ligandlarını bağlaması birbirlerinden tamamen bağımsız olacaktır.

Bu olasılıkları test etmek amacıyla, sıçan kalp mebranları ve kobay akciğer membranlarında, Gs proteinine kenetli olan β -adrenerjik, histaminerjik ve PGE₂ reseptör sistemleri incelenmiştir. Bu seçimin nedeni β -adrenerjik reseptör afinitesinin laboratuvar olanaklarımızla ölçülebiliyor olmasıdır. Her iki membranda, guanin nükleotide bağlı afinite kayması gözlenebildiğinden, bu tür bir deney için uygun görünmektedir. Bu deneylerde, diğer Gs proteinlerine kenetli reseptörlerin agonistlerinin birlikte uygulanmasının, referans reseptör olarak kullandığımız β -adrenerjik reseptörün isoproterenole olan afinitesine etkisi incelenmiştir.

Sıçan kalp membranlarında yapılan deneylerde histamin ve PGE₂ varlığında isoproterenol afinitesi farklı bulunmamıştır. Kobay akciğer membranlarında yapılan deneylerde ise PGE₂ varlığında isoproterenol afinitesinde bir fark bulunmazken, histamin varlığında yüksek afiniteli isoproterenol bağlanması azalmıştır. Fakat bu durum üç nedenle histamin ve β -adrenerjik reseptörlerin ortak bir Gs havuzu kullandıkları lehine kullanılamaz: 1) Histaminin oluşturduğu afinite kayması guanin nükleotidin oluşturduğu afinite kaymasından büyük görünmektedir. Bu durum söz konusu modelle açıklanamamaktadır. TCM'nin öngördüğü maksimum afinite kayması guanin nükleotidlerinininkine kadardır. 2) Histaminin varlığı bağlanma deneylerinde izleyici (tracer) olarak kullanılan iyodopindololün hem spesifik hem de daha önemlisi nonspesifik bağlanmasını etkilemektedir. İyodopindolol bir antagonist olduğu için böyle bir etki model tarafından öngörülmemektedir. 3) Histamin H1 (mepiramin) ve H2 (famotidin) antagonistleri histaminin bu etkisini geri çevirememiştir. Bu sonuçta histaminin bu etkileri reseptör aracılığı olmadan gerçekleştirdiğini göstermektedir. Gözlenen bu etki histaminin fizikokimyasal etkilerine bağlı nonspesifik bir etki gibi görünmektedir. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar, G proteini konsantrasyonunun reseptörlere göre çok fazla olma olasılığı dışlanamamakla birlikte, bu sinyal ileti sistemlerinde G proteinlerinin farklı havuzlarda olabileceğini düşündürmektedir.

4.3 R-G etkileşmesinin ayrıntıları

Sinyal iletimi sisteminin incelemenin diğer bir yolu da sinyal ileti sisteminin bir alt biriminin konsantrasyonunu değiştirerek, bunun sistemin yanıtları

üzerine etkisini incelemektir. Buna iyi bir örnek olarak Furchgott'ın yöntemi verilebilir (1966). Bu yöntem, bir tersinmez antagonist uygulanmasından önce ve tersinmez bir antagonistle reseptörlerin bilinmeyen bir miktarı agonist bağlayamaz hale getirildikten sonra elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrilerinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, sistem kapalı bir kutu olarak görülür ve aktivasyon mekanizması hakkında bir varsayım kullanılmaz. Hesapların yapılabilmesi için kullanılan tek varsayım aynı yanıtın gözlemlendiği agonist konsantrasyonlarında işgal edilen reseptör miktarının aynı olduğudur. Furchgott bu yöntemi kullanarak in vitro deneyler ile agonistlerin reseptörlere olan afinitesini doğru bir şekilde hesaplayabilmiştir. Bu yöntem sistemin gözlemlendiği andaki durumu hakkında bilgi vermekle beraber, eğer reseptör miktarları başlangıçtan beri farklı olsaydı, hücrenin düzenleyici mekanizmaları sonucu ortaya çıkabilecek değişiklikler hakkında bilgi vermemektedir.

Bu olasılığı test etmek amacıyla, içsel olarak farklı miktarda reseptör taşıyan membranlardaki ve reseptör miktarı başlangıçta aynı olup bir gruba tersinmez bir antagonistin uygulanmasıyla reseptör miktarı azaltılan membranlardaki agonistle uyarılan siklik AMP yanıtları karşılaştırıldı. Bu deneyler, endojen olarak farklı miktarlarda insan β -adrenerjik reseptör taşıyan CHO klonlarında gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda, reseptör miktarının tersinmez bir antagonistle azaltıldığı grupta, aktivasyon modellerinin ön görebildiği şekilde EC_{50} değeri sağa kaydı. Buna karşın içsel olarak farklı reseptör içeren hücrelerde EC_{50} değerinde farklılık gözlenmedi. Hücrenin reseptör, G proteini ve efektörden oluşan sinyal ileti sisteminin verimi üzerinde düzenleyici bir mekanizması olmayıp, yanıtı belirleyen tek şeyin bunların stokiometrisi olması durumunda, gözlenecek sonuç her iki grupta da aynı olması gerektiğinden, bu gözlemi açıklayabilmek için düzenleyici bir mekanizma hakkında varsayımlarda bulunmak gerekmektedir. İki farklı varsayımla bu gözlemi açıklayabilmek mümkündür.

a) Az reseptör taşıyan hücrelerde, sinyal ileti sisteminin stokiometrisi farklı olmakla birlikte, sistemin ileti verimi arttırılarak bu durum kompanse edilmiş olabilir. Forskolinin, düşük konsantrasyonlarda uygulandığı durumlarda, agonistlerin potenslerini arttırdığı gösterilmiştir (Darfler ve ark., 1982). Forskolinin bu etkisinin aktif $G_{s\alpha}$ -GTP'nin adenilat siklaza olan afinitesini arttırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durumda aynı miktarda aktif

Gs α -GTP ile daha çok adenilat siklaz işgal edilecek, bu da sistemde doyabilen bir basamağın varlığında, agonist potensinde bir artma ile sonuçlanacaktır. Foskolin benzeri etkilere sahip endojen bir maddenin varlığı, sistemi oluşturan bileşenlerin konsantrasyonlarının düzenlenmesi dışında, ikinci bir düzenleyici mekanizma olarak hizmet görebilir (Simonds, 1999).

b) Membranlarda bağlanma deneyleri ile ölçülen reseptör miktarı değişmekle beraber mikroskopik düzeyde reseptör-G proteini-adenilat siklaz stokiyometrisi korunmuş olabilir. Bu durum sistemin membranda birbirlerinden tamamen bağımsız sabit stokiyometrilik kompartmanlar halinde bulunmasını gerektirir. Böyle bir durumda reseptör sayısının artması bu sabit stokiyometreli kompartmanların sayısının artması ile sonuçlanacaktır. Böyle bir durum, reseptöre bağımlı bazal aktivitenin, reseptör aracılığı ile oluşturulabilen maksimum yanıtla orantılı olarak değişmesini öngörmektedir. Ancak yaptığımız deneylerde daha az reseptör taşıyan WT 18 hücre membranlarındaki bazal aktivite daha çok reseptör taşıyan WT 4 membranları ile aynı bulunmuştur. Bu durumu iki şekilde açıklamak mümkündür;

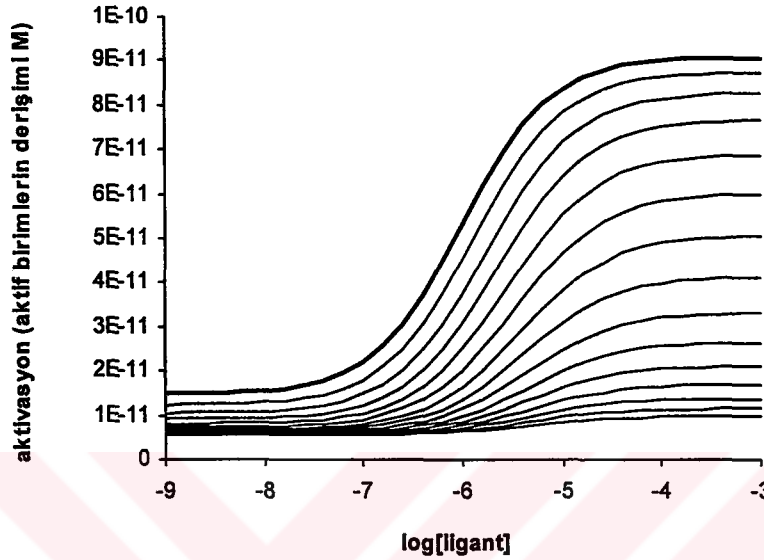
1) Çalıştığımız sistemde bazal adenilat siklaz aktivitesine reseptörlerin katkısı azdır. Bu nedenle reseptör sayısındaki değişme ölçülen bazal aktiviteye gözlenebilecek düzeyde yansımamaktadır.

2) Hücrelerde adenilat siklaz aktivasyonu, farklı reseptör konsantrasyonlarında bazal aktiviteyi benzer tutacak şekilde kontrol edilmektedir. Adenilat siklazın aktif Gs α -GTP dışında da bir çok düzenleyici mekanizması olduğundan bu durum kuramsal olarak mümkündür. Adenilat siklazın Gs α -GTP den bağımsız bir kontrolüne örnek olarak fosforilasyonu verilebilir (Simonds, 1999).

4.4 CHO hücrelerindeki β -adrenerjik reseptör-Gs-Adenilat siklaz sistemindeki aktivasyon mekanizmasının incelenmesi:

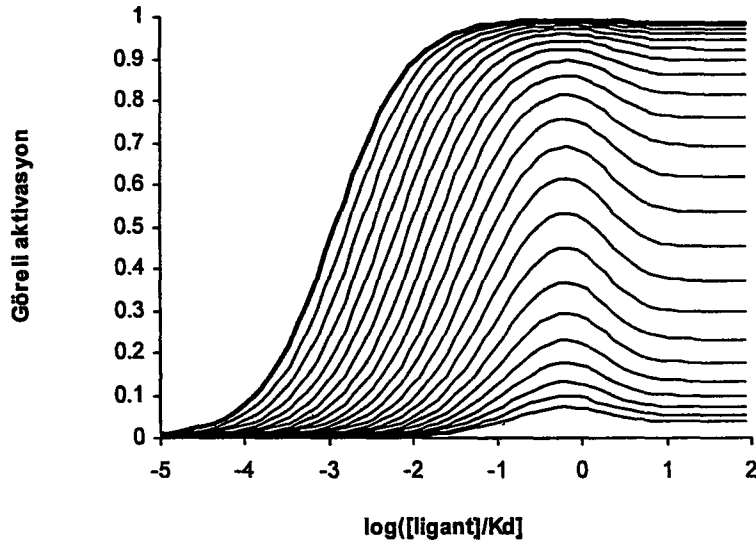
Bu bölümde, bir önceki bölümde tartışılan deneyler G proteinlerine kenetli reseptörlerde gözlenen deneysel sonuçları açıklamak için yaygın olarak kullanılan aktivasyon modelleri bakımından ele alındı. Reseptör sayısının tersinmez bir antagonistle azaltılmasının adenilat siklazın reseptör aracılı

aktivasyonuna etkisini incelemek için yaptığımız deneylerin sonuçları, bir katalitik model olan "encounter coupling" modelinin ve bir termodinamik denge modeli olan "quinternary complex" modelinin reseptör sayısındaki azalmayla ilgili ön görüleri çerçevesinde değerlendirildi. Her iki modele ait simülasyonlar şekil 20 ve 21'de gösterilmiştir.



Şekil 20 Reseptör sayısının ligantla uyarılabilir G proteini aktivitesine etkisini gösteren "Quinternary Complex" (beşli kompleks) modeli kullanılarak yapılmış bilgisayar simülasyonu. Bu simülasyonda kullanılan parametre değerleri şöyledir: *Reaksiyona giren türlerin toplam derişimleri (M)*: GTP:0.001, GDP: 10^{-8} , $G\alpha$: 10^{-10} , $G\beta\gamma$: $2 \cdot 10^{-9}$, *Türlerin etkileşimi ile ilgili koşulsuz afinite değerleri (M^{-1})*: K: 10^5 , M: 10^{10} , J_{GTP} : 10^7 , J_{GDP} : 10^7 , L: 10^{10} , *birinci derece termodinamik kenet sabitleri*: α :100, β_{GTP} :0.2, β_{GDP} :0.01, ϕ_{GTP} :0.9, ϕ_{GDP} :10, δ :0.1, *ikinci derece termodinamik kenet sabitleri*: γ_{GTP} :1, γ_{GDP} :1, ι :1. Toplam reseptör derişimi $9 \cdot 10^{-12}$ ile 10^{-9} molar arasında logaritmik olarak değişmektedir. Burada aktivasyon aktif türlerin toplam derişimi olarak ifade edilmektedir (GTP bağlamış ve $G\beta\gamma$ dan disosiyasyon olmuş tüm $G\alpha$ türlerinin toplam derişimi). Kalın eğri reseptör derişiminin en yüksek olduğu durumu göstermektedir. En düşük ve en yüksek reseptör derişimi ile elde edilen ligant EC_{50} değerleri arasında yaklaşık 10 kat fark bulunmaktadır. Parametrelerin anlamları, parametre değer aralıklarının seçimi ve modelle ilgili ayrıntılar için Onaran ve ark., 1992 ye bakınız.

Her iki model de deneylerde gözlenen EC_{50} kaymasını öngörebildiğinden, sadece bu sonuca dayanarak sistemimizde geçerli olan modeli saptamak mümkün olmamaktadır. Ancak, "encounter coupling" modeli β -AR-Gs-adenilat siklaz sistemini açıkladığı iddia edilen parametre değerlerinde (Stickle ve Barber, 1993) gözlemlerimize ters düşen, monotonik olmayan bir konsantrasyon-yanıt eğrisi öngörmektedir. Bu durum encounter coupling modelinin, en azından burada konu edilen sistem için, geçerliliğine gölge düşürmektedir.



Şekil 21 Reseptör sayısının ligantla uyarılabilir G proteini aktivitesine etkisini gösteren "Collision Coupling" modeli kullanılarak yapılmış bilgisayar simülasyonu. Bu simülasyonda kullanılan parametre değerleri şöyledir: *ligandın bağlanma ve ayrılma hız sabitleri* $k_{on}:7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off}:3.3 \text{ s}^{-1}$, *reseptör-G karşılaşması sırasında G nin aktivasyon hız sabiti* $k_g:6.9 \text{ 1/s}$, *G nin inaktivasyon hızı* $k_i:0.4 \text{ 1/s}$, *R-G karşılaşmasının ortalama süresi* $\tau:1 \text{ s}$. Burada reseptör derişimi modelin açık bir parametresi değildir. Dolayısıyla, bu simülasyonda modelin bir parametresi olan R-G karşılaşma frekansı (ω) reseptör sayısının doğrudan bir fonksiyonu olarak düşünülmüş ve bu parametre değiştirilerek farklı reseptör derişimleri simüle edilmiştir. Bu değer 30 ve 0.02 1/s arasında logaritmik olarak değiştirilmiştir. Kalın eğri en yüksek reseptör derişimine karşılık gelmektedir ($\omega = 30 \text{ 1/s}$). Model ve parametre seçimlerinin ayrıntıları için Stickle ve Barber, 1992'ye bakınız.

4.5 Adenilat siklazın aktivasyon durumu ile termal inaktivasyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi:

Termal inaktivasyon hızı, proteinin konformasyonuna bağımlı bir parametredir ve bu nedenle proteindeki konformasyon değişikliklerini ve aktivasyon durumunu izlemek için bir araç olarak kullanılabilir. Adenilat siklazın katalitik aktivitesinin de termal inaktivasyona uğradığı iyi bilinmektedir (Colvin ve Allen, 1991). Enzimin bu özelliğine dayanarak, enzimin çeşitli aktivasyon durumlarının inaktivasyon hızına etkileri incelenebilir ve farklı aktivasyon durumları varsa bu yöntemle birbirlerinden ayırt edilebilir. Fonksiyonel çalışmalardan iyi bilindiği gibi adenilat siklazı aktive eden bir çok uyarı olmasına rağmen, farklı adenilat siklazlar arasında en az ayırım yapan iki ana aktivatör, aktivatör guanin nükleotid bağı G α ve forskolindir. Aktive

olmuş serbest $G_{s\alpha}$ normal fizyolojik şartlarda reseptör aracılığı ile guanin nükleotid bağlanma bölgesindeki GDP'nin GTP ile yer değiştirmesi ve heterotrimerin alt birimlerine ayrılması ile oluşur. Hidrolize olmayan GTP analoglarının ortama katılmasında, benzer şekilde aktivasyona yol açabilir. Aktive olmuş $G_{s\alpha}$ adenilat siklaz ile bir kompleks oluşturarak onu aktif hale getirir. Bitkisel bir diterpen olan forskolin de doğrudan adenilat siklaza bağlanarak enzimi aktif hale getirebilir.

Bu çalışmada termal inaktivasyon hızı ile aktivasyon durumu arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla, bazal aktivitesi yüksek fakat reseptörle aktivasyonu çok az olan kobay akciğer membranları ve bazal aktivitesi düşük fakat reseptörler aracılığı ile iyi uyarılabilen, yüksek konsantrasyonda insan β -adrenerjik reseptörü taşıyan CHO WT4 hücreleri kullanıldı. Bu deneyler kobay akciğerlerinde yapıldığında, adenilat siklaz aktivitesinin reseptör aktivasyonuna bağlılığının çok az olmasından beklenebileceği gibi, reseptör ve G proteini üzerinden etki eden maddelerin adenilat siklaz inaktivasyon yarı ömrüne etkisi gözlenmedi. Aktivatör ligand olarak forskolinin kullanıldığı deneylerde ise, forskolin 10 μ M konsantrasyonda inkübasyon ortamına eklendiğinde adenilat siklazın yarı ömrünü belirgin olarak arttırdı. Forskolinin sadece esey ortamına katılması ise siklik AMP oluşumunu genel olarak arttırmasına rağmen inaktivasyon hızında bir değişiklik yapmadı. Bu durum forskolin ile bağlı durumdaki adenilat siklazın termal inaktivasyona daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bu deney sisteminde reseptör ve G proteini aracılı aktivasyon iyi izlenemediğinden, bu birimler üzerinden etki gösteren ligandların etkisini gözlemek amacıyla CHO WT4 membranlarında da benzer deneyler gerçekleştirildi. Bu deneylerde de forskolin 10 ve 100 μ M konsantrasyonlarında inkübasyon ortamına eklendiğinde, kobay akciğer membranlarındakine benzer şekilde, adenilat siklaz inaktivasyonunu doza bağlı bir şekilde yavaşlattı. Forskolin sadece esey ortamına katıldığında ise inaktivasyon hızında herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Reseptör düzeyinde aktivasyonun adenilat siklazın termal inaktivasyon hızına etkisini incelemek için inkübasyon ortamına isoproterenol eklendiğinde ise siklaz inaktivasyon hızında görünüşte bir azalma oldu, ancak bu görünüş isoproterenolün inkübasyon ortamına konmayıp sadece esey ortamına konduğu paralel deneylerde de gözlendi. Yani adenilat siklazın bazal aktivitesi ve isoproterenolle uyarılabilen aktivitesi farklı hızlarla inaktive oluyormuş gibi gözükmekteydi. Aktivatör olarak doğrudan G proteinlerini uyaran $GTP\gamma S$ ve

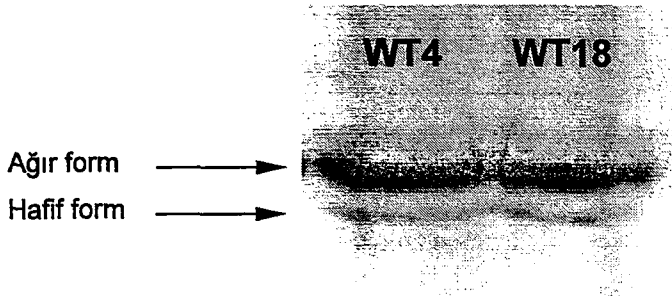
isoproterenol kombinasyonu kullanıldığında ise benzer şekilde, hem bu maddelerin inkübasyon ortamına konmuş olması durumunda hem de yalnızca esey ortamında bulunduğu durumda inaktivasyon yarı ömrü arttı. Bu şartlarda yarı ömürlerle ilgili güvenilir tahminler yapılamadı. Bu tahminlerin yetersizliği nedeniyle GTP γ S'in inkübasyon ortamında bulunmasının gerçek bir koruma sağlayıp sağlamadığı ayırd edilemedi. Bu durum, aktivatör ligandların sadece inkübasyon ortamına katılıp elde edilen sonuçların bazal ile karşılaştırılmasının yanıltıcı olabileceğini göstermektedir.

Elde ettiğimiz sonuçları açıklayabilecek üç olasılık ileri sürülebilir.

1) Adenilat siklazın termal inaktivasyonu çok iyi bir şekilde gösterilmiş olmakla birlikte, sistemde inaktive olan birimin adenilat siklaz olmayıp daha önceki bir basamak olduğu ileri sürülebilir. Örneğin, Gs düzeyinde olan bir inaktivasyon böyle bir gözleme yol açabilir. Gs proteininin aynı genden köken alan, ağır ve hafif olmak üzere iki türü mevcuttur. Ağır formun reseptör-Gs-adenilat siklaz sisteminin spontan aktivasyonuna yol açabildiği buna karşın hafif formun reseptöre agonist bağlanmadıkça sessiz olduğu ileri sürülmüştür (Seifert ve ark., 1998). Bu durumda adenilat siklazı bazal şartlarda aktif hale getiren ağır form hafif forma göre daha hızlı inaktive oluyor ise bizim sonuçlarımıza benzer bir sonuç elde edilebilecektir. Ancak bu görüşün geçersizliği şu şekilde ortaya konabilir:

a) 6 saat 37 °C ve 4 °C'de inkübe edilmiş membranlarda yapılan bağlanma deneylerinde guanin nükleotidlere bağlı agonist afinitesindeki kayma belirgin olarak değişmemiştir (veriler gösterilmedi). Bu durum reseptör-G proteini kenetinin sağlam olduğunu düşündürmektedir.

b) Poliakrilamid-Sodyumdodesilsülfat jel elektroforezi ve immünoblotting yapıldığında kullandığımız CHO membranlarında büyük oranda (reseptör sayısından bağımsız olarak) ağır form gözlenmektedir.(şekil 22).



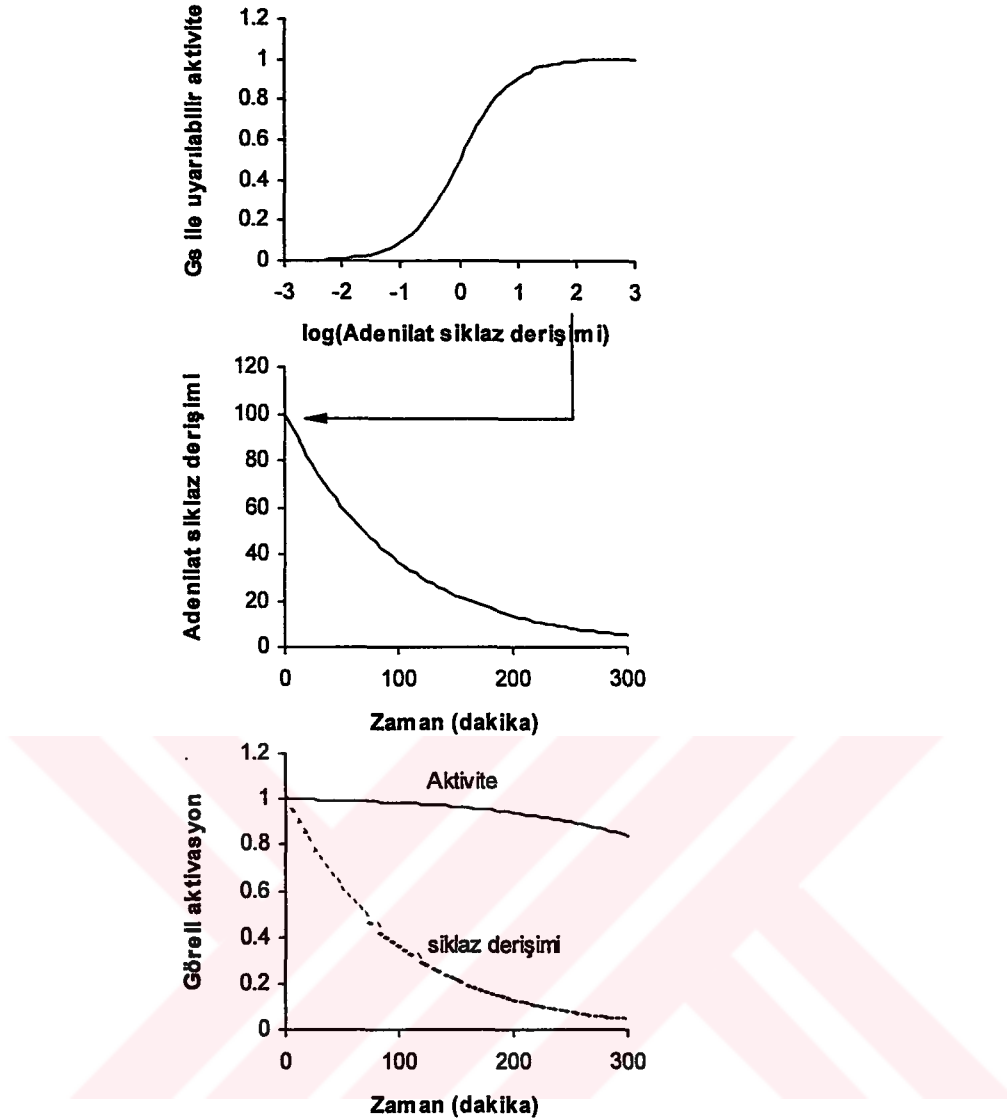
Şekil 22 CHO WT4 ve WT18 hücre membranlarından SDS-PAGE den sonra elde edilen Gs proteini immünoblotları. Her iki hücre klonunda da Gs proteininin ağır formu gözlenen immünoaktivitenin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Ayrıca Gs proteini ifadesinde klonlar arasında gözlenebilir bir fark yoktur.

c) Forskolin adenilat siklazı reseptör-Gs proteini aracılığı olmadan doğrudan uyarabildiğinden, forskolinin esey ortamına katıldığındaki inaktivasyon hızının bazal hız ile aynı olması bu görüşle açıklanamaz. Eğer bu görüş doğru olsaydı, forskolinle uyarılan aktivitede inkübasyon süresi boyunca önemli bir değişiklik beklenmeyecekti. Oysa esey ortamında forskolinin bulunduğu deneylerde gözlenen siklaz aktivitesi azalış hızı ile basal şartlarda gözlenen hız aynı bulundu.

2) Çalıştığımız CHO hücrelerinde birden fazla tür adenilat siklaz var olabilir ve bazal adenilat siklaz aktivasyonuna katkısı daha çok olan adenilat siklaz daha hızlı inaktive oluyor olabilir. Memeli hücrelerinde 9 farklı adenilat siklaz olduğu ve bunların bireysel inaktivasyon hızları hakkında her hangi bir bilgi olmadığı için bu olasılığı dışlamak zor görünmektedir. Ancak forskolinle yapılan deneylere dayanarak dolaylı da olsa bu olasılığın düşüklüğünü göstermek mümkündür. Adenilat siklaz 9 dışındaki bütün memeli adenilat siklazları forskolinle aktive olabilmektedir. Forskolinin esey ortamına eklenmesi durumunda inaktivasyon hızının bazal ile aynı olması termal inaktivasyon hızı farklı iki adenilat siklaz olma olasılığını düşürmektedir. Çünkü eğer adenilat siklaz 9 hariç her hangi bir enzim inaktive olmuyor olsa idi bu durumda, isoproterenol ve guanin nükleotid deneylerine benzer şekilde, forskolinin sadece esey ortamına eklenmesi yarı ömürde bir artmayla sonuçlanmalıydı.

3) Çalıştığımız CHO WT4 sisteminde adenilat siklaz düzeyinde bir rezerv bulunması durumunun gözlemlerimizi açıklayabilmesi mümkündür. Reseptör, Gs ve adenilat siklazdan oluşan sistemde, adenilat siklaz sistemin geri

kalanını doyurabiliyor ise, reseptör-Gs aracılı yanıtların adenilat siklaz konsantrasyonundaki azalmaya duyarlılığı az olacaktır. Adenilat siklaz enziminin kendisi birinci derece bir kinetiğe uyarak inaktive oluyorsa bile bunun reseptör-Gs aracılı yanıtlara yansması daha geç olacaktır. Bu durum reseptör-Gs aracılı yanıtların yarı ömrünün daha uzun görünmesine yol açabilir. Bu durumla ilgili bir simulasyon şekil 23'de sunulmuştur. Buna karşın uyarılmamış adenilat siklazın bazal aktiviteye etkisi belirgin ise, burda gözlenen hız adenilat siklazın inaktivasyonunu daha iyi yansıtacaktır. Forskolin de benzer şekilde doğrudan adenilat siklazı uyarabildiğinden, sadece esey ortamına katıldığında bazala benzer bir patern izlenecektir. Bu durum gözlemlerimizle uyuşmaktadır. Böyle bir durumun diğer bir öngörüsü, adenilat siklaz konsantrasyonundaki küçük oynamaların reseptör aracılığı ile oluşan agonist yanıtlarının potenslerinde büyük bir etki yapmamasıdır. Bu durumu değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, bazal aktiviteyi yarı yarıya azaltacak bir inkübasyon sonucunda, bu görüşü destekler şekilde, agonistle uyarılan maksimum yanıtta çok az bir azalma oldu ve agonistin potens değişmedi (Şekil 18).



Şekil 23 Gs ile uyarılabilir adenilat siklaz aktivitesinde adenilat siklaz rezervi hipotezinin verileri açıklayabildiğini gösteren bilgisayar simülasyonu. **Birinci panel:** Siklaz derişimiyle uyarılabilir aktivite arasındaki hipotetik ilişki görülmektedir (3 parametrelili lojistik). Siklaz derişimi afinitenin fraksiyonu olarak verilmiştir. **İkinci panel:** Yarı ömrü 90 dakika olan bir üssel azalma görülmektedir. Siklazın başlangıç derişimi, rezervi simüle edebilmek için yanıtı doyuracak düzeyde seçilmiştir (100 birim). **Üçüncü panel:** Yukarıdaki iki koşuldan hesaplanmış görünür siklaz aktivitesinin zamanla azalışı görülmektedir. Siklaz derişimindeki azalma da (ikinci paneldeki eğri) aktivitenin azalma hızındaki görünür farkı gösterebilmek için grafiğe eklenmiştir. İki değişkeni aynı grafikte gösterebilmek için her iki değişkenin değerleri başlangıç değerlerine göre düzeltilmiştir.

5. SONUÇLAR

1) Sıçan kalp membranlarında, asetilkolin ve klonidinin Gi aracılığı ile adenilat siklazı baskılayıcı etkileri birbirlerinden bağımsız değildir. Bu durum, aktivasyon mekanizmasında reseptörler tarafından ortak kullanılan doyurulabilir bir basamağın olduğunu düşündürmektedir (Gi ve/veya adenilat siklaz).

2) Sıçan kalp mebranları ve kobay akciğer membranlarında, Gs proteinine kenetli olan β -adrenerjik, histaminerjik ve PGE₂ reseptör sistemlerinde yapılan bağlanma çalışmalarında ortak bir havuz düşündürecek sonuçlar gözlenmemiştir. Ancak buna benzer sonuçların, Gs proteininin reseptörlere göre çok miktarda olduğu durumlarda, ortak bir havuzun kullanılmasına rağmen, elde edilebileceği göz önünde tutulmalıdır.

3) CHO Hücrelerinde, β -adrenerjik reseptör miktarı içsel olarak farklı olan membranlarda ve başlangıçta aynı olan reseptör miktarının tersinmez bir antagonistle azaltıldığı membranlarda, reseptör aracılı aktivasyon değerlendirildiğinde birbirinden farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu durum, aktivasyon mekanizmasının, hücre tarafından, reseptör miktarına göre yeniden düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

4) Tersinmez antagonistle yapılan deneylerin sonuçları hem "encounter coupling" model hem de "quinternary complex" model tarafından öngörülebilmektedir. Ancak, "encounter coupling" modeli β -AR-Gs-adenilat siklaz sistemini açıkladığı iddia edilen parametre değerlerinde, gözlemlerimize ters düşen, monotonik olmayan bir konsantrasyon-yanıt eğrisi öngörmektedir.

5) Adenilat siklaza bağlanarak doğrudan aktive edebilen bir ligand olan forskolin, kobay akciğerlerinde ve CHO WT4 hücrelerinde adenilat siklazın termal inaktivasyon hızını azaltmaktadır. Bu durum ilk bakışta forskolinin adenilat siklazı Gs proteininden farklı bir aktivasyon durumuna getirdiğini düşündürebilir. Ancak, kobay akciğer membranlarında reseptör aracılı uyarının düşük olması sonuçları böyle yorumlamayı güçleştirmektedir. Öte yandan, CHO WT4 hücre membranlarında, isoproterenol ve GTP γ S sadece esey ortamına eklendiğinde, inkübasyon ortamına eklendiği duruma benzer sonuçlar elde edilmektedir (her iki durumda da inaktivasyon hızları benzer

şekilde azalmaktadır). Dolayısıyla, Gs-aracılı aktivasyonun adenilat siklaz üzerindeki etkisi gerçekten forskolin aracılı aktivasyonunkinden farklı görünmektedir. Bu durumun bilinmesi, literatürdeki benzer deneylerin sonuçlarının yorumlanmasında yardımcı olabilir.



ÖZET

Burada sunulan çalışma, G-proteini aracılı sinyal iletiminde, özellikle de β -adrenerjik reseptör-Gs-adenilat siklaz sisteminde sinyal ileti veriminin düzenlenmesine katkıda bulunabilecek üç noktayı araştırmak üzere tasarlanmıştır:

1. *G proteinine kenetli sinyal ileti sisteminde aynı G proteini ve efektörü kullanan reseptörler arasında fonksiyonel ve bağlanma düzeyinde çapraz etkileşim olup olmadığı*: Sinyal ileti sisteminin alt birimlerinin membranda sınırlanmaksızın hareket edebileceğini varsayan aktivasyon modelleri, en azından bazı koşullarda, aynı G proteini ve efektörü kullanan reseptörlerden birinin aktivasyonunun diğerinin aktivasyon verimini etkileyeceğini öngörmektedir. Bu olasılığı test etmek için yapılan deneylerin verileri şu şekilde yorumlandı: Kalp membranlarında, G_i aracılı adenilat siklaz inhibisyonunda, muskarinik ve alfa2 reseptörlerinin etkinliği birbirlerinden bağımsız değildir. Yani bu reseptörler, ortak bir doyurulabilir G proteini ve/veya adenilat siklaz havuzu kullanmaktadır. Buna karşın, bağlanma düzeyinde ortak bir G proteini havuzu kullanılıp kullanılmadığını test etmek amacıyla Gs proteinine kenetli reseptör sistemlerinde (β -AR, PGE_2 ve histamin) yapılan deneylerde ortak bir havuz düşündürecek bir sonuç gözlenmedi.

2. *CHO hücrelerindeki β -adrenerjik reseptör-Gs-Adenilat siklaz sistemindeki aktivasyon mekanizmasının incelenmesi*: Reseptör sayısının tersinmez bir antagonistle azaltılmasının adenilat siklazın reseptör aracılı aktivasyonuna etkisini incelemek için yapılan deneylerin sonuçları, bir katalitik model olan "encounter coupling" model ve bir termodinamik denge modeli olan "quinternary complex" model çerçevesinde değerlendirildi. Her iki model de gözlenen EC_{50} kaymasını öngörebildiğinden, sadece bu sonuca dayanarak sistemde geçerli olan modeli saptamak mümkün olmadı. Ancak, "encounter coupling" modeli β -AR-Gs-adenilat siklaz sistemini açıkladığı iddia edilen parametre değerlerinde, gözlemlerimize ters düşen, monotonik olmayan bir konsantrasyon-yanıt eğrisi öngörmektedir. Bu durum "encounter coupling" modelinin, en azından burada konu edilen sistem için, geçerliliğine gölge düşürdüğü sonucuna varıldı.

Yine bu konuda diğer bir yaklaşım olarak farklı miktarlarda β -adrenerjik reseptör taşıyan CHO hücreleri kullanıldı ve agonistle uyarılabilir adenilat siklaz aktivasyonu yukarıda belirtilen deneylerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. İçsel olarak farklı miktarda reseptör içeren hücrelerde, yukarıdaki durumdan farklı olarak, EC_{50} değerinde farklılık gözlenmedi. Bu gözlem, sistemi oluşturan birimlerin membranda serbest olarak hareket edebildiğine dayanan aktivasyon modelleri ile açıklanamadığı için, CHO hücrelerindeki β -adrenerjik reseptör-Gs-Adenilat siklaz sisteminin fonksiyonel yanıtın bir parametresini (EC_{50}) koruyabilecek şekilde hücre membranında organize olabileceğini düşündürmektedir.

3. *Adenilat siklazın aktivasyon durumu ile termal inaktivasyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi:* Çalışmanın bu bölümünde bazal aktivitesi yüksek fakat reseptörle aktivasyonu çok az olan kobay akciğer membranları ve bazal aktivitesi düşük fakat reseptörler aracılığı ile iyi uyarılabilen, yüksek konsantrasyonda insan β -adrenerjik reseptörü taşıyan CHO WT4 hücre membranları kullanıldı. Bu deneyler kobay akciğerlerinde yapıldığında reseptör ve G proteini üzerinden etki eden maddeler adenilat siklazın inaktivasyon yarı ömrünü etkilemezken, bir siklaz aktivatörü olan forskolin inaktivasyon yarı ömrünü belirgin olarak artırdı. Bu deneyler, CHO WT4 membranlarında yapıldığında, forskolin, kobay akciğerinde olduğu gibi, adenilat siklaz inaktivasyonunu yavaşlattı. Fakat bu sistemde reseptör ve G proteini aracılı aktivasyon yapan isoproterenol ve $GTP\gamma S$ de siklaz inaktivasyon hızını (görünüşte) yavaşlattı. Ancak bu görünüş isoproterenol ve $GTP\gamma S$ 'in inkübasyon ortamına konmayıp sadece esey ortamına konduğu paralel deneylerde de gözlemlendi. Bu sonuç CHO WT4 sisteminde adenilat siklaz düzeyinde bir rezerv bulunduğu şeklinde yorumlandı.

Böyle bir rezervin varlığında agonist potensinin adenilat siklaz konsantrasyonundaki küçük oynamalara duyarlı olmayacağı düşünülürdü. Bu durumu değerlendirmek için yapılan çalışmada bazal aktiviteyi yarı yarıya azaltacak bir inkübasyondan sonra gerçekten de agonistle uyarılan maksimum yanıtta çok az bir azalma oldu ve agonistin potensisi değişmedi.

SUMMARY

The present study was undertaken to investigate three points that may contribute to the regulation of signaling efficiency of G protein-mediated signal transduction, with particular reference to β -adrenoceptor-Gs-adenylate cyclase system:

1) *The existence of "cross-talks" between receptor systems that use a common G protein and/or a common effector.* The activation models, which are based on the assumption that the components of the signal transduction system can freely diffuse in the plasma membrane, conditionally predict that the stimulation of one receptor system may affect the signaling properties of another receptor system that uses the same G protein and effector. This prediction was tested for muscarinic and α_2 -adrenergic receptors in rat ventricular membranes, and for β -adrenergic, histamine and PGE₂ receptors in guinea-pig lung parenchymal membranes. The results showed that inhibition of adenylate cyclase by the stimulation of muscarinic and α -adrenergic receptors was not independent from each other, suggesting that these receptor systems use apparently the same physical pool of Gi and/or adenylate cyclase. On the other hand, no results, that may suggest such a dependence between receptor systems, were obtained in lung parenchymal membranes when the interaction of β -adrenergic, PGE₂ and histamine receptors were evaluated at the ligand binding level.

2 *Mode of coupling between β -AR, Gs and adenylate cyclase in β -AR-transfected CHO cell membranes.* The effect of variation of receptor number on the receptor-mediated adenylate cyclase stimulation was evaluated in the framework of encounter coupling or quaternary complex model. In the first place, variation of receptor number was achieved by using an irreversible antagonist (bromoacetylalprenolol) in high-receptor expressing CHO clones. EC₅₀ value of isoproterenol in stimulating adenylate cyclase was found to be a function of receptor number. However, this observation alone was not discriminative between the models, for they both predict such a dependence. Nevertheless, the encounter coupling model, with the parameter values that have been claimed to explain the β -AR system, predicted nonmonotone concentration-response curves, which was not the case experimentally and thus threaten the validity of the model in this experimental system.

In the second place, concentration-cyclase activity curves were evaluated in cell clones that express different amount of β -AR. Unlike in the case of irreversible antagonist, no difference was observed in the EC₅₀ values for isoproterenol in these cells. Considering that such observations all together can not be explained by the theoretical models that assumes free diffusion of signaling components in the cell membrane, we postulated that there must be a mechanism in the cell that adjust the signaling system to keep the agonist potency constant when the expression of the relevant receptor varies.

3) *Activity states of adenylate cyclase:* Possible activity states of adenylate cyclase were evaluated by means of analyzing thermal inactivation rate of the enzyme at different activating conditions. Two preparations were used as a source of adenylate cyclase: guinea-pig lung parenchymal membranes where the basal cyclase activity was high compared to β -AR-stimulated activity, and high-receptor-CHO cell membranes where β -AR-stimulated cyclase activity was high compared to the basal activity. In lung membranes, stimuli via β -AR-Gs (isoproterenol and/or $GTP\gamma S$) did not change the inactivation rate of adenylate cyclase, whereas the presence of forskolin (a cyclase ligand) in the incubation medium slowed the inactivation rate. In CHO membranes, on the other hand, both isoproterenol and $GTP\gamma S$, along with forskolin, (apparently) slowed the rate of cyclase inactivation. However, addition of isoproterenol or $GTP\gamma S$ to the assay medium (instead of the incubation medium) gave the same apparent results, which suggest the presence of an adenylate cyclase reserve, rather than a protection against thermal inactivation of the enzyme, in the CHO cell system.

In the presence of such a cyclase reserve, one can postulate that the potency of agonist should be insensitive to the small variations in the adenylate cyclase concentration in the membrane. This was indeed the case when the potency of isoproterenol was experimentally evaluated in membranes where the basal activity of adenylate cyclase was halved due to incubation at 37 °C.

KAYNAKLAR

- AWAD, J. A., JOHNSON, R. A., JAKOBS, K. H., SCHULTZ, G. (1983). Interactions of forskolin and adenylyl cyclase effects on substrate kinetics and protection against inactivation by heat and N-ethylmaleimide. *J. Biol. Chem.* **258**: 2960-2965.
- BAROVSKY, K., BROOKER, G. (1980). I-iodopindolol a new highly selective radioiodinated beta adrenergic receptor antagonist: measurement of beta receptors on intact rat astrocytoma cells. *J. Cyc. Nucl. Research.* **6**: 297-307.
- BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J., BROWN, A.M. (1990b). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **1031**: 163-224.
- BIRNBAUMER, L., POHL, S. L., MICHIEL, H., KRANS, M. J., RODBELL, M. (1970). The actions of hormones on the adenylyl cyclase system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **3**: 185-208.
- BIRNBAUMER, L. (1990a). G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 675-705.
- BOURNE, H. R. (1998). Drug receptors & Pharmacodynamics. In: *Basic & Clinical pharmacology*. Ed.: B. G. Katzung, Appleton & Lange, p.: 9-33.
- BRADFORD, M.B. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein - Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BROOKER, G. (1988). Improvements in the Automated Radioimmunoassay for cAMP or cGMP. *Methods in Enzymology.* **159**: 45-50.
- COLQUHOUN, D., HAWKES, A. G. (1983). The principles of the stochastic interpretation of ion channel mechanisms. In: *Single channel recording*, Ed.: B. Sakmann, E. Neher, New York: Plenum, p.: 135-175.
- COLVIN, R. A., ALLEN, R. A. (1991). Studies of the thermal inactivation of cardiac adenylyl cyclase: evidence for a conformational change in the reaction mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **289**: 337-342.
- DARFLER, F. J., MAHAN, L. C., KOACHMAN, A. M., INSEL, P. A. (1982). Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves the nucleotide regulatory protein of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**: 11901-11907.
- DASSO, L. L. T., TAYLOR, C. W. (1992). Different calcium-mobilizing receptors share the same guanine nucleotide-binding protein pool in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* **42**: 453-457.
- DELÉAN, A., STRADEL, J. M., LEFKOWITZ, R. J. (1980). A ternary complex model explains the agonist specific binding properties of the adenylyl cyclase-coupled β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **255**(15): 7108-7117.
- DOHLMAN, H. G., THORNER, T., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-membrane-segment receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 653-688.
- FERNANDO, A. P.R., MATTERA, R., HILDEBRANDT, J. D., CODINA, J., FIELD, J. B., BIRNBAUMER, L., SEKURA, R. D. (1985). ADP-Ribosylation of membrane components by pertussis and cholera toxin. *Methods in Enzymology.* **109**: 566-572.
- FRASER, C. M. (1991). Molecular biology of adrenergic receptors: Model systems for the study of G-protein-mediated signal transduction. *Blood Vessels.* **28**: 93-103.
- FURCHGOTT, R. F. (1966). The use of Beta-haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. *Advances in Drug Research.* **3**: 21-55.
- GILMAN, A. G. (1987). G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649.
- GRAESER, D., NEUBIG, R. R. (1993). Compartmentation of receptors and G proteins in NG108-15 cells: lack of cross-talk in agonist binding among the alpha2 adrenergic, muscarinic ve opiate receptors. *Mol. Pharmacol.* **43**: 434-443.
- HENIS, Y. I., HEKMAN, M., ELSON, E.L., HELMREICH, E. J. M. (1982). Lateral motion of β receptors in membranes of cultured liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 2907-2911.

- HIGASHIJIMA, T., FERGUSON, K. M., STERNWEIS, P. C., ROSS, E. M., SMIGEL, M. D., GILMAN, A. G. (1987). The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **262**: 752-756.
- HIGASHIJIMA, T., GRAZIANO, M. P., SUGA, H., KAINOSHO, M., GILMAN, A. G. (1991). ^{19}F and ^{31}P NMR Spectroscopy of G protein α subunits. *J. Biol. Chem.* **266**: 3396-3401.
- HOUSLAY, M. D., BOJANIC, D., GAWLER, D., O'HAGAN, S., WILSON, A. (1986). Thrombin, unlike vasopressin, appears to stimulate two distinct guanine nucleotide regulatory proteins in human platelets. *Biochem. J.* **238**: 109-113.
- HOYER, D., RAYNOLDS, E. E., MOLINOFF, P. B. (1984). Agonist induced changes in properties of beta adrenergic receptors on intact s49 lymphoma cells. *Mol. Pharm.* **25**: 209-218.
- HUANG, C., HEPLER, J. R., CHEN, L. T., GILMAN, A. G., ANDERSON, R. G. W., MUMBY, S. M. (1997). Organisation of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell.* **8**: 2365-2378.
- JACOBS, S., CUATRECASAS, P. (1976). The mobile receptor hypothesis and "cooperativity" of hormone binding. Application to insulin. *Biochimica et Biophysica Acta.* **433**: 482-495.
- KLEUSS, C., HESCHELER, J., EWEL, C., ROSENTHAL, W., SCHULTZ, G., WITTIG, B. (1991). Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature.* **353**: 43-48.
- KUPFER, L.E., ROBINSON, R. B., BILEZIKIAN J. P. (1982) Identification of alpha-1 adrenergic receptors in cultured rat myocardial cells with an iodinated alpha-1 antagonist I-IBE 2254. *Circ. Res.* **51**: 250-254.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **229**: 680-685.
- NEUBIG, R. R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanism. *FASEB J.* **8**: 939-946.
- NOEL, J. P., HAMM, H. E., SIGLER, P. B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**: 654-663.
- ONARAN, H. O., COSTA, T. (1997). Agonist efficacy and allosteric models of the receptor action. *Annals New York Academy of Sciences.* **812**: 98-115.
- ONARAN, H. O., COSTA, T., RODBARD, D. (1992). $\beta\gamma$ subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: Thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol. Pharm.* **43**: 245-256.
- RASENICK, M. M., WANG, N., YAN, K. (1990). Specific associations between tubulin and G proteins: participation of cytoskeletal elements in cellular signal transduction. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **24**: 381-386.
- RUBENSTEIN, R. C., LINDER, M. E., ROSS, E. M. (1991). Selectivity of the beta-adrenergic receptor among Gs, Gi's and Go: assay using recombinant alpha subunits in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry.* **30**: 10769-10777.
- SAMAMA, P., PEI, G., COSTA, T., COTECCHIA, S., LEFKOWITZ, R. J. (1993). Negative antagonists promote an inactive conformation of the β 2-Adrenergic receptor. *Mol. Pharm.* **45**: 390-394.
- SCHLEGEL, W., KEMPNER, E. S., RODBELL, M. (1979). Activation of adenylate cyclase in hepatic membranes involves interaction of the catalytic unit with multimeric complexes of regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **254**: 5168-5176.
- SEIFERT, R., SEIFERT, K., LEE, T. W., GETHER, U., BUSH, E., KOBILKA, B. K. (1998). Different effects of G α splice variants on β 2 adrenoceptor-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **273**: 5109-5116.
- SIMMONS, M. A., MATHER, R. J. (1991). Selectivity of the effects of guanosine-5'-O-(γ -thiodiphosphate) on agonist inhibition of the M-current in amphibian sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **11**: 2130-2134.
- SIMONDS, W. F. (1999). G protein regulation of adenylate cyclase. *TIPS.* **20**: 66-73.
- STEPHENSON, R. P. (1956). A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.* **11**: 379-393.

- STICKLE, D., BARBER, R. (1993). Analysis of receptor-mediated activation of GTP-binding protein/adenylate cyclase using encounter coupling model. *Mol. Pharm.* **43**: 397-411.
- STOECKENIUS, W., BOGOMOLNI, R. A. (1982). Bacteriorhodopsin and related pigments of Halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 587-616.
- STRADER, C. D., FONG, T. M., TOTA, M. R., UNDERWOOD, D., DIXON, R. A. F. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 101-132.
- TESMER, J. J., SUNAHARA, R. K., GILMAN, A. G., SPRANG, S. R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* **278**:1907-1916.
- TOLKOVSKY, A. M., LEVITZKI, A. (1978). Mode of coupling between the β -adrenergic receptor and adenylyl cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry*. **17(18)**: 3795-3810.
- VON ZASTROW, M., LINK, R., DAUNT, D., BARSH, G., KOBILKA, B. (1993). Subtype-specific differences in the intracellular sorting of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 763-766.
- WANG, H. Y., BERRIOS, M., MALBON, C. C. (1989). Indirect immunofluorescence localization of beta-adrenergic receptors and G-proteins in human A431 cells. *Biochem. J.* **263**: 519-532.
- WOLF, B. B., HARDEN, T. K. (1981). Guanine nucleotides modulate the affinity of antagonists at beta adrenergic receptors. *J. Cyc. Nucl. Research*. **7**: 303-312.
- ZHANG, G., LIU, Y., RUOHO, A. E., HURLEY, J. H. (1997). Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**: 247.

