

KONTROL VE FARKLILAŞMIŞ K562 HÜCRELERİNDE G PROTEİN DÜZEYLERİ*

THE LEVEL OF G PROTEINS IN CONTROL AND DIFFERENTIATED K562 CELLS*

Bahire KÜÇÜKKAYA ve Beki KAN *

SUMMARY

Membranes were prepared from K562 cells grown in suspension culture and chemically induced to differentiate with hemin. Guanine nucleotide binding assays performed in these fractions showed a 150 % increase in GTP γ S binding activity of differentiated cell membranes with respect to the control groups. However, immunoblot analysis using specific antibodies indicated that there were no significant differences in the total amounts of G protein subunits between the two groups.

ÖZET

Kültür ortamında çoğaltılan ve hemin ile farklılaşmaya indüklenen K562 hücrelerinin membran kesimleri hazırlandı ve bu kesimlerde guanin nükleotit bağlama etkinliği incelendi. K562 hücrelerinin membran kesimlerinde farklılaşmış grubun GTP γ S bağlama etkinliği kontrol grubuna göre yaklaşık bir buçuk kat fazla bulundu. Ancak immünolojik belirleme çalışmaları toplam G protein miktarında bir fark olmadığını gösterdi.

GİRİŞ

Hücreler birbirleriyle hormonlar, nörotransmitterler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarlar.

* Bu Çalışma Eczacıbaşı Bilimsel Araştırma ve Ödül Fonu ve Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, 81010 Haydarpaşa / İSTANBUL.

Bu moleküllere yanıt veren hücrelerin plazma zarlarında o moleküle özgü reseptörler mevcuttur. Aralarında rodopsin ve muskarinik asetilkolin reseptörü gibi moleküller bulunan bir reseptör sınıfı G proteini olarak adlandırılan ve hücre zarına bağlı bir çevreç proteinini uyararak etkisini gösterir (1). Guanin nukleotitlerini bağlama özelliğine sahip G proteinleri hücre içi taşınım ve salgılama gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynarlar. Yakın zamanda yürütülen çalışmalar G proteinlerinin hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (2). Bu çalışmada K562 hücre modelinde G proteinlerinin hücre farklılaşmasındaki olası rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada kullanılan [³⁵S] GTP γ S (Özgün etkinliği 1146 Ci / mmol) DuPont, New England Nuclear'dan, Western Blot yönteminde kullanılan maddeler Promega'dan diğer kimyasallar ise Sigma'dan satın alınmıştır. G proteinlerinin β altbirimini tanıyan S217 antikoru (3, 4) Prof. Alfred Gilman'ın Laboratuvarından (The University of Texas; Southwestern Medical Center, Dallas) sağlanmıştır.

Hücrelerin Çoğaltımı ve Farklılaşmaya İndüklenmesi

İnsan eritrolösemi hücreleri (K562) % 5 CO₂ içeren karbondioksit etüvünde 37° C'ta çoğaltıldı ve yoğunlukları 100.000 hücre / ml olarak ayarlandıktan sonra kontrol (K) ve farklılaşmış (F) grupları olarak ikiye ayrıldı. F grubundaki K562 hücreleri 20 μ M hemin çözeltisi ile farklılaşmaya indüklendi. Farklılaşma oranı benzidin boyama yöntemiyle belirlendi (5).

Membran Kesimlerinin Hazırlanması

Tüm işlemler proteaz inhibitörü fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) varlığında, 0-4° C'ta yürütüldü. Hücre süspansiyonları toplam 300 x g'de 10 dak. santrifüjlendikten sonra çökelek yıkama tamponuyla (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 3mM KCl) 300 x g'de 10 dak. yıkandı. Hücre patlatma tamponu (10 mM Tris HCl pH 7.6, 10mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 7 mM β - MET) içine alınan örnekler Dounce homojenizatörüyle patlatıldı, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ ve % 10 sukroz eklendikten sonra 350 x g'de 10 dak. santrifüjlendi. Üst sıvı 30.000 x g'de 30 dak. santrifüjlendi. Elde edilen çökelek 10mM Tris - HCl pH 7.6, 3

mM MgCl₂, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 7mM β -MET, 0.2 mM PMSF ve % 10 sukroz ile yıkandıktan sonra tekrar 30.000 x g'de 1 saat sant-rifüjlendi. Membran çökeleği (P - 30) 20 mM Hepes - KOH pH 8.0, 1 mM ditiyotreitil (DTT) içine alınarak -70° C ta saklandı. Protein miktarları Lowry yöntemiyle belirlendi (6).

[³⁵S] GTPγS Bağlama Testi

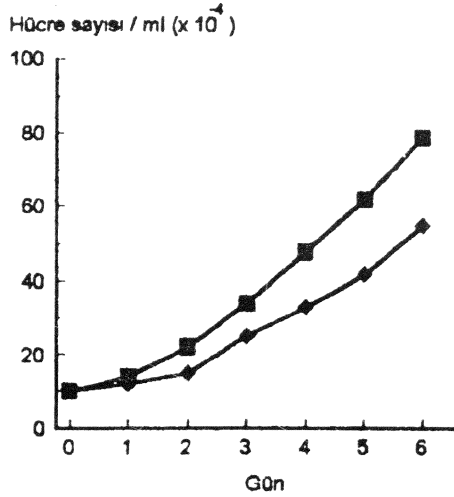
10 - 100 µg protein içeren kesimler 60 µl hacim içinde 25 mM Hepes - KOH pH 8.0, 30 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT varlığında 1 µM [³⁵ S] GTPγS ile (300.000 cpm) 32°C 'ta 40 dak. inkübe edildi. Örnekler nitrosellüloz filtreler (Millipore, Type HA, 0.45 µm) emdirildi, filtreler yıkama tamponuyla (20 mM Tris - HCl pH 8.0, 10 mM NaCl ve 25 mM MgCl₂) yıkandı ve kurutuldu. Bağlanan [³⁵S] GTPγS miktarı sıvı sintilasyon sayacında saptandı.

İmmünolojik Belirleme (Western Blot)

SDS poliakrilamid gel elektroforezinden sonra (7) proteinler elekt-roforetik olarak nitrosellüloz membranlara aktarıldı (8). Membran BSA ile işlem gördükten sonra oda sıcaklığında 3.5 saat birincil antikor ve 1.5 saat alkalin fosfataz ile konjüge ikincil antikorla etkileştirdi. BSA, bi-rincil ve ikincil antikor inkübasyonlarından sonra membran TBS tam-ponuyla (25 mM Tris - HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 3 mM KCl) 3 kez 5 dak. yıkandı. Görüntü alkalin fosfataz substratı NBT (Nitroblue tet-razolium) ve BCIP (5 - bromo - 4 chloro-3 indolyl phosphate) ile elde edildi.

BULGULAR

Uygun koşullarda çoğaltılan kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücreleri altıncı günün sonunda toplandı. (F) grubundaki farklılaşma (benzidin pozitif) oranı yaklaşık % 70, (K) grubunda kendiliğinden fark-lılaşma oranı % 2 olarak belirlendi. Hücrelerin çoğalma eğrileri Şekil - 1'de gösterilmiştir.

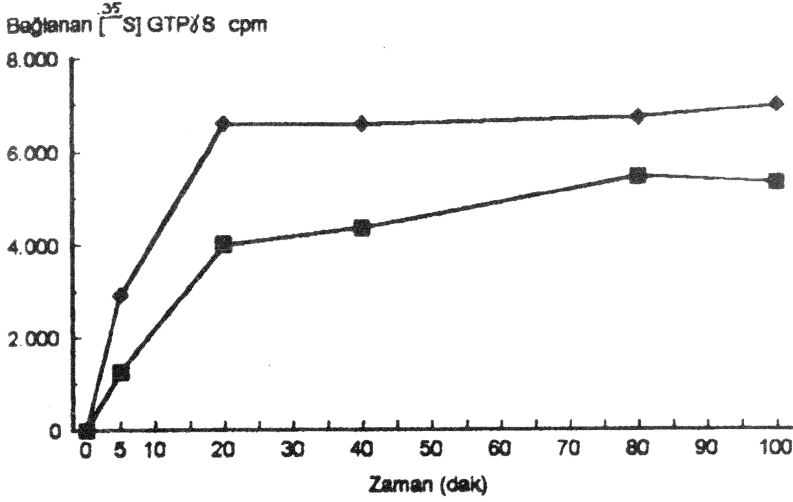


Şekil - 1 : K562 Hücrelerinin Çoğalma Eğrileri. 100.000 hücre / ml olarak ekilen K562 , K (125 ml) ve F (175 ml) hücreleri altı gün süreyle Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde çoğaltıldı. Hücre derişimini saptamak için her gün ikişer örnek alındı ve hemositometre'de 0.1 µl hacim içinde sayım yapıldı.

(□ — □) K562 - kontrol hücreleri

(◇ — ◇) K562 - farklılaşmış hücreler

K562 hücrelerinden elde edilen membran (P - 30) kesimlerinde guanin nükleotid bağlama etkinlikleri GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu olan [³⁵S] GTPγS varlığında saptandı. Kontrol grubun membran kesimlerinde GTPγS bağlama etkinliğinin 20. dakikada 85 fmol / mg protein, farklılaşmış grubun membran kesimlerindeki etkinliğin ise 130 fmol / mg protein olduğu saptandı (Şekil 2).

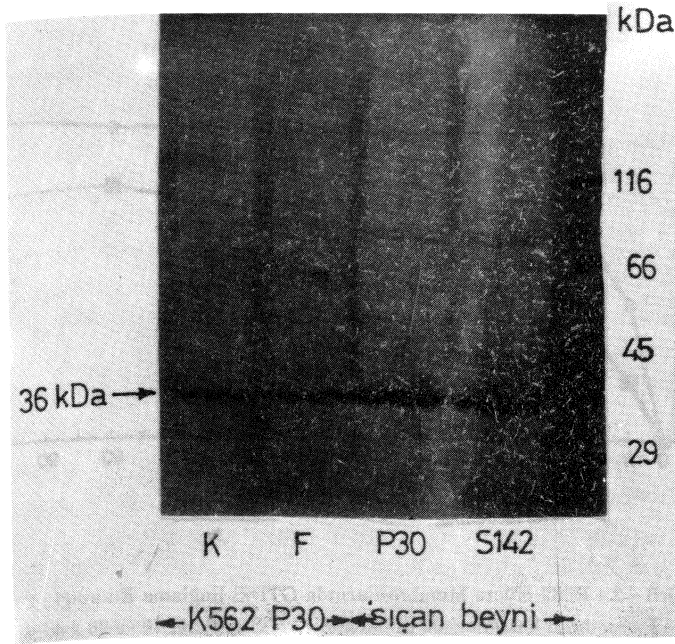


Şekil - 2 : K562 Hücre Membranlarında $GTP\gamma S$ Bağlama Etkinliği : 20 μg protein içeren K ve F membran kesimleri 60 μl hacimde 32 °C'ta 5, 20, 40 ve 80 dak. süreyle Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde inkübe edildi. Örnekler nitrosellüloz filtrelerle emdirildi, filtreler yıkandı ve kurutuldu. Bağlanan $[^{35}S]$ $GTP\gamma S$ miktarı cpm (dakikada sayım) olarak belirlendi.

(□ — □) (K) P - 30

(◇ — ◇) (F) P - 30

Kontrol ve farklılaşmış membran kesimlerinde guanin nükleotit bağlama etkinliğinde gözlenen farkın membranlardaki G protein miktarlarında farklılıktan kaynaklanması olasılığını incelemek amacıyla, membran kesimleri bütün G protein türlerinin β - altbirimlerini tanıyan antikorla etkileştirildi; ancak kontrol ve farklılaşmış membranlarda toplam G - protein miktarı açısından fark gözlenmedi (Şekil 3).



Şekil - 3 : K562 Hücre Membranlarında G Protein Miktarlarının İmmünblot Yöntemiyle Belirlenmesi. Kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden hazırlanan ve 25 µg protein içeren kesimler (P - 30) % 10 SDS - poliakrilamid gellerine uygulandı. Elektroferez işleminden sonra, proteinler nitrosellüloz membrana aktarıldı ve S217 antikoruyla Gereç ve Yöntemler'de anlatıldığı gibi etkileştirildi. G protein kontrolü olarak sıçan beyin membranı (P - 30) ve membran ekstraktı (S - 142) kullanılmıştır.

TARTIŞMA

G- proteinleri hücre zarı tarafından alınan sinyalleri hücre içi sinyallere dönüştürülmesinde görev alan aracı moleküllerdir. Ayrıca, taşınım ve salgılama olaylarını da düzenledikleri düşünülmektedir (1,2). Son zamanlarda yürütülen bazı çalışmalar G proteinlerinin hücre farklılaşmasında da rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Mullaney ve Milligan (9) nöroblastoma X glioma hibrit hücrelerinde farklılaşmaya koşut olarak G_0 'ın α - altbiriminde artış saptamışlardır. HL - 60 ve U392 monositlerinde G_i miktarlarının farklılaşma sonucu arttığı gözlenmiştir (10). Ayrıca, 3T3 - L1 fibroblast hücrelerinin lipolitik maddelerle yağ hücrelerine farklılaşması esnasında G_s , G_i ve G_0 düzeylerinin değiştiği saptanmıştır (11).

Bu çalışmada eritroid hücre farklılaşmasında G proteinlerinin olası rolünü incelemek amacıyla K562 hücreleri model sistem olarak seçilmiştir. G proteinlerinin guanin nükleotitlerini yüksek ilgiyle bağladıkları bilinmektedir. Bu nedenle, kontrol (K) ve farklılaşmış (F) K562 hücrelerinden elde edilen membran kesimlerinde (P - 30) GTP'nin hidrolizlenmeyen analogu olan GTP γ S bağlama etkinlikleri incelendi. Farklılaşmış hücre membranlarına bağlanan GTP miktarının (K) grubuna bağlanan miktarın yaklaşık bir buçuk katı olduğu görüldü.

Farklılaşma sonucu membranların guanin nükleotit bağlama etkinliklerinde saptanan artışın G protein düzeylerinde değişikliklerden kaynaklandığı düşünülebilir. Bu olasılığı araştırmak amacıyla, (K) ve (F) membranlarındaki toplam G protein miktarları G β altbirimleriyle etkileşen antikorun kullanıldığı immunblot yöntemiyle kıyaslandı. Ancak, dansitometrik analiz sonucu kontrol ve farklılaşmış grupların toplam G protein miktarında önemli bir fark saptanmadı. G proteinlerinin farklı türleri için seçici olmayan bu antikorla G β , G γ ya da G α proteinlerinin birinin miktarında farklılaşmaya koşut olarak çıkacak farkı belirlemek mümkün olmamaktadır. Gelecekte özgün antikorlarla tekraralanacak immunblot ve G proteinlerine özgün DNA problemlerinin kullanılacağı moleküler hibridizasyon çalışmaları G proteinlerinin eritroid hücre farklılaşmasındaki olası rolünü aydınlatacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gilman, A.G. (1988) : *Annu. Rev. Biochem.* **56** : 615 - 649.
2. Spiegel, A. M., Shenker, A., Weinstein, L. S. (1992) : *Endocrine Rev.* **13** (3) : 536 - 565.
3. Mumby, S. M., Gilman, A. G. (1991) : *Methods in Enzymology* Cilt **195** s. 215 - 233 Academic Press Inc. San Diego, Ca.
4. Mumby, S. M., Kahn, R. A., Manning, D. R. , Gilman, A. G. (1986) : *J. Biol. Chem.* **265** : 2383 - 2390.
5. Gopalakrishnan, T. V., Anderson, W. F. (1991) : *Methods in Enzymology* Cilt **58** s. 506 - 511 Academic Press Inc. San Diego, Ca.
6. Oliver, B., Lowry, H., Rosenbrough, N.J., Forr, A.L., Randall, R. J. (1951) : *J. Biol. Chem.* **193** : 265 275.
7. Laemmli, U. K. (1970) : *Nature* **278** : 364 - 365.
8. Towbin, M., Staehelin, T., Gordon, T. (1979) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76** : 4350 - 4354.
9. Mullaney, I., Milligan, G. (1989) : *FEBS Lett.* **244** : 113 - 118.
10. Offermans, S., Schafer, F., Hoffman, B., Bobbien, E., Spincher, K., Hinch, D., Schultz, G., Rosenthal, W. (1990) : *FEBS Lett.* **260** : 14-18
11. Giershik, P., Morrow, B., Milligan, G., Rubin, C., Spiegel, A. (1986) : *FEBS Lett.* **99** : 103 - 106.

(Received November 1, 1993)