ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa ERBAKAN

RETİNAL GUANİLAT SİKLAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ATP, AMP-PNP VE ALL-TRANS RETİNAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RETİNAL GUANİLAT SİKLAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ATP, AMP-PNP ve ALL-TRANS RETİNAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mustafa ERBAKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ...../2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/~~Oy Çokluğu~~ İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Yrd.Doç.Dr.Ramazan BiLGiN	Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL	Yrd.Doç.Dr.Fatma ÇEVİK
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:.....

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RETINAL GUANİLAT SİKLAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ATP, AMP-PNP VE ALL-TRANS RETİNAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mustafa ERBAKAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
Yıl : 2007 **Sayfa:** 56
Jüri : Yrd. Doç.Dr. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yrd. Doç.Dr. Fatma ÇEVİK

Retinal guanilat siklazlar, retGC-1 ve retGC-2, membrana bağlı guanilat siklaz ailesinin bir alt kolunu oluştururlar. Fototransdüksiyonunun intraselüler mesajcısı olan cGMP'yi sentezledikleri için fotoreseptör fizyolojisinde önemli rol oynarlar. Bu çalışmada, adenin nükleotidlerinin retinal guanilat siklazların fizyolojisine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çapraz bağlama çalışmaları protein fosforilasyonunun siklazın fizyolojik aktivitesinin ortaya çıkmasında önemli rol oynadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Retinal Guanilat Siklaz, Guanilat Siklaz Aktive Edici Proteinler, AMP-PNP, All-Trans Retinal

ABSTRACT

MSc THESIS

EFFECT OF ATP, AMP-PNP AND ALL-TRANS RETINAL ON RETINAL GUANYLATE CYCLASE ACTIVITY

Mustafa ERBAKAN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF SCIENCE
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Asist. Prof. Ramazan BİLGİN
Year : 2007 **Pages:** 56
Jury : Asist. Prof. Ramazan BİLGİN
Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Asist. Prof. Fatma ÇEVİK

Retinal guanylate cyclases, retGC-1 and retGC-2, are a subclass of the membrane dependent guanylate cyclase family. Synthesize cGMP, the intracelular second messenger of phototransduction, they play a crucial role in photoreceptor physiology. In recent work, it is intended to investigate the effect of adenine nucleotides and all-trans retinal on the retinal guanylate cyclase activity. Cross-linking experiments indicate, protein phosphorylation might be essential for physiological activity of cyclases.

Key Words: Retinal Guanylate Cyclase, Guanylate Cyclase-Activating Proteins, AMP-PNP, All-Trans Retinal

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında değerli zamanını, düşünce ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e, ayrıca sayın hocalarım Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e, Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e, Yrd. Doç. Dr. Fatma ÇEVİK'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, Almanya'nın Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg Üniversitesi biyoloji bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Karl-Wilhelm KOCH'a ve biyokimya çalışma grubu üyelerine teşekkürlerimi borç bilirim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Nedime ERBAKAN, babam Nevzat ERBAKAN ve dedem Mustafa ERBAKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ..... I

ABSTRACT..... II

TEŞEKKÜR..... III

İÇİNDEKİLER..... IV

ÇİZELGELER DİZİNİ..... VII

ŞEKİLLER DİZİNİ..... VIII

SİMGELER VE KISALTMALAR..... X

1. GİRİŞ..... 1

1.1. Görme Olayı..... 2

1.2. Fotoreseptörler..... 3

1.3. Fototransdüksiyon..... 5

1.4. Guanilat Siklaz Aktive Edici Proteinler..... 6

1.5. Retinal Guanilat Siklazlar..... 7

1.6. Retinal Hastalıklar..... 9

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 10

3. MATERYAL VE METOD..... 12

3.1. Materyal..... 12

3.2. Metod..... 12

3.2.1. Çomak Hücresi Dış Segment (ROS) Homojenatının Hazırlanması..... 12

3.2.1.1. Yoğunluk Gradiyentinin Hazırlanması..... 13

3.2.1.2. Dana Gözlerinden Çomak Hücresi Dış Segmentlerinin Ekstraksiyonu..... 14

3.2.1.3. Fotometrik Rodopsin Tayini..... 15

3.2.1.4. Sodyum Dodesil Sülfat-poliakrilamid Jel Elektroforezi..... 16

3.2.1.6. Çözünen Fraksiyonda Protein Tayini..... 17

3.2.1.6. Çözünmeyen Fraksiyonda Protein Tayini..... 18

3.2.1.8. Guanilat Siklaz Deneyi..... 19

3.2.1.9. GCAP-2 kontrollü GC - Aktivitesinin Kalsiyuma Bağımlılığı 19
3.2.1.9.(1). $K_2CaEGTA$ pH 7,4 Tamponunun Hazırlanması 19
3.2.1.9.(2). ROS-1 homojenatları ile GC inkübasyonu 20
3.2.1.9.(3). BAPTA Titrasyonu 21
3.2.1.10. Spesifik Aktivite 22
3.2.2. ATP ve AMP-PNP Preinkübasyon Deneyleri 22
3.2.2.1. GCAP-2 Konsantrasyon Tayini 22
3.2.2.2. Ret-GC Aktivitesine ATP Preinkübasyon Etkisi... 22
3.2.2.3. Ret-GC Aktivitesine AMP-PNP Preinkübasyon Etkisi 22
3.2.3. Ret-GC Aktivitesine All-Trans Retinal Etkisi 23
3.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatoğrafisi 23
3.2.5. Kimyasal Çapraz-Bağlama Deneyleri 24
3.2.6. SDS-PAGE Jel Elektroforezi 24
3.2.7. Western-Blot 25
3.2.8. Bağışıklık Deneyi (Immunoassay) 26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 27
4.1. Bulgular 27
4.1.1 Çomak Hücresi Dış Segment Homojenatının Hazırlanmasına Ait Bulgular 27
4.1.1.1. Fotometrik Rodopsin Tayini 27
4.1.1.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi 27
4.1.1.3. Çözünen Fraksiyonda Protein Tayini 28
4.1.1.4. Çözünmeyen Fraksiyonda Protein Tayini 30
4.1.2. Guanilat Siklaz Deneyi-HPLC Analizlerine Ait Bulgular... 31
4.1.2.1. GCAP-2 Konsantrasyon Tayini 31
4.1.2.2. BAPTA Titrasyonu 31

4.1.2.3. GCAP kontrollü GC - Aktivitesinin Kalsiyuma Bağımlılığı 33
4.1.3. ATP ve AMP-PNP Preinkübasyon Deneylerine Ait Bulgular 35
4.1.3.1. ATP Preinkübasyon Etkisi 35
4.1.3.2. AMP-PNP Preinkübasyon Etkisi 36
4.1.3.3. All-Trans Retinal İnkübasyon Etkisi 37
4.1.4. Çapraz Bağlama ve Bağışıklık Deneylerine Ait Bulgular 40
4.1.4.1. ATP'nin Retinal Guanilat Siklaz-1 Dimerizasyonu Üzerine Etkisi 40
4.1.4.1.(1). ROS ile ATP'nin İnkübasyonu 40
4.1.4.1.(2). Yıkanmış ROS Membranları ile ATP'nin İnkübasyonu 41
4.1.4.2. AMP-PNP'nin Retinal Guanilat Siklaz-1 Dimerizasyonu Üzerine Etkisi 41
4.1.4.2.(1) ROS ile AMP-PNP İnkübasyonu 41
4.1.4.2.(2) Yıkanmış ROS Membranları ile AMP-PNP İnkübasyonu 42
4.1.4.3 All-trans Retinal'in Retinal Guanilat Siklaz-1 Dimerizasyonu Üzerine Etkisi 43
4.1.4.3.(1). ROS ile All-trans Retinal İnkübasyonu. 43
4.1.4.3.(2). Yıkanmış ROS Membranları ile All-trans Retinal İnkübasyonu 44
4.2.Tartışma 46
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 49
5.1. Sonuçlar 49
5.2. Öneriler 50
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 56

ÇİZELGELER DİZİNİ SAYFA

Çizelge 4.1. Rodopsinin beyaz ışık altında fotoizomerizasyonuyla 500 nm'deki absorbans değişimi.....27

Çizelge 4.2. Çözünebilir ROS1 fraksiyonunun protein içeriğinin tespit edilmesi için yapılan Bradford yöntemiyle protein tayininde standartlara ve örneğe ait absorbans değerleri.....29

Çizelge 4.3. Amidoblack ile çözünmeyen fraksiyonun protein içeriğinin belirlenmesinde standartdartlara ait olan 630 nm'deki absorbans değerleri.....30

Çizelge 4.4. GC deneyindeki örneklere ait olan [K_2H_2EGTA], [$K_2CaEGTA$], A_{254}, $[BAPTA]_s$, [CaBAPTA] ve $[Ca^{2+}]_s$ değerleri.....32

Çizelge 4.5. GC deneyindeki örneklerin HPLC analizleriyle tespit edilen cGMP miktarları ve hesaplanan spesifik aktivite değerleri.....34

Çizelge 4.6. ATP preinkübasyonundan sonra HPLC analizi yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.....36

Çizelge 4.7. AMP-PNP preinkübasyonundan sonra HPLC analizi yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.....37

Çizelge 4.8. Düşük Ca^{2+} konsantrasyonunda farklı konsantrasyonlarda all-trans retinalle inkübe edilen ve HPLC analizleri yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.....38

Çizelge 4.9. Yüksek Ca^{2+} konsantrasyonunda, farklı konsantrasyonlarda all-trans retinalle inkübe edilen ve HPLC analizleri yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.....39

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Gözün Yapısı....2
Şekil 1.2. Çomak ve koni hücrelerinin yapısı....3
Şekil 1.3. GTP'nin cGMP'ye dönüşümü....7
Şekil 3.1. Sükroz yoğunluk gradiyenti düzeneği....14
Şekil 3.2. Nitroselülöz membrana aktarılan protein standartları ve ROS1 peleti örnekleri....19
Şekil 3.3. Western-Blot düzeneği....25
Şekil 4.1. ROS1 homojenatı, ROS1'in hipotonik tamponla ultrasantrifüjlenmesiyle çökelen ve yeniden süspanse edilen ROS1 peleti (P) ve süpernatan (Ü) örneklerinin %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmesi....28
Şekil 4.2. Standartların protein miktarlarına karşı 595 nm'de alınan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart protein eğrisi....29
Şekil 4.3. Standartların protein miktarlarına karşı 630 nm'de alınan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart protein eğrisi....30
Şekil 4.4. GC deneyindekilerle aynı $[K_2H_2EGTA]/[K_2CaEGTA]$ kompozisyonlarına sahip olan tampon çözeltilere 20 μM BAPTA ilavesinden sonra 220-320 nm aralığında alınan absorpsiyon spektrumu....32
Şekil 4.5. GC deneyindeki örneklerin 254 nm'deki absorbans değerlerinin serbest Ca^{2+} konsantrasyonuyla değişimi....33
Şekil 4.6. GCAP uyarımlı retGC aktivitesi üzerine serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun etkisi. 35
Şekil 4.7. Retinal guanilat siklaz aktivitesi üzerine ATP preinkübasyon etkisi..... 36
Şekil 4.8. Retinal guanilat siklaz aktivitesi üzerine AMP-PNP preinkübasyon etkisi....37
Şekil 4.9. Düşük Ca^{2+} konsantrasyonunda retGC aktivitesi üzerine all-trans retinal etkisi....38
Şekil 4.10. Yüksek Ca^{2+} konsantrasyonunda retGC aktivitesi üzerine all-trans retinal etkisi....39

Şekil 4.11. ROS homojenatının farklı konsantrasyonlarda ATP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.....40
Şekil 4.12. ROS membranlarının farklı konsantrasyonlarda ATP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.....41
Şekil 4.13. ROS homojenatlarının farklı konsantrasyonlarda AMP-PNP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.....42
Şekil 4.14. ROS membranlarının farklı konsantrasyonlarda AMP-PNP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.....43
Şekil 4.15. ROS homojenatlarının yüksek kalsiyum konsantrasyonunda (1mM $CaCl_2$) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.....44
Şekil 4.16. ROS homojenatlarının düşük kalsiyum konsantrasyonunda (1mM EGTA) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.....44
Şekil 4.17. ROS membranlarının yüksek kalsiyum konsantrasyonunda (1mM $CaCl_2$) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.....45
Şekil 4.18. ROS membranlarının düşük kalsiyum konsantrasyonunda (1mM EGTA) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi 45

SİMGELER VE KISALTMALAR

ret-GC : Retinal guanilat siklaz

GCAP : Guanilat siklaz aktive edici protein

ROS : Çomak hücresi dış segmenti

Rh : Rodopsin

AMP-PNP : Adenil imido difosfat

HEPES : 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sulfonik asit

PVDF : Poliviniliden diflorür

PMSF : Fenil metil sülfonil florür

EGTA : Etilen glikol-bis(2-aminoetil)eter-N,N,N′,N′-tetra asetik asit

EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit

DTT : Di-tiyotreitol

GTP : Guanozin trifosfat

ATP : Adenozin trifosfat

APS : Amonyum persülfat

TEMED : Tetra metil etilen diamin

BAPTA : 1,2-Bis (2-aminofenoksi) etan-N,N,N′,N′-tetraasetik asit

cGMP : Siklik guanozin monofosfat

BS^3 : Bis-sülfosüksinimidil süberat

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Işık, canlı organizmalarda tek hücreli bakterilerden, çok hücreli bitki ve hayvanlara kadar çeşitli organizmalarda çeşitli biyolojik proseslerle ilişkilidir. Işık fotonları, bu organizmalarda spesifik bir dalga boyundaki ışığı absorblayan ve proteinler tarafından modifiye edilen pigmentler tarafından toplanır. Işık bu şekilde farklı amaçlarla absorblanabilir. Foton enerjisi hücre metebolizmasını sürdürmek için kullanılabilir (fotosentez) ya da ışık uyarımı hücreler arası sinyal iletimini tetikleyebilir. Bu ikinci proses fototransdüksiyon olarak adlandırılır. En çok çalışılan fototransdüksiyon prosesi görmeye ait olandır.

Görme araştırmalarının en önemli hedefi insan fototransdüksiyonuna ışık tutmaktır. Körlüğün nedenleri arasında fototransdüksiyonda görev alan bazı proteinlere ait genlerde meydana gelen mutasyonlar yer almaktadır. Bu araştırmalar ekseriyetle diğer türler üzerinde yapılmasına karşın, omurgalı canlıların fototransdüksiyon elemanları birbiriyle özdeş olduklarından, örneğin farelerle yapılan bir çalışma, insan görme sistemi açısında da değerlendirilebilir.

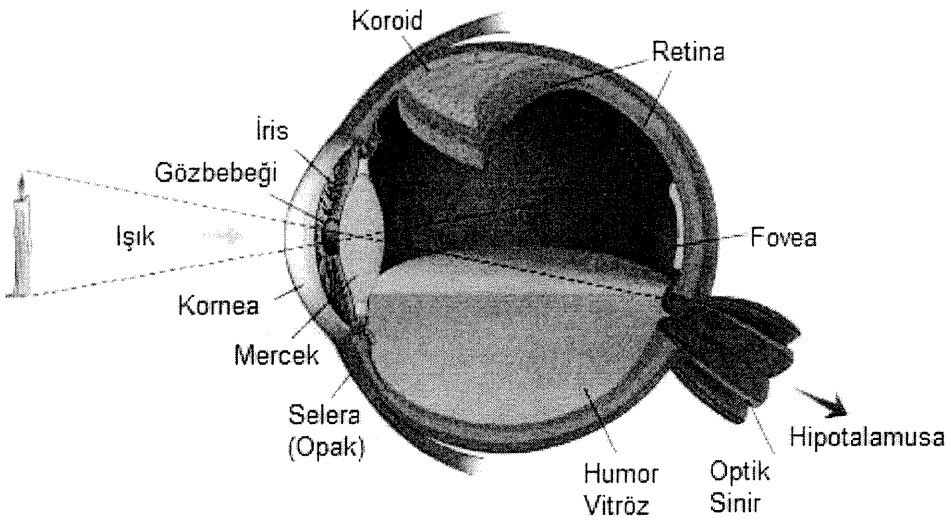
Görme sistemi, sinir sisteminin organizmaların görmelerini sağlayan kısmıdır. Görünür ışıktan aldığı bilgiyi organizmayı çevreleyen dünyanın bir temsilini oluşturmak üzere yorumlar. Işık fotonları, retinadaki spesifik reseptörlerde bulunan fotopigmentler tarafından absorplanır ve elektrik sinyaline çevrilerek beyin korteksinde yer alan yüksek merkezlere gönderilir. Bu sinyaller yapı, renk, derinlik ve görülen nesnelerin hareketi gibi birbirinden farklı bilgiler olarak yorumlanır.

Görme, bir G-protein enzim kaskadı olarak fotoreseptör dış segmentlerinde başlar. Bu enzim kaskadı, rodopsin kinazları, cGMP spesifik fosfodiesterazları ve yine cGMP spesifik guanilat siklazları içerir. Bu çalışmada, retinal guanilat siklazların aktivitesi üzerine adenin nükleotidlerinin ve all-trans retinalin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. In vitro koşullarda guanilat siklaz aktivite ölçümleri yapılmış ve çapraz bağlama çalışmalarıyla guanilat siklazın belirtilen maddelerle etkileşimleri gözlemlenmiştir.

1.1. Görme Olayı

Görsel algı retinada başlar. Korneadan giren ışık, gözün arka tarafına doğru gider, retinadaki özelleşmiş duyu organları (fotoreseptörler) tarafından elektriksel sinyale çevirilir. Sinyaller optik sinirle yüksek merkezlere gönderilir. Bu alanlarda sinyallerin işlemlenmesi algı için gereklidir.

Gözün reseptör tabakası retinada bulunur. Korneadan geçen ışık lens ve humör vitreusu geçerek retinaya ulaşır. Retina pigment tabakasının önünde bulunur. Pigment epiteli siyah pigment melanin ile doludur. Bu tüm ışığı emip yeniden retinaya yansımasını önler.

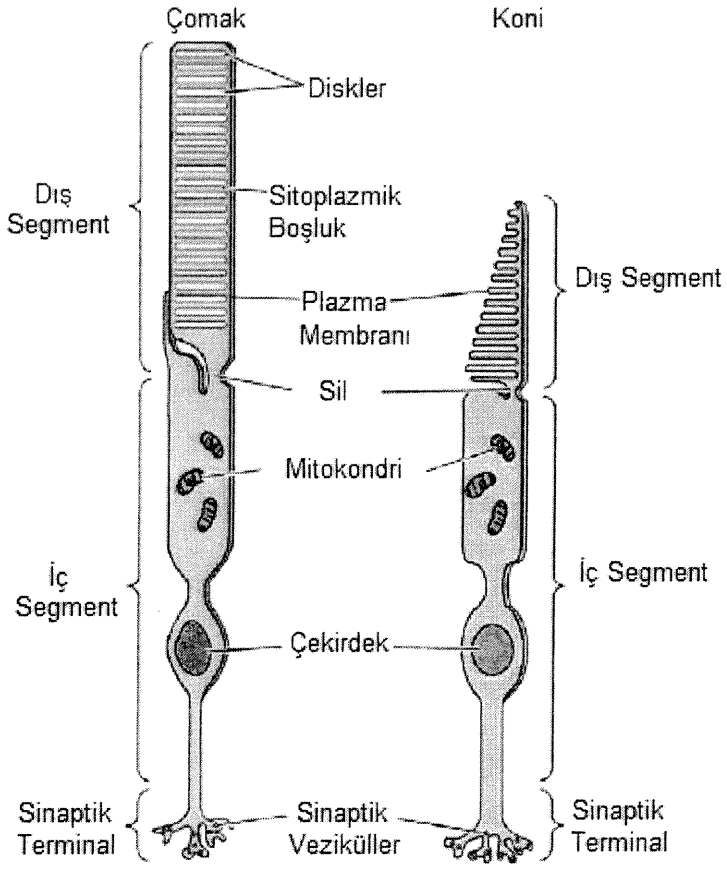


Şekil 1.1. Gözün Yapısı.

Fotoreseptörler pigment epiteline komşu olarak bulunduğu için retinanın diğer hücreleri fotoreseptörlerin üzerinde yani lense doğru olarak yerleşmiş bulunur. Bu yüzden ışık fotoreseptörlere ulaşmadan önce diğer katlardan geçmek zorundadır. Nöronlar miyelinsiz ve kısmen saydam olduğundan ışığın geçişine izin verirler. Ama yinede foveada özelliklede fovealada yukarıdaki katlarda yana doğru bir kayma vardır. Bu alan keskin görüşün oluştuğu yerdir. Optik sinirin retinayı terk etttiği yer ise fotoreseptöre sahip değildir (Kandel, Schwartz ve Jessel , 2000).

1.2. Fotoreseptörler

Omurgalı retinasında çomak ve koni olmak üzere iki tip fotoreseptör türü mevcuttur. Çomaklar ışığa daha duyarlıdır ve öncelikli olarak gece görüşünde rol alırlar. Koniler ışığa daha az hassastırlar, gün ışığında işlev görürler ve renkleri ayırmamızı sağlarlar. Çomak ve koni hücreleri benzer subselüler yapılara sahiptir, ancak isimleri fotoreseptör dış segmentlerinin farklı şekillerinden türetilmiştir. Çomak hücresi dış segmentleri silindirik bir şekile sahipken, koni dış segmentleri, dış segmentin uzak ucuna doğru incelerek koni şeklini almıştır (Pugh ve ark., 1999).



Şekil 1.2. Çomak ve koni hücrelerinin yapısı.

İnsan retinasında yaklaşık 5-7 milyon kadar koni bulunur ve foveada yoğunlaşmışlardır. Koniler gündüz görmeden sorumludur. Fonksiyonlarını yitirmelerinde kişide körlük oluşur. Karanlık ve aydınlıkta konilerin oksijen tüketim miktarları değişmez.

Çomaklar ise gece görüşünden sorumludurlar. İnsan retinasında 110-125 milyon kadar çomak bulunur. Retinanın geneline yayılmışlardır. Total kayıplarında sadece gece körlüğü oluşur. Çomaklar ışığa çok duyarlıdırlar, bu yüzden loş ışıkta iyi fonksiyon görürler fakat aynı miktardaki ışık konileri uyarmaya yetmez. Karanlıkta çomak hücrelerinin metabolizmasına bağlı olarak oksijen tüketimi artar.

Koniler az ışığı saptamak haricinde görme işinde çomaklardan daha iyidirler. Renkli görme ve çüzünürlüğü daha iyi görme ile hareketi algılamayı sağlayan hızlı yanıt özelliğine sahiptir.

Çomaklar loş ışığı saptar. Çomaklar konilerden daha çok ışığa duyarlı görsel pigment içerirler. Daha da önemlisi, çomaklar ışık sinyalini arttırırlar. Bir çomakta bir tek foton bile saptanabilir, elektriksel yanıt oluşturabilir.

Koniler renkli görmeye aracılık ederler. Herbiri ışık spekturumunun farklı bir parçasına hassas görme pigmenti içeren 3 tip koni vardır. Beyin, renge ait bilgileri bu 3 tip koninin yanıtlarının karşılaştırılmasından elde eder. Çomaklar ise tek tip pigment içerir ve bu yüzden farklı dalga boylarındaki ışığa aynı yanıtı oluştururlar.

Fotoreseptörler diğer duysal reseptörler gibi aksiyon potansiyeli üretmezler. Bunun yerine membran potansiyelinde dereceli değişiklikler ile ışığa yanıt verirler. Fotoreseptörler 3 ana fonksiyonel bölge içerirler. Bunlar, fototransdüksiyondan sorumlu dış segment, hücre çekirdeğinin bulunduğu ve biyosentezlerin yapıldığı iç segment ve fotoreseptörlerle hedef hücrelerin bağlantı yaptığı sinaptik terminaldir.

Dış segmentte birbiri üzerine yığılmış halde birçok disk membran parçacığı bulunur. Bunlar basillerde intraselüler veziküller halindeyken, konilerde plazma membranıyla birlikte seyreder.

Disk membranlar bol miktarda görme pigmenti (hücre başına 10^8'den fazla) içerirler. Görme pigmenti, 7 trans-membran α-helis içeren opsin proteini ve 7. α-helise bağlanmış ışığa çok duyarlı 11-cis-retinalden oluşmaktadır. Çomak

hücrelerindeki rodopsin, koni hücrelerindeki iyodopsin (veya konopsin) olarak adlandırılır (Kandel, Schwartz ve Jessel , 2000;).

Rodopsinin aktivasyonu ışığın absorbsiyonu ile başlar. Bu retinalın 11-cis formundan all-trans formuna geçmesidir. Bu reaksiyon görme sırasında gerçekleşen tek ışığa bağımlı basamaktır. Bu konformasyonal değişiklik ile retinal artık opsindeki bağlanma bölgesine uymaz. Bu yüzden opsinde konformasyonal değişiklik ile Metarodopsin II oluşur.

Metarodopsin II stabil değildir, dakikalar içinde opsin ve all-trans-retinale ayrılır. Daha sonra all-trans retinal çomaktan pigment epiteline transfer edilir. Pigment epitelinde all-trans retinal ve all-trans retinolden (A vitamini) 11 cis-retinal yapılır. 11 cis-retinal tekrar çomağa geçer. Bu maddelerden insanda sentezi yapılmayan all-trans retinoldür. Eksikliğinde gece körlüğü oluşur. Tedavi edilmezse dış segmentlerin bozulmasına bağlı olarak total körlük oluşur (Lamba ve Pugh, 2004).

1.3. Fototransdüksiyon

Fototransdüksiyon çomak ve koni hücrelerinin, yakaladıkları fotonlara cevap olarak elektriksel sinyaller ürettikleri biyokimyasal bir prosestir. 3 basamaktan oluşur.

1- Rodopsinin ışık uyarımı ve fotoizomerizasyon

2- CNG- kanallarının kapanması ve plazma membranının hiperpolariyasyonu

3- Sinaptik sonda nörotransmitter madde (L- glutamat) üretiminin baskılanması (Yau, 1994)

Karanlıkta 5 μM civarındaki serbest cGMP konsantrasyonu, plazma membranındaki siklik nükleotid-kapılı kanalların (CNG-kanalları) belirli bir fraksiyonunu açık tutmaya yeter. CNG-kanalları Ca^{2+} iyonlarına da geçirgendir. Karanlıkta CNG-kanallarından hücre içerisine taşınan iyonların %10'luk kısmını Ca^{2+} iyonları teşkil eder. Ca^{2+} iyonları CNG-kanallarıyla hücre içine girerken Na+/K+,Ca^{2+} pompasıyla hücre dışına atılır. Bu mekanizma, intraselüler serbest Ca^{2+} konsantrasyonunu 500-600 nM civarında tutar. cGMP'nin retGC tarafından

sentezi ve fosfodiesteraz (PDE) tarafından yıkımı çok az miktarda gerçekleşir. Heterotrimerik G-proteini transdusin, GDP-bağlı halinde olduğundan aktif değildir. Ca^{2+}-bağlayıcı protein kalmodulin, recoverin ve GCAP'ler (GCAP1 ve GCAP2) sırayla hedef proteinleri olan CNG-kanalı, rodopsin kinaz ve ROS-GC'ı bağlamış durumdadır (Koch ve ark., 2002).

Işığın fotopigment rodopsin tarafından absorpsiyonu fototransdüksiyon kaskadının aktivasyonuyla sonuçlanır. Transdusinin GTP-bağlı α-alt ünitesinin, cGMP spesifik fosfodiesterazı aktive etmesi, fosfodiesterazın yüksek bir geri dönüşüm sayısıyla cGMP yıkımına neden olur. Bunun sonucunda CNG-kanalları kapanır. Ca^{2+} iyonlarının Na+/K+,Ca^{2+} pompası tarafından hücre dışına atılımı ışık uyarımından sonra da devam ettiği için sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonunu 100 nM'ın altında bir seviyeye düşürür. Plazma membranı hiperpolarize olur (-70 mV) (Chen, 2005).

Stoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişim Ca^{2+}-bağlayıcı proteinler tarafından hissedilir. Kalmodulin CNG-kanalından disosiye olur. Bu da kanalın cGMP hassasiyetini arttırır. Rodopsin kinazın, recoverin tarafından inhibisyonu ortadan kalkar ve rodopsin fosforillenebilir. GCAP'ler ROS-GC'ı aktive ederler ve cGMP sentezi artar. Arrestin fosforillenmiş rodopsini bağlar ve transdusinin bağlanmasına ve aktivasyonuna engel olur. ROS-GC'ın GCAP'ler tarafından kontrolü bu Ca^{2+} medyalı geri besleme sisteminin kilit noktasıdır. Tükenen cGMP havuzunun yeniden dolmasıyla kaskadın son bulması CNG-kanallarının yeniden açılmasına ve karanlık hale adaptasyona izin verir (Sharma ve ark., 2004).

1.4. Guanilat Siklaz Aktive Edici Proteinler

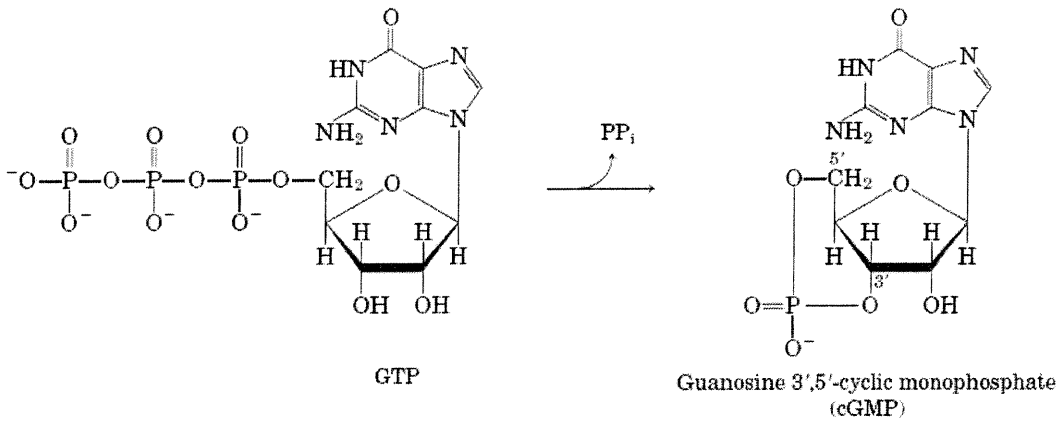
Guanilat siklaz aktive edici proteinlere (GCAPler) ait ilk kanıt, Koch ve Stryer (1988), hipotonik tamponla yıkanan ROS membranlarına ait 100000xg"lik süpernatanın retGC'yi kalsiyuma bağımlı bir mekanizma ile aktive ettiğini gösterdikleri zaman elde edilmiştir. GCAPler fotoreseptör hücrelerinde bulunan membrana bağlı guanilat siklazların aktivitesini düzenleyen kalmodulin benzeri Ca^{2+}-bağlayıcı proteinlerdir. Nöronal kalsiyum sensör proteinleri (NCS proteinleri)

ailesine aittirler. 3 tanesi fonksiyonel olmak üzere 4 adet Ca^{2+}-bağlayıcı EF-eli (EF-hand) motifi ve N-terminal miristollenmesi için bir konsensüs bölgesi içerir. Ca^{2+} bu bölgelere karşı yüksek affiniteye sahiptirler. Böylece GCAP'ler görsel sinyal iletiminde Ca^{2+} dedektörleri olarak işlev görürler (Koch ve ark., 2002) .

Retinal guanilat siklazları düşük Ca^{2+} konsantrasyonlarında aktive ederken, yüksek Ca^{2+} konsantrasyonlarında inhibe ederler. Memelilerde şimdiye kadar 3 farklı GCAP tanımlanmıştır. Ancak diğerinin salınımı GCAP-1 ve GCAP-2'ye nazaran daha sınırlıdır. Örneğin GCAP-3 spesifik olarak balık ve insan koni hücrelerinde salgılanmasına rağmen fare fotoreseptör hücrelerinde bulunmamaktadır. Zebra balığı ve kirpi balığı gibi teleost balık türlerinde, bunlardan başka beş farklı GCAP geni (GCAP4-8) daha tanımlanmıştır. GCAP-1 çoğunlukla koni hücrelerinden salgılanırken, GCAP2 ekseriyetle çomak hücrelerinde ve daha az seviyede koni hücrelerinde tespit edilmiştir (Imanishi et al., 2004).

1.5. Retinal Guanilat Siklazlar

Guanozin trifosfattan (GTP), 3'-5' siklik monofosfatın sentezini katalizleyen reseptör bir enzimdir.



Şekil 1.3. GTP'nin cGMP'ye dönüşümü.

cGMP çeşitli dokularda farklı mesajları hedef merkezlerine taşıyan bir ikincil mesajcıdır. Böbrekte iyon transportundaki değişimleri tetikler, düz kas dokusunda gevşemeyi uyarır, beyinde hem gelişim döneminde hem de erişkin birey

fonksiyonlarının yerine getirilmesinde görev alır. Omurgalı canlılarda fototransdüksiyonla ilişkilidir (Waldman ve Murad, 1987).

Böbrek guanilat siklazı, kalp kulakçığı artan kan hacmi nedeniyle gerildiği zaman kalp kulakçığındaki hücreler tarafından salgılanan atrial natriüretik faktör (ANF) hormonu tarafından aktive edilir. Kan yoluyla böbreğe taşınan ANF, toplama kanallarındaki guanilat siklazı aktive eder. Sonuçta yükselen cGMP konsantrasyonu, böbrekten Na^+ ve buna bağlı olarak su atılımını arttırır. Su kaybı kan hacmini düşürür, böylece başlangıçta ANF salgılanmasına neden olan uyarıya cevap verilmiş olur (San ve Selçuk, 1993).

Veziküler düz kas da ANF reseptör guanilat siklaza sahiptir. Bu reseptöre bağlanan ANF, damar gevşemesine (vazodilasyon) neden olur ve kan basıncı düşer.

Bağırsak epitel hücre membranlarında yer alan benzer bir GC, bağırsakta Cl^- salınımını uyaran bir bağırsak peptidi olan guanilin tarafından aktive edilir (Birman, 1996).

Bu reseptör ayrıca E.coli ve diğer gram negatif bakteriler tarafından salgılanan ısıya dayanıklı bir peptid olan endotoksinin de hedefidir. cGMP konsatrasyonunda endotoksinin neden olduğu yükselme, Cl^- salınımını arttırır. Buna bağlı olarak suyun geri emilimi düşer ve diyare gözlenir.

Tür olarak farklı bir GC ise hem grubu içeren sitozolik bir proteindir. Bu enzim nitrik oksit (NO) tarafından aktive edilir. Ca^{2+}-bağımlı NO sentaz vasıtasıyla sentezlenen NO birçok memeli dokusunda bulunur ve sentezlendiği hücrelerden komşu hücrelere difüze olur.

NO plazma mebranından taşıyıcıya ihtiyaç duymadan geçecek kadar apolardır. Hedef hücresinde, guanilat siklazın hem grubuna bağlanır ve cGMP üretimini inhibe eder. cGMP kalpte kalsiyum iyonunu sitoplazmadan dışarı atan iyon pompalarını uyararak daha zayıf kasılmalar meydana getirir (Nelson ve Cox, 2000)..

Membrana bağlı guanilat siklazların diğer bir türü omurgalıların fotoreseptör hücrelerinden salgılanır. Fotoeksitasyonun intraselüler mesajcısı guanozin 3′,5′-siklik monofosfatı (cGMP) sentezlediklerinden fotoreseptör fizyolojisinde önemli bir rol oynarlar. 4 alt tipi retinadan klonlanmıştır. Bunlardan ikisi peptid reseptörlerdir ve fototransdüksiyonda görev almazlar. Diğer ikisi ise peptid reseptörleri değildir ve

ROS-GC1 ve ROS-GC2 (veya retGC1 ve ret GC2) olarak adlandırılırlar (Palczewski ve ark., 2004). Bu siklazlar birçok bakımdan hormon peptid reseptör guanilat siklazlardan ayrılırlar. Kendilerine has özelliklerinden bir tanesi Guanilat Siklaz Aktive Edici Proteinler (GCAP) denilen üç küçük Ca^{2+}-bağlayıcı protein tarafından düzenlenmeleridir. Bu düzenleyici proteinler iluminasyon sırasında sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonundaki, [Ca^{2+}], değişimlere duyarlılık gösterir ve [Ca^{2+}] karanlığa adapte olmuş hücrede 500-600 nM seviyesinin altına düştüğünde ROS-GC'i aktive eder (Peshenko ve Dizhoor, 2004)

Membrana bağlı guanilat siklazların ön görülen alt ünite yapıları, bir ekstraselüler alt ünitesi (ECD) veya intradiskal alt ünitesi (IDD), bir transmembran segmenti, bir jukstamembran alt ünitesi (JMD), bir kinaz homoloğu alt ünitesi (KHD), bir dimerizasyon alt ünitesi(DD), bir sitoplazmik katalitik alt ünitesi (CCD) ve bir C-terminal uzama alt ünitesi (CTE) içerir (Goraczniak ve ark., 1994). GCAP1 ROS-GC1'in jukstamembran alt biriminde yer alan iki hedef bölgesi mevcuttur (^{445}M-^{456}L; ^{503}L-^{522}I) (Lange ve ark., 1999). GCAP2'nin hedef bölgesi ise enzimin katalitik alt biriminde (^{912}G-^{929}G) yer alır (Sokal ve ark., 1999).

1.6. Retinal Hastalıklar

Kalıtsal retina bozuklukları, körlükle sonuçlanan ileri dereceli görme bozukluklarının ana sebebidir. Klinik ve genetik açıdan farklılık gösterirler. Retina distrofileri, çeşitli genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu genler, fototransdüksiyon, görme döngüsü, transkripsiyon faktörleri, yapısal ve metabolik olaylar gibi çeşitli görevlere sahip olan retinal proteinleri kodlarlar (Duda ve Koch, 2002). RetGC1 genindeki mutasyonların 1. tip Leber Congenital Amaurosis (LCA1) ve 6. tip koni-çomak bozukluğuna (CORD6) neden olduğu bildirilmiştir. Şimdiye kadar retGC2 geninde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır (Perrault ve ark., 1999).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Koch (1991), fotoreseptör guanilat siklaz, sığır çomak hücresi dış segmentlerinden n-dodesil-β-D-maltozid, non-iyonik deterjan, kullanılarak 50-150 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan siklazın molekül ağırlığı 112 kDa, spesifik aktivite değeri ise 100-700 nmol cGMP/dak/mg Rodopsin olarak bildirilmiştir.

Duda ve Ark. (1996), sığır fotoreseptör guanilat siklazının Ca^{2+} ile modülasyonunu incelemişlerdir. GCAP1 uyarımlı rekombinant ROS-GC aktivitesinin bazal aktiviteye oranla 6-8 kat arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca çapraz bağlama deneyleri ile GCAP-1'in ROS-GC'deki bağlanma bölgelerini belirlemişlerdir.

Goraczniak ve ark. (1997), sığır retina cDNA kaynaklarından ROS-GC2 ve GCAP2 genlerini klonlamış ve COS-7 hücrelerinden ekspresyonunu sağlamışlardır. ROS-GC1 ile ROS-GC2 arasındaki yapısal benzerlikleri göstermişlerdir. Yeniden yapılandırma deneyleriyle, ROS-GC2 aktivitesinin düşük Ca^{2+} konsatrasyonlarında GCAP2 tarafından düzenlendiğini rapor etmişlerdir.

Lange ve ark. (1999), fotoreseptör guanilat siklazın GCAP1 tarafından Ca^{2+} bağımlı düzenlemesinden sorumlu bölgelerini peptit yarışma ve mutagenez çalışmalarıyla belirlemişlerdir. ROS-GC'nin juxtamembran alt birimine ait olan M445-L456 ve L503-I522 bölgelerinin, enzimin GCAP1 tarafından aktivasyonunda kritik öneme sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Yu ve Ark. (1999), çomak hücresi dış segment (ROS) homojenatları ve GCAP içeriği uzaklaştırılmış ROS membranları ile çapraz-bağlama deneyleri yapmışlar ve retinal guanilat siklazların aktif formunun dimeri olduğunu keşfetmişlerdir. Çapraz-bağlayıcı olarak bis-sülfosüksinimidil suberat (BS^3) kullanmışlardır.

Mendez ve Ark. (2001), transgenik farelerde guanilat siklaz aktive edici proteinleri baskılayıp yaptıkları elektrofizyolik ve guanilat siklaz aktivitesi ölçümlerinin sonucunda guanilat siklaz aktive edici proteinlerin, karanlıkta ışığa karşı hassasiyetini düşürerek, aşırı parlak ışıkta ise yükselterek guanilat siklazların aktivitesini düzenlemede önemli rol oynadıklarını göstermişlerdir.

Dean ve ark. (2002), retinoidlerin fotoreseptör membranlarındaki CNG kapılı Na^+ kanalları üzerine etkisi elektrofizyolojik olarak ölçmüş ve retinoidlerin kanalları inhibe ettiğini gözlemlemişler.

Hwang ve ark. (2002), yüzey plasmon rezonans spektroskopisi (SPR) kullanılanarak Ca^{2+} bağlı miristollenmiş ve miristollenmemiş GCAP1 ve GCAP2 fosfolipit zarda immobilize edilmiştir. Miristol grubu, GCAP-1'in Ca^{2+} hassasiyetini kontrol ederken, GCAP2' nin hassasiyeti üzerine etkisi gözlenmemiştir.

Yamazaki ve ark. (2003), fotoreseptör dış segment homojenatlarını ATP ve AMP-PNP ile preinkübe edip GCAP2 aktivasyonlu retinal guanilat siklaz aktivitesini kontrol grubuna oranla 10-13 kat arttırdığını gözlemlemişler.

Yamazaki ve Ark. (2005), GCAP uyarımlı ret-GC aktivitesi üzerine, GC deneyinden önceki ATP'nin preinkübasyon ve deney sırasındaki aktivasyon etkisini incelemişlerdir.

Chen ve Ark. (2005), fare ve kurbağalarda, fotoreseptör dış segmentlerinde all-trans retinalin, all-trans retinole indirgenmesini floresans imgeleme yöntemiyle incelemişlerdir. Reaksiyonun NADPH'a bağımlı olduğunu bildirmişlerdir.

Yamazaki ve ark. (2006), karanlığa adapte olmuş fotoreseptör dış segment homojenatlarını ilümine edip AMP-PNP preinkübasyonundan önce 11-cis-retinal ve hidroksilamin ile muamele edip retGC aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Poliklonal anti ret-GC1 antibadisi ve GCAP2 Jülich Forschungszentrum'dan temin edildi.

Araştırmada kullanılan kimyasallar; HEPES, potasyum klorür, sodyum klorür, magnezyum klorür, mangan klorür, PVDF membran, Na_2EDTA, kalsiyum karbonat, kalsiyum klorür, PMSF, EGTA, DTT, GTP, ATP, zaprinast, APS, bis-akrilamid, tris-HCl, TEMED, glisin, metanol, sodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, süt tozu, etanol, Tween 20, all-trans retinal, potasyum hidroksit, ECL çözeltisi, asetik asit, izo-butanol, 2-propanol, potasyum dihidrojen fosfat, BAPTA, cGMP, sükroz, sıvı azot, triton X-100, sığır serum albumini, sodyum dodesil sülfat, taktin, coomassie blue G-250, BS^3, anti-tavşan immunoglobulini (keçiden).

Araştırmada kullanılan cihazlar; pH metre, manyetik karıştırıcı, girdap karıştırıcı, inkübatör, otomatik mikropipetler, buz makinası, analitik terazi, ultrasantrifüj, termometre, UV-visible spektrofotometre, fotometre, HPLC, vakumlu süzgeç, güç kaynağı, elektoroforez cihazı, Western-Blot elektrotları.

3.2. Metod

3.2.1. Çomak Hücresi Dış Segment (ROS) Homojenatının Hazırlanması

Çomak hücresi dış segment hazırlanması taze temin edilen dana gözlerinden loş kırmızı ışık altında Koch ve arkadaşlarının (1994) önerdiği metoda göre yapıldı. Bu işlem, sitoplazmik proteinlerin kaybını en aza indirmek için ılımlı tuz konsantrasyonlarında, sükroz yoğunluk gradiyenti santrifügasyonu ile gerçekleştirildi. ROS preparatı -80°C'de depolandı. Rodopsin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 595 nm'de absorbans ölçümünün ardından Lambert-Beer yasası uyarınca tespit edildi ($\varepsilon_{595} = 40000\ m^{-1}*cm^{-1}$).

3.2.1.1. Yoğunluk Gradiyentinin Hazırlanması

Yoğunluk gradiyenti santrifüjlemesi için farklı konsantrasyonlardaki sükroz çözeltileri, gradiyent düzeneği vasıtasıyla belirli oranlarda karıştırılarak gradiyent tüplerine alındı.

Tamponların Ortak Bileşenleri:

115 mM NaCl
2,5 mM KCl
1 mM $MgCl_2$
10 mM HEPES (KOH ile bazikleştirilmiş) pH 7,4
1 mM DTT (taze ilave edilir)

Tampon A : Hacim= 500 mL 800 mM Sükroz + Ortak Bileşenler

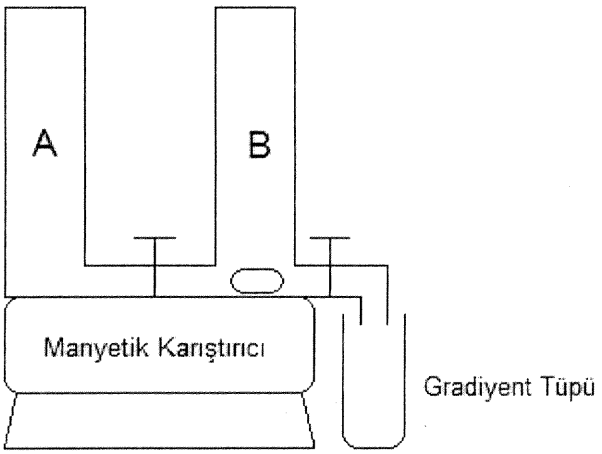
Gradiyent için Tampon B : Hacim= 500 mL 1250 mM Sükroz + Ortak Bileşenler

Tampon B : Hacim= 500 mL 1500 mM Sükroz + Ortak Bileşenler

Tampon C : Sükroz içermez. Ortak bileşenleri içerir.

Tampon D : 10 mM HEPES(KOH ile bazikleştirilmiş) pH 7,4
1 mM DTT (taze ilave edilir)
0,1 mM PMSF (taze ilave edilir)

Stok Çözeltiler: 1000 mM DTT 100 mM PMSF (2-Propanolde çözülmüş)



Şekil 3.1. Sükroz yoğunluk gradiyenti düzeneği

Sükroz yoğunluk gradiyentlerini hazırlamak için, gradiyent düzeneğinin A kolonuna 12,5 mL Tampon A ve içerisinde karıştırma balığı bulunan B kolonuna ise 12,5 mL Gradiyent için Tampon B dolduruldu. A ve B kolonları arasındaki bağlantı musluğu kısa bir süre açılarak hava kabarcığı giderildi. Düzenek bir manyetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi. Her iki musluk da açılıp ve karışım gradiyent tüplerine dolduruldu. 6 adet gradiyent tüpü hazırlandı (33 retina/1 gradiyent tüpü).

3.2.1.2. Dana Gözlerinden Çomak Hücresi Dış Segmentlerinin Ekstraksiyonu

Sıvı azot alımı, DTT stok çözeltisinin hazırlanması, santrifüjde kullanılacak rotorların soğutulması işleme başlamadan önce gerçekleştirildi. Bundan sonra bütün işlemler 4°C'de gerçekleştirildi. Karanlık odada kırmızı ışık altında, karanlığa adapte olmuş dana gözleri irise paralel biçimde kesildi. Gözün içi dışına çevirilerek saydam tabaka atıldı. Siyah renkli melanin tabakasının üzerindeki retina pens ile sıyrılarak alınıp ve geniş ağızlı plastik bir şişenin içerisine konuldu. Bu işlem 204 adet dana gözü için tekrarlandı. Üzerine retina başına 0,5 mL olmak üzere 102 mL Tampon B eklenip şişe 90 saniye şiddetle çalkalandı. Ekstrakt 50 mL'lik tüplere doldurulup 4°C- 5524 x g -7 dakika boyunca santrifüjlendi (Rotor : Beckman JA14 [6000rpm]).

Süpernatant bir tülbent parçası üzerinden 250 mL'lik plastik bir silindirin içerisine süzüldü. Tampon C ile 1:2 oranında seyreltildi. Parafilmle silindirin ağzı kapatıldı ve çalkalandı. Süpernatan 50 mL'lik tüplere dolduruldu, 4°C – 9820 x g de 10 dakika santrifüjlendi (Rotor : Beckman JA14[6000rpm]). Süpernatan tekrar santrifüjlendi. 1. ve 2. santrifüjleme sonucu elde edilen pelletler Tampon A ile tekrar çözüldü ve 50 mL lik bir Falcon tüpüne aktarılıp son hacim 24 mL'ye tamamlandı. Gradiyent başına maksimum 6 mL resüspansiyondan eklendi. 4°C – 103864 x g de 90 dakika ultrasantrifüjlendi (Rotor : SW28 [24000rpm]). ROS1 ve ROS2 'ye ait olan iki bant gözlemlendi. Bantların üzerindeki süpernatan Pasteur pipetiyle uzaklaştırıldı. ROS1 ve ROS2 bantları, ucu enjektör şeklinde kesilmiş 5mL'lik pipet kullanılarak 100 mL'lik plastik silindire son hacim maksimum 38 mL olmak üzere toplandı. ROS ekstraktı 1 : 2 oranında Tampon C ile seyreltildi, parafilmle silindirin ağzı kapatıldı, çalkalandı, 50 mL'lik tüplere dolduruldu, 4°C – 12557 x g de 10 dakika santrifüjlendi (Rotor : Beckman JA20 - 10500rpm). Süpernatant Pasteur pipetiyle uzaklaştırıldı. Peletler, retina başına ROS-1 için 50 µL, ROS-2 için 12,5 µL olmak üzere toplam 12,75 mL Tampon D ile yeniden çözündürüldü. Preparat, 210 µL'lik porsiyonlar halinde Eppendorf kapsüllerinin içerisine alındı. Üzeri argon gazıyla izole edilir. Kapsülün birine Rodopsin tayini için 110 µL'lik preparat alındı. Kapsüller dik olarak kalın alüminyum folyo ile paketlendi. Yine dik olarak sıvı azotla şoklandı ve – 80 °C'de depolandı.

3.2.1.3. Fotometrik Rodopsin Tayini

Rodopsin tayini Palczewski ve arkadaşlarının (1999) önerdiği yönteme göre yapıldı. Karanlık odada ve kırmızı ışık altında, 900 µL saf su, 50 µL Triton X-100 (10%) ve 50 µL ROS karıştırıldı. 500 nm'deki absorsiyon fotometreyle ölçüldü. Daha sonra beyaz ışık açıldı ve izomerizasyon tamamlanana kadar belirli aralıklarla absorbans ölçümü alındı. Absorpsiyon değeri sabit kaldığı zaman izomerizasyon tamamlandı. İlk ve son ölçüm arasındaki fark rodopsinden kaynaklanmaktadır. Rodopsin miktarı Lambert-Beer yasası uyarınca sönüm katsayısından faydalanılarak hesaplandı.

3.2.1.4. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE elektroforezinde Laemli (1970) tarafından önerilen ve Yamada ve Weston, (1974) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.

Karanlık odada, kırmızı ışık altında 50 µL ROS üzerine 200 µL 10 mM HEPES 7,4 eklenerek 4°C - 16000 x g'de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant daha sonra jele enjekte edilmek üzere uzaklaştırıldı. Beyaz ışık açıldı. Pellet 150 µL HEPES 10 mM pH 7,4 içerisinde tekrar çözündürüldü. Süpernatant 10 kD-Filtreli Eppendorf kapsülünde 150 µL'ye konsantre edildi (4°C – 13000 x g, Invertspin : 3 dakika – 3000 x g).

Süpernatant, ROS homojenatının başlangıç hacmi olan 50 µL'ye konsantre edilemediğinden ROS homojenatı ve ROS peleti 1:3 oranında seyreltildi.

15 µL 1:3 seyreltilmiş ROS homojenatı, 15 µL ROS-Pelet ve 15 µL ROS-Süpernatant, 5 µL 4 kat konsantre SDS örnek tamponu (125 mM Tris/HCl pH 6,8; % 50 (v/v) gliserol, % 4 (w/v) SDS, 2 mM β-merkaptoetanol ve % 0,025 (w/v) bromofenol mavisi) ilave edilerek 95°C'de kaynatılmadan jele aktarıldı.

Alt Jel (%10):

Saf su	1850 µL
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	1125 µL
Bis-akrilamid çözeltisi %30	1500 µL
TEMED hazır çözelti	2,3 µL
Amonyum persülfat %10 (taze hazırlanır)	23 µL

Alt jel elektroforez plakaları arasına döküldü. Jelin üst kısmının düzleştirilmesi amacıyla üzerine 100 µL suyla doyurulmuş izo-butanol ilave edildi. Alt jel polimerleştikten sonra izobutanol-su fazı uzaklaştırılarak üst jel döküldü ve elektoroforez tarağı yerleştirildi.

Üst Jel (%5)

Saf su	867 µL
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	375 µL
Bis-akrilamid hazır çözelti %30	250 µL
TEMED hazır çözelti	1 µL
Amonyum persülfat %10 (taze hazırlanır)	10 µL

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra tarak uzaklaştırıldı ve plaka elektroforez tankına alındı. Düzenek yürütme tamponuyla [25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 10 (w/v) SDS, pH= (8,5)] doldurudu. Örneklerden 10 µL, standarttan 2 µL kuyucuklara enjekte edildi. Güç kaynağı 180V, 100 mA'e ayarlandı. Örnekler 30-40 dakika yürütüldükten sonra jel, boyama çözeltisiyle (% 0,1 (w/v) Coomassie R-250, % 10 asetik asit, %40 etanol) boyandı. Daha sonra boya sökme çözeltisiyle (% 10 asetik asit, %40 etanol) boya söküldü.

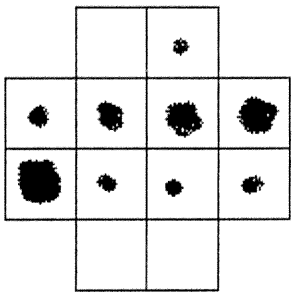
3.2.1.6. Çözünen Fraksiyonda Protein Tayini

SDS-PAGE jel elektroforezinde örnek hazırlama basamağında santrifüjleme işleminden sonra ayrılan süpernatandaki protein miktarı Bradford (1976) yöntemiyle belirlendi. Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Standart BSA çözeltisinden (0,2 mM) protein miktarları 0-1-2-4-6-8-10 µg olacak şekilde sırasıyla 0-5-10-20-30-40-50 µL alınarak saf su ile 800 µL'ye tamamlandı. Önceden 1:3 oranında seyreltilmiş ROS1 süpernatanından ise 10 µL alınarak yine saf su ile 800 µL'ye tamamlandı. Daha sonra hem standartlara hem de örneğe 200 µL Bradford reaktifi (Bio-Rad) eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 595 nm'de absorbans ölçümü alınarak standartların protein miktarlarına karşı alınan absorbanslar grafiğe geçirildi. Örneğin yaptığı absorbans değerine karşılık gelen protein miktarı grafikten belirlendi.

3.2.1.7. Çözünmeyen Fraksiyonda Protein Tayini

Çözünmeyen fraksiyondaki protein tayini Schaffner ve Weissman, (1973) metoduna göre yapıldı. SDS-PAGE jel elektroforezinde örnek hazırlama basamağında santrifüjleme işleminden sonra çökelen ve 10 mM HEPES pH 7,4 ile süspanse edilen ROS 1 peletinin protein miktarını tespit etmek için Amido-black protein tayin yöntemi kullanıldı.

Protein standardı olarak Bradford yönteminde olduğu gibi yine sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Standart BSA çözeltisinden (0,2 mg/mL) protein miktarları 2-4-6-8-10 µg olacak şekilde sırasıyla 10-20-30-40-50 µL alınarak su ile 100 µL'ye tamamlandı. Önceden 1:3 oranında seyreltilmiş olan ROS1 pelet süspansiyonundan 1 µL (3,16 µg Rh/1 µL) alınarak su ile 100 µL'ye tamamlandı. Daha sonra standartlara ve örneğe 15 µL 1M Tris pH 7,5 tamponu içerisindeki % 1'lik SDS eklenip karıştırıldı. Karışıma 30 µL %104 (w/v) trikloro asetikasit (TCA) eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Bu sırada, 0,45 µm gözenekli nitroselülöz membran kurşun kalemle Şekil 3.2.'deki gibi 9x9 mm'lik 12 parçaya bölündü. Bir Nuche erleni üzerine bulunan filtre üzerine yerleştirilerek 3 mL % 6'lık TCA ile yıkandı. Daha sonra standartlar ve örnek vakum altında sırayla membran üzerine aktarıldı. Filtre membran üzerinde olduğu halde tekrar 3 mL % 6'lık TCA ile yıkandı ve membran 5 dakika boyunca boyama çözeltisiyle (0,5 Amidoblack B10, % 25 2-propanol, % 10 asetik asit) boyandı. Daha sonra membran bir miktar suyla durulandı ve birkaç kez boya sökme çözeltisiyle arka plan tekrar beyaz oluncaya dek çalkalandı ve kurumaya bırakıldı. Membran kuruduktan sonra, boyalı kısımlar daha önce işaretlenmiş bölgelerden kesilerek oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 1 mL elüsyon çözeltisinde (% 50 etanol, 25 mM NaOH ve 50 µM EDTA) karıştırılıp vortekslendi. Aynı işlemler boyalı olmayan beyaz bir parça içinde yapıldı ve kör olarak kullanıldı. Son olarak standartlar ve örneğin 630 nm'de absorbansları ölçüldü. Çizilen standart protein eğrisinden örneğin protein miktarı tespit edildi.



Şekil 3.2. Nitroselülöz membrana aktarılan protein standartları ve ROS1 peleti örnekleri

3.2.1.8. Guanilat Siklaz Deneyi

Retinal guanilat siklaz aktivitesinin ölçülmesinde Koch-Stryer (1988) ve Koch (1991) metodları baz alındı. Loş kırmızı ışıkta ROS homojenatları Mg-GC-tamponuyla inkübe edilip reaksiyon 0,1 M EDTA ile durduruldu. Örnekler 5 dakika 95°C'de kaynatıldı. Buz banyosunda soğutularak ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile cGMP konsantrasyonu belirlendi.

3.2.1.9. GCAP2 Kontrollü GC - Aktivitesinin Kalsiyuma Bağımlılığı

Hazırlanan ROS homojenatındaki guanilat siklaz aktivitesi ve Ca^{2+} ile modülasyonunu takip etmek için farklı konsantrasyonlarda Ca^{2+} içeren örneklerin guanilat siklaz aktiviteleri ölçüldü. Ca^{2+} konsantrasyonu, 0,1 M K_2H_2EGTA (pH=7,4) ve 0,1 M $K_2CaEGTA$ (pH=7,4) tamponlarının uygun fraksiyonları kullanılarak ayarlandı. 0,1 M K_2H_2EGTA (pH=7,4) ve 0,1 M $K_2CaEGTA$ (pH=7,4) tamponları Tsien ve Pozzan (1989)'ın bildirdiği yönteme göre hazırlandı.

3.2.1.9.(1). $K_2CaEGTA$ pH 7,4 Tamponunun Hazırlanması

100 mL 0,1 M $K_2CaEGTA$ pH 7,4 tamponunu hazırlamak için 3,84 g EGTA, 0,95 g $CaCO_3$ ve 1,2 g KOH 60 mL saf suda çözülerek CO_2 çıkışı sona erene kadar 50°C'de karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı KOH ile yaklaşık olarak 7,4'e ayarlandı ve pH

değeri not edildi. Çözeltiye 25 µL 1M $CaCl_2$ eklenerek pH değeri not edildi. pH tekrar 7,4'e ayarlandı ve daha sonra tekrar 25 µL 1M $CaCl_2$ eklendi. Her basamak sonundaki pH değişimleri kaydedildi. Bu işleme her $CaCl_2$ eklemesinden sonra pH değerindeki değişim belirgin bir şekilde azalıncaya kadar devam edildi. ΔpH/ ΔCa değeri başlangıç değerinin yarısına düştüğünde çözelti saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Tampon -21°C - 8000 rpm (Biofuge-50mL)'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant 0,45 µm gözenekli filtreyle süzüldü.

3.2.1.9.(2). ROS-1 Homojenatlarıyla GC İnkübasyonu

485 µL Mg^{2+}- GC- Tamponu (100 mM HEPES pH 7,4; 140 mM KCl; 20 mM NaCl, 5 mM GTP, 25 mM $MgCl_2$), 15 µL 30 mM Zaprinast (PDE inhibitörü), 25 µL 50 mM ATP ve 225 mM su ile ön karışım hazırlandı. Bu karışımdan bir örnek için 30 µL alındı.

	Ön karışım	30 µL
	EGTA Çözeltisi*	10 µL
Başlama:	ROS1	10 µL

Örnekler 5 dakika 30°C'de inkübe edildi. Daha sonra 4°C'de bekletilen 100 mM EDTA çözeltisinden 50 µL ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Örnekler 5 dakika 95 °C'de bekletilerek protein denatürasyonu sağlandı ve buz banyosuna alındı. -20°C 'de HPLC analizine kadar muhafaza edildi.

* Toplam EGTA konsantrasyonu her seferinde 2 mM olacak şekilde K_2H_2EGTA ve $K_2CaEGTA$ çözeltisinden aşağıda belirtilen miktarlarda alındı.

Örnek No	10mM K_2H_2EGTA(µL)	10mM $K_2CaEGTA$(µL)
1	10	-
2	9	1
3	8	2
4	6	4
5	5	5
6	4	6
7	2	8
8	1	9
9	-	10

3.2.1.9.(3). BAPTA Titrasyonu

EGTA türevi olan BAPTA, Ca^{2+} tamponu veya indikatörü olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kalsiyuma magnezyuma oranla 10^5 kat daha fazla seçiciliğe sahipken, EGTA'dan daha düşük bir pH hassasiyetine sahiptir. GC deneyindeki herbir örneğin serbest Ca^{2+} konsantrasyonunu belirlemek üzere, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda K_2H_2EGTA ve $K_2CaEGTA$ ile 20 µM BAPTA içeren numuneler, son hacimler 1 mL olacak şekilde hazırlandı. 230 nm ile 330 nm arası absorpsiyon spektrumu alındı. Kör olarak BAPTA içermeyen Ca^{2+}/EGTA tampon çözeltileri kullanıldı. Spektrum alınmasından sonra 254 nm'de absorpsiyon ölçümü alındı ve Lambert-Beer yasası uyarınca tamponlardaki serbest BAPTA miktarları hesaplandı ($\varepsilon_{BAPTA\text{-}254}$ = 1,6 x 10^4 M^{-1} x cm^{-1}). Buradan eşitlik (3.1) kullanılarak serbest Ca^{2+} miktarına geçildi.

$$[CaBAPTA] = [Ca^{2+}_s][BAPTA_s]/K_D(Ca) \quad (3.1)$$

$$K_D(Ca) = 107\ nM \quad (3.2)$$

$$[BAPTA]_t = [BAPTA_s] + [CaBAPTA] \quad (3.3)$$

3.2.1.10. Spesifik Aktivite

Retinal guanilat siklazın spesifik aktivitesi, birim zamanda (dakika), 1 mg rodopsin başına oluşan cGMP'nin nmol veya pmol cinsinden değeri olarak ifade edilir.

3.2.2. ATP ve AMP-PNP Preinkübasyon Deneyleri

3.2.2.1. GCAP2 Konsantrasyon Tayini

Escherichia coli hücrelerinden Schrem ve ark. (1999) tarafından önerilen metod ile elde edilen miristollenmemiş GCAP2'den 1 mg alınarak 1,5 mL su içerisinde çözündürülmüş, uygun seyreltme yapıldıktan sonra 280 nm'de saf suya karşı absorbansı ölçülmüştür.

3.2.2.2. Ret-GC Aktivitesine ATP Preinkübasyon Etkisi

ATP preinkübasyon deneyleri Yamazaki ve ark. (2003) metodu baz alınarak yapıldı. Buna göre, ROS homojenatı 1mM ATP ve 10 mM NaF içeren Tampon D (20mM HEPES, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF) ile 37°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve 100,000 x g, 4°C'de 20 dakika santrifüjlendi (Rotor: Sorvall AT 104), süpernatan atıldı. Pelet, ATP içermeyen Tampon D ile 3 kere yıkandı ve 1 µM GCAP2 içeren Tampon D ile yeniden çözüldü. ROS homojenatı, guanilat siklaz deneyinde kullanıldı. Bu aşamada, kullanılan Mg-GC-Tamponu ATP içermemektedir. Kontrol için, aynı işlemler ATP içermeyen Tampon D ile tekrar edildi ve GCAP2 içermeyen Tampon D ile çözüldü.

3.2.2.3. Ret-GC Aktivitesine AMP-PNP Preinkübasyon Etkisi

AMP-PNP preinkübasyon deneyleri Yamazaki ve ark. (2003) metodu esas alınarak yapıldı. ROS homojenatı 5mM AMP-PNP içeren Tampon D (20mM

HEPES, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF) ile 0°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi ve 100,000 x g, 4°C'de 10 dakika santrifüjlendi (Rotor: Sorvall AT 104), süpernatan atıldı. Pellet, 5 mM AMP-PNP içeren Tampon E (10 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM PMSF) ile 3 kez, Tampon F (10 mM HEPES, pH 7.5, 1mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 0.1 mM PMSF) ile 2 kez yıkandı, 1 µM GCAP-2 içeren Tampon F içerisinde çözülerek 10 dakika beklendi ve retGC olarak kullanıldı. Aktivite tayininde kullanılan Mg-GC-Tamponu AMP-PNP veya ATP içermez. Kontrol için, aynı işlemler AMP-PNP içermeyen tamponlarla tekrarlandı ve GCAP2 içermeyen Tampon F ile çözüldü.

3.2.3. Ret-GC Aktivitesine All-Trans Retinal Etkisi

All-trans retinalin, ret-GC1 aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla, ROS homojenatı farklı konsatrasyonlardaki all-trans retinal ile inkübe edildi. Etanol içerisinde 10 mM all-trans retinal stok çözeltisi hazırlanarak, örneklerdeki son all-trans retinal konsantrasyonları 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 1000 µM olacak şekilde ayarlandı. Guanilat siklaz deneyi, hem yüksek Ca^{2+} konsantrasyonları (1mM $CaCl_2$), hem de düşük Ca^{2+} (1 mM EGTA) konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatoğrafisi

GC deneyinden sonra örneklerin oluşan cGMP içerikleri ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatoğrafisiyle tespit edildi. Örnekler 13000xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Herbir örnekten 50 µL, C18 ters-faz (EZChrome Elite, Agilent) kolonuna enjekte edilerek 0-70% metanol/5 mM KH_2PO_4, pH=5 gradiyenti ve 1,2 mL/dakika akış hızı ile elüe edildi. Örneklerdeki cGMP içerikleri 254 nm'de UV-dedektörle tespit edildi.

3.2.5. Kimyasal Çapraz-Bağlama Deneyleri

Kimyasal çapraz bağlama deneylerinde Duda ve ark., (1996) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Deneyler, retinal guanilat siklazın dimerizasyonuna ATP, AMP-PNP ve all-trans retinal etkisini incelemek üzere, yüksek ve düşük Ca^{2+} konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak hidrofilik BS^3 kullanılmıştır. GC-deneyi ile aynı koşulların sağlanması için, ROS homojenatı 50 mM HEPES, 1 mM GTP, 5 mM $MgCl_2$ içeren tampon ve 1 mM BS^3 ile 0°C'de belirli aralıklarla 20 dakika inkübe edildi. Yüksek Ca^{2+} konsantrasyonu için 1mM $CaCl_2$, düşük Ca^{2+} konsantrasyonu içinse 1 mM EGTA eklendi. Tüm ROS yerine membranlarla çalışıldığı zaman, ROS homojenatı yıkama tamponu (10 mM HEPES pH 7,4; 0,1 mM PMSF; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; mg Rh/4 mL yıkama tamponu) ile 2 kez yıkandı (4°C-30 dakika- 49000xg). Daha sonra 50 mM Tris-HCl pH=8,0 ile reaksiyon durdurulup 4 kat konsantre SDS-PAGE örnek tamponu eklendi. Örnekler SDS-PAGE ve Western-Blot analizlerinde kullanıldı.

3.2.6. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

ROS homojenatları çapraz bağlama deneyinden sonra SDS-PAGE jel elektroforezine aktarıldı. Üst jel önceki gibi % 5'lik hazırlanırken, alt jel retGC-1'in dimerinin iyi seçilebilmesi için % 6 'lık hazırlandı.

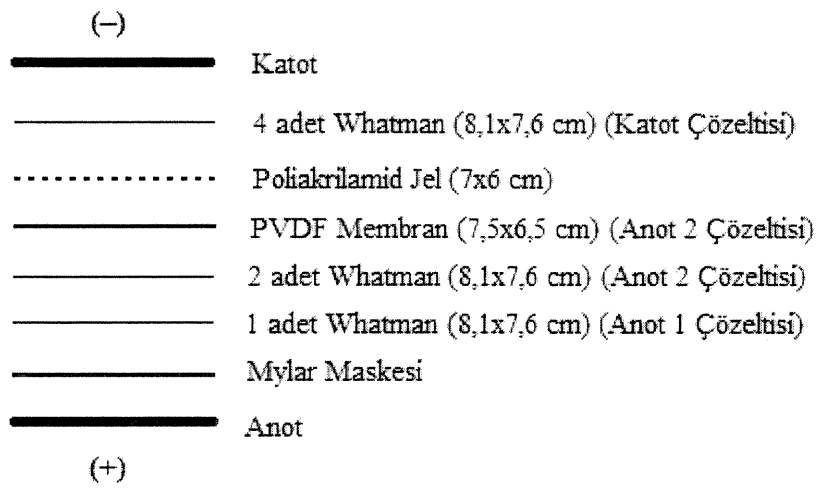
Alt Jel (% 6)

Saf su	2970 µL
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	1250 µL
Bis-akrilamid hazır çözelti %40	750 µL
TEMED hazır çözelti	3 µL
Amonyum persülfat %10 (taze hazırlanır)	27 µL

3.2.7. Western-Blot

Western-Blot analizleri Frins ve arkadaşlarının (1996) bildirdiği metoda göre yapılmıştır.

Western-Blot elektrotları hafif nemlendirilmiş, anot üzerine sırasıyla Mylar-maskesi; maskenin ortasındaki boşluğa, 1 adet Anot 1 (0,3 M Tris pH=10.4, 20% Metanol), 2 adet Anot 2 (25 mM Tris pH=10.4, %20 Metanol) çözeltisine batırılmış 3 adet Whatman kağıdı (6,5x7,5 cm) Şekil 3.3.'teki gibi yerleştirilmiştir. Üzerine, metanolle aktifleştirildikten sonra Anot 2 çözeltisine batırılmış poliviniliden diflorid (PVDF) membran (6x7 cm) yerleştirilir ve sol üst köşesi işaretlenir. SDS-PAGE jeli mebranın üzerine serilir. Üzerine Katot (25 mM Tris pH 9,4; 40 mM Glisin; % 20 Metanol) çözeltisine batırılmış 4 adet Whatman kağıdı yerleştirilerek Katot monte edilir. Güç kaynağı 100 mA, 180 V'a ayarlanır. Transfer 20 dakika sonra tamamlanır. PVDF membran 1 gece kurumaya bırakılır ve bağışıklık deneyinde kullanılır.



Şekil 3.3. Western-Blot düzeneği.

3.2.8. Immunoassay

Bir gece bekletilen PVDF membran metanolle aktifleştirilir ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bloklama çözeltisinde [PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na_2HPO_4, 3 mM NaH_2PO_4)'te çözünmüş 10 mL % 0,5 süt tozu çözeltisi] karıştırılarak bekletildi. Membran iki kez 10 dakika PBS/Tween-20 (% 0,05) ile yıkandı. Protein standardına ait olan şerit membrandan kesilerek uygun oranda(1/20.000) PBS/Tween-20 ile seyreltilmiş mono klonal antibadi (Precision step tactin) içerisinde bekletildi. Tavşandan sağlanan poliklonal retinal guanilat siklaz-1 antibadisi PBS/Tween-20 ile uygun seyreltme (1/10.000) yapıldıktan sonra membran üzerine ilave edildi ve 1 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra membran iki kez 10 dakika PBS/Tween-20 (% 0,05) yıkandı. Keçiden elde edilmiş anti-tavşan antibadisi uygun seyreltmeyle membran üzerine ilave edilip 30 dakika beklendi. Membran iki kez 10 dakika PBS/Tween-20 (% 0,05), daha sonra yine iki kez 10 dakika PBS ile yıkandı. Bağışıklık deneyinden sonra, karanlık odada, membran 2. antibadinin substrat çözeltisinde 1 dakika bekletildi. Membran PVC folyo arasına yerleştirilip radyograf içerisine alındı. Üzerine fotoğraf filmi yerleştirildi ve 5 dakika boyunca aydınlatıldı. Daha sonra film tab edildi (Frins ve ark., 1996).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1 Çomak Hücresi Dış Segment Homojenatının Hazırlanmasına Ait Bulgular

4.1.1.1. Fotometrik Rodopsin Tayini

ROS 1 homojenatının rodopsin içeriği fotometrik yöntemle belirlendi. Fotoreseptör dış segment plazma membranı Triton X-100 (%10) ile parçalanmış ve 500 nm'de alınan absorbans ölçümleri Çizelge-1'de verilmiştir. Rodopsinin fotoizomerizasyonu tamamlandığında, optik dansitedeki değişim, ekstinksiyon katsayısı (ε_{500}=40000 M^{-1} *cm^{-1}) ve molekül ağırlığı (40 kDa) değerleri kullanılarak hesaplandı ve rodopsin miktarı 9,48 mg/mL olarak bulundu.

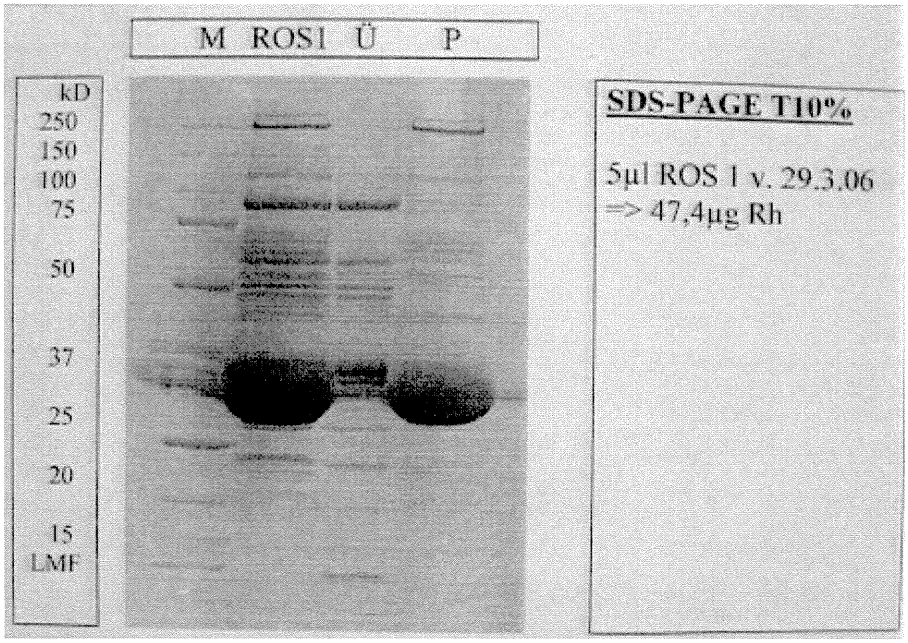
Çizelge 4.1. Rodopsinin beyaz ışık altında fotoizomerizasyonuyla 500 nm'deki absorbans değişimi.

Zaman (dakika)	ε_{500}
0	0,558
15	0,098
30	0,084
45	0,084

4.1.1.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Hazırlanan ROS1 homojenatı, çözünebilir fraksiyonları uzaklaştırmak üzere yıkandığında membran bileşenlerinin davranışlarını gözlemlemek için SDS-PAGE elektroforezine aktarıldı. Şekildeki M işaretleyiciyi, ROS1 tüm ROS1 homojenatını, Ü süpernatanı ve P çökeltiyi temsil etmektedir. Membran bileşenleri rodopsin ve guanilat siklaz sırasıyla, 38 kDa ve 110 kDa bantları olarak çökeltide görülürken süpernatantda önemsiz bantlar olarak görülmektedir. Çözünebilen fraksiyonlardan

GCAP1'e ait bant süpernatanda 22 kDa civarında görülürken çökeltide görülmemektedir.



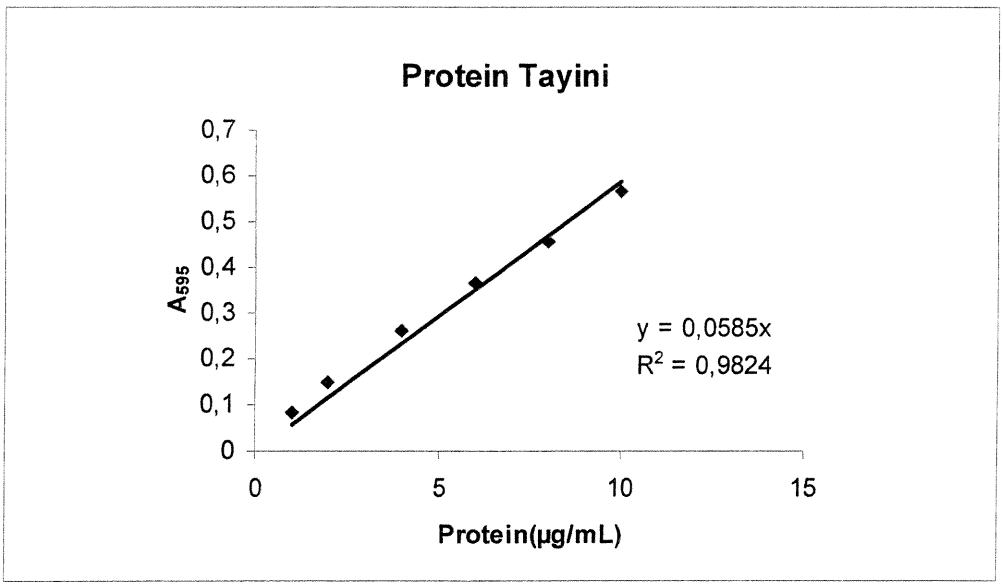
Şekil 4.1. ROS1 homojenatı, ROS1'in hipotonik tamponla ultrasantrifüjlenmesiyle çökelen ve yeniden süspanse edilen ROS1 peleti (P), süpernatan (Ü) örneklerinin ve standartların (M) %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmesi.

4.1.1.3. Çözünen Fraksiyonda Protein Tayini

Çözünebilen fraksiyonları içeren 1:3 oranında seyreltilmiş süpernatanda kalan protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edilmiştir. Sığır serum albumini standart protein çözeltisi olarak kullanılmıştır. Standartlar ve örneğin 595 nm'de alınan absorbans ölçümleri Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Çizilen standart eğri Şekil 4.2.'de görülmektedir. Örneğe ait olan absorbans değerine karşılık protein miktarı eğriden okunmuş ve çözünür kısımdaki protein miktarı 1,908 mg Protein/mL olarak bulunmuştur. Buradan, yıkama işleminden sonra ROS homojenatındaki protein içeriğinin büyük oranda çökeltide kaldığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4.2. Çözünebilir ROS1 fraksiyonunun protein içeriğinin tespit edilmesi için yapılan Bradford yöntemiyle protein tayininde standartlara ve örneğe ait absorbans değerleri.

BSA(µg/mL)	A_{595}
1	0,084
2	0,148
4	0,261
6	0,365
8	0,458
10	0,566
Örnek	0,372



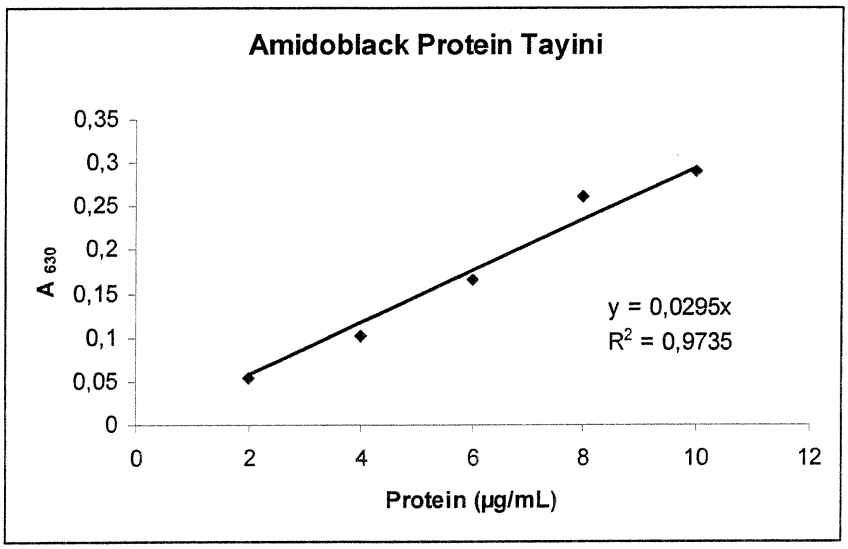
Şekil 4.2. Standartların protein miktarlarına karşı 595 nm'de alınan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart protein eğrisi.

4.1.1.4. Çözünmeyen Fraksiyonda Protein Tayini

Amidoblack protein tayiniyle çözünmeyen ROS1 pelletinin protein içeriği saptanmıştır. Örnekler ve standartların 630 nm'de ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.3.'te verilmiş ve Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Örneklere ait olan absorbans değerleri 0,083; 0,085 ve 0,097 olarak ölçülmüş ve bu değerlerin ortalamaları alınmıştır. Çözünmeyen kısımdaki protein miktarı 8,983 mg Protein/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Amidoblack ile çözünmeyen fraksiyonun protein içeriğinin belirlenmesinde standartdartlara ait olan 630 nm'deki absorbans değerleri.

BSA (µg/mL)	A_{630}
2	0,053
4	0,102
6	0,165
8	0,261
10	0,290



Şekil 4.3. Standartların protein miktarlarına karşı 630 nm'de alınan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart protein eğrisi.

4.1.2. Guanilat Siklaz Deneyi-HPLC Analizlerine Ait Bulgular

4.1.2.1. GCAP2 Konsantrasyon Tayini

GCAP-2 için, ekstinksiyon katsayısı (ε_{280}= 37512 $M^{-1}*cm^{-1}$) ve molekül ağırlığı (23 kDa) verileri kullanılarak Lambert-Beer yasası uyarınca konsantrasyonu hesaplanmış ve 36,8 μM olarak bulunmuştur.

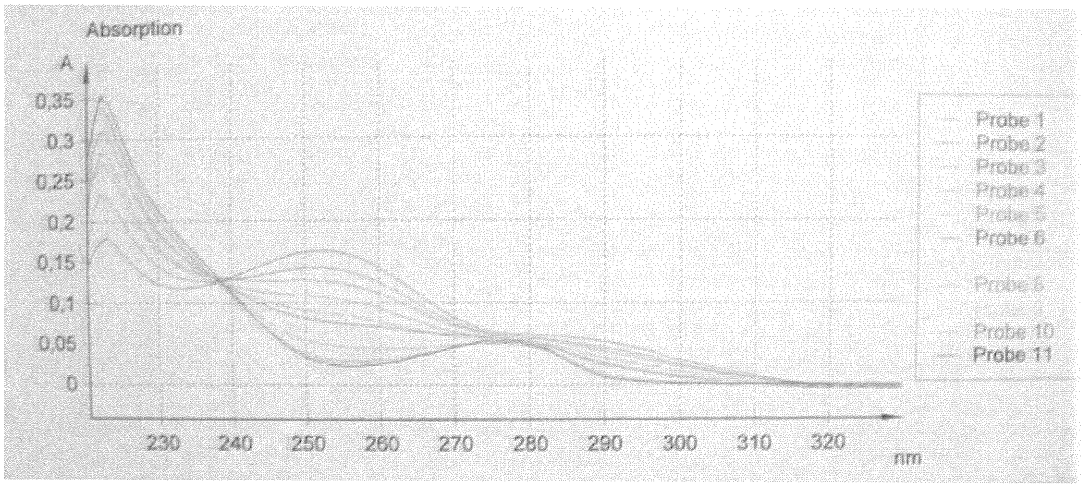
4.1.2.2. BAPTA Titrasyonu

GC deneyindeki örneklere ait olan serbest Ca^{2+} konsantrasyonlarını, $[Ca^{2+}]$, belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda K_2H_2EGTA ve $K_2CaEGTA$ içeren örneklerle aynı içeriğe sahip olan tampon çözeltilere 20 μM BAPTA ilave edilmiştir. 220-330 nm aralığında absorpsiyon spektrumu alınmıştır. 254 nm'deki absorpsiyon değerleri ayrıca kaydedilmiştir. Daha sonra Lambert-Beer yasası uyarınca tamponlardaki serbest BAPTA konsantrasyonları hesaplanmıştır ($\varepsilon_{BAPTA-254}$ =1,6*$10^4 M^{-1}*cm^{-1}$).CaBAPTA konsantrasyonu, toplam BAPTA konsantrasyonundan (20 μM) çıkarılarak serbest BAPTA konsantrasyonu hesaplanmıştır. Denge eşitliğinden tamponların $[Ca^{2+}]_s$ değerlerine geçilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir.

$$CaBAPTA \rightleftharpoons Ca^{2+} + BAPTA \qquad (4.1)$$

$$K_D = \frac{[Ca^{2+}]\,[BAPTA]_s}{[CaBAPTA]} \qquad (4.2)$$

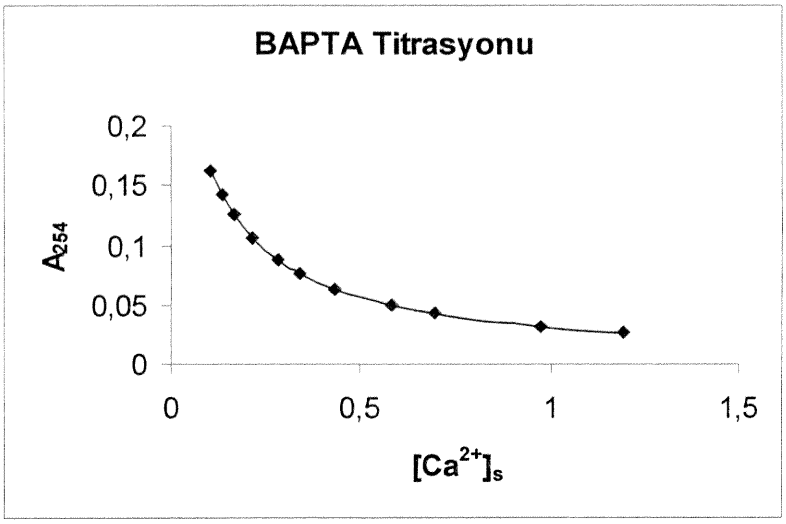
$$[Ca^{2+}]_s = K_D * [CaBAPTA] / [BAPTA]_s \qquad (4.3)$$



Şekil 4.4. GC deneyindekilerle aynı $[K_2H_2EGTA]/[K_2CaEGTA]$ kompozisyonlarına sahip olan tampon çözeltilere 20 μM BAPTA ilavesinden sonra 220-320 nm aralığında alınan absorpsiyon spektrumu.

Çizelge 4.4. GC deneyindeki örneklere ait olan $[K_2H_2EGTA]$, $[K_2CaEGTA]$, A_{254}, $[BAPTA]_s$, [CaBAPTA] ve $[Ca^{2+}]_s$ değerleri.

Örnek No	$[K_2H_2EGTA]$ (mM)	$[K_2CaEGTA]$ (mM)	A_{254}	$[BAPTA]_s$	[CaBAPTA]	$[Ca^{2+}]_s$
1	2,0	0	0,1628	10,2	9,8	0,103
2	1,8	0,2	0,1420	8,9	11,1	0,134
3	1,6	0,4	0,1256	7,9	12,1	0,166
4	1,4	0,6	0,1057	6,6	13,4	0,217
5	1,2	0,8	0,0873	5,5	14,5	0,285
6	1,0	1,0	0,0768	4,8	15,2	0,339
7	0,8	1,2	0,0629	3,9	16,1	0,437
8	0,6	1,4	0,0498	3,1	16,9	0,581
9	0,4	1,6	0,0427	2,7	17,3	0,695
10	0,2	1,8	0,0316	2,0	18,0	0,977
11	0	2,0	0,0263	1,6	18,4	1,195



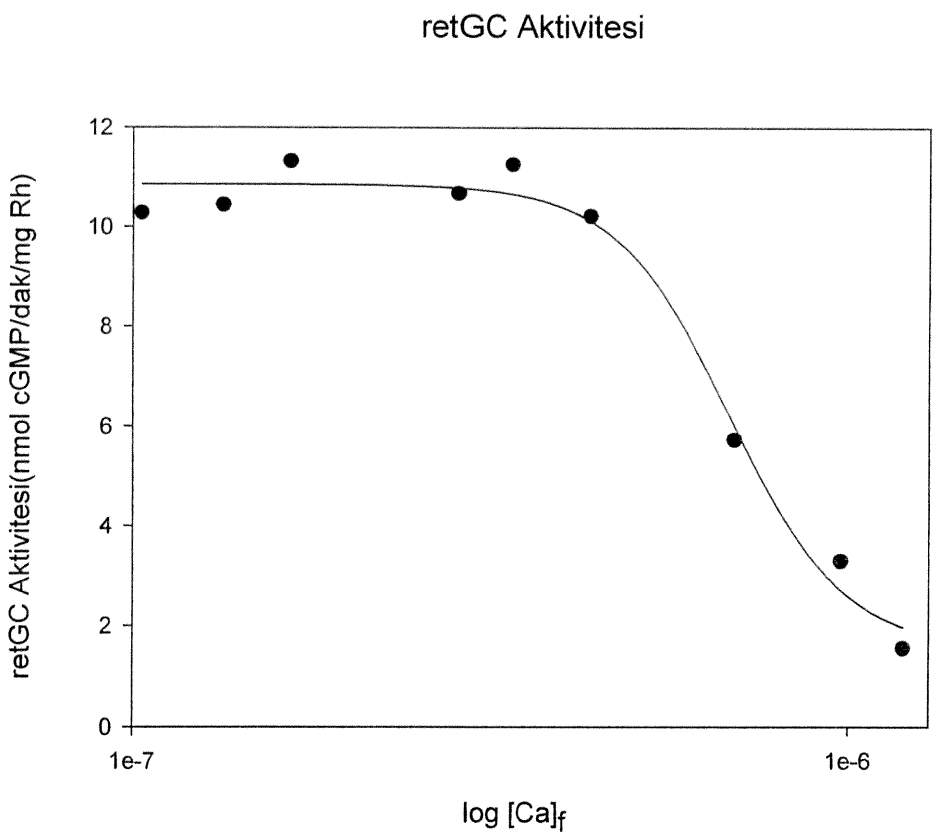
Şekil 4.5. GC deneyindeki örneklerin 254 nm'deki absorbans değerlerinin serbest Ca^{2+} konsantrasyonuyla değişimi.

4.1.2.3. GCAP Kontrollü GC - Aktivitesinin Kalsiyuma Bağımlılığı

Guanilat siklaz deneyi ve HPLC analizi sonrasında, örneklerin cGMP düzeyleri tespit edilmiş ve spesifik ativiteler *nmol cGMP/dak/mg Rh* cinsinden ifade edilmiştir. Artan Ca^{2+} konsantrasyonu, GCAP kontrollü GC aktivitesinde azalmaya yol açmış ve spesifik aktivite 10,280 nmol cGMP/min/mg Rh seviyesinden 1,555 nmol cGMP/min/mg Rh seviyesine düşmüştür. Örneklerin HPLC analizlerinden elde edilen cGMP içerikleri ve hesaplanan spesifik aktivite değerleri Çizelge 4.5.'te verilmiş ve Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. GC deneyindeki örneklerin HPLC analizleriyle tespit edilen cGMP miktarları ve hesaplanan spesifik aktivite değerleri.

Örnek No	$[K_2H_2EGTA]$ (mM)	$[K_2CaEGTA]$ (mM)	$[Ca^{2+}]_s$ (µmol)	cGMP (pmol)	Spesifik Aktivite (nmol cGMP /dak/mg Rh)
1	2,0	0	0,103	2437	10,280
2	1,8	0,2	0,134	2476	10,445
3	1,6	0,4	0,166	2683	11,320
4	1,2	0,8	0,285	2530	10,675
5	1,0	1,0	0,339	2668	11,255
6	0,8	1,2	0,437	2422	10,220
7	0,4	1,6	0,695	1357	5,730
8	0,2	1,8	0,977	781	3,290
9	0	2,0	1,195	369	1,555



Şekil 4.6. GCAP uyarımlı retGC aktivitesi üzerine serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun etkisi.

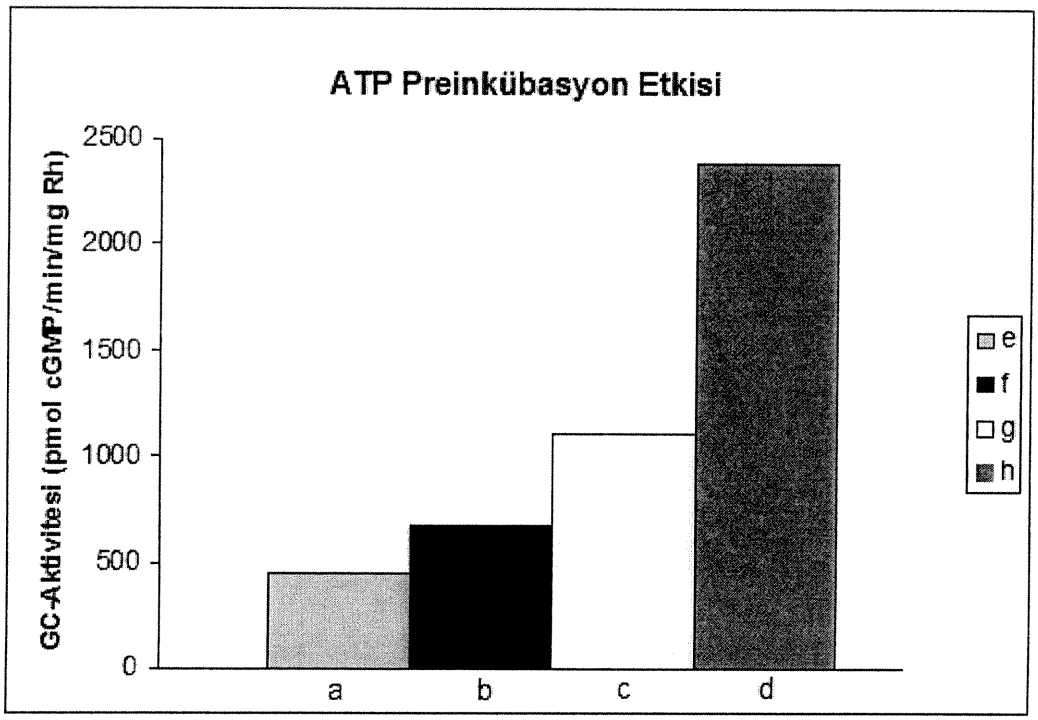
4.1.3. ATP ve AMP-PNP Preinkübasyon Deneylerine Ait Bulgular

4.1.3.1. ATP Preinkübasyon Etkisi

ROS homojenatları, ATP ile preinkübe edilmiş ve membranlar hipotonik tamponla yıkandıktan sonra GCAP2 uyarımlı guanilat aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.7.'te verilmiştir. Aktivite tayinlerinin sonucunda ATP ve GCAP2 içermeyen (**a**), ATP içermeyen 1μM GCAP2 içeren (**b**), 1 mM ATP içeren GCAP2 içermeyen (**c**) ve 1 mM ATP ve GCAP2 içeren (**d**) örneklere ait GC aktivite değerleri sırasıyla 449,6; 671,1; 1096,4; 2378,3 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.6. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. ATP preinkübasyonundan sonra HPLC analizi yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.

Örnekler	a	b	c	d
ATP	-	-	+	+
GCAP2 (1 μM)	-	+	-	+
Spesifik Aktivite (pmol cGMP/dak/mg Rh)	449,6	671,1	1096,4	2378,3



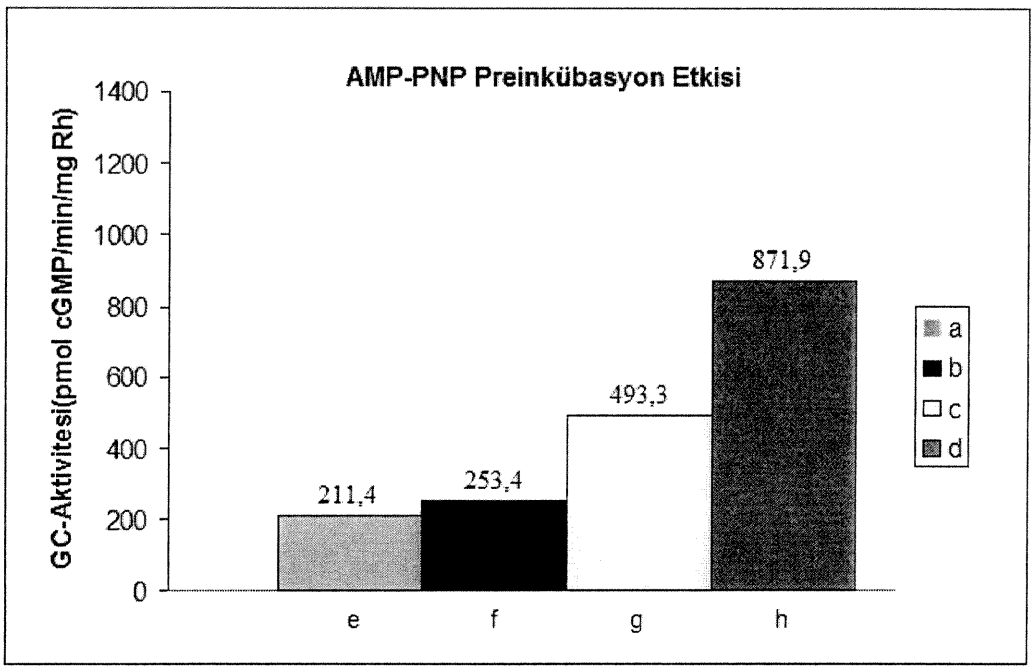
Şekil 4.7. Retinal guanilat siklaz aktivitesi üzerine ATP preinkübasyon etkisi.

4.1.3.2. AMP-PNP Preinkübasyon Etkisi

ROS homojenatları, AMP-PNP'nin GCAP2 uyarımlı guanilat siklaz aktivitesine etkisine incelemek amacıyla AMP-PNP ve GCAP2 içermeyen (**e**), AMP-PNP içermeyen 1μM GCAP2 içeren (**f**), 1 μM ATP içeren GCAP2 içermeyen (**g**) ve 1 μM AMP-PNP ve GCAP2 içeren (**h**) örneklere ait GC aktivite değerleri sırasıyla 211,4; 253,4; 493,3; 871,9 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.7. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. AMP-PNP preinkübasyonundan sonra HPLC analizi yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.

Örnekler	e	f	g	h
AMP-PNP	-	-	+	+
GCAP2 (1 μM)	-	+	-	+
Spesifik Aktivite (pmol cGMP/dak/mg Rh)	211,4	253,4	493,3	871,9



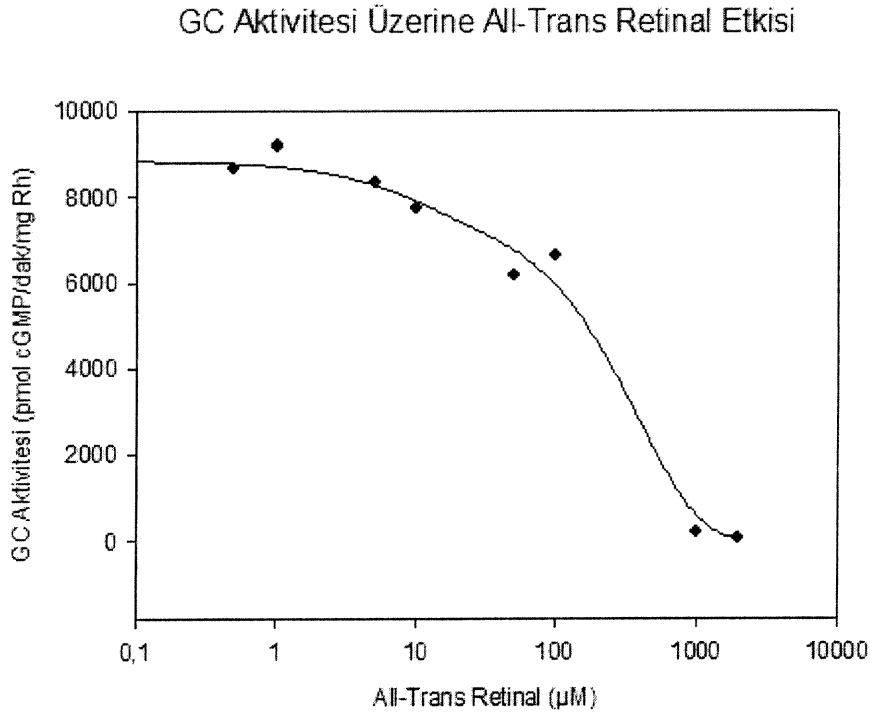
Şekil 4.8. Retinal guanilat siklaz aktivitesi üzerine AMP-PNP preinkübasyon etkisi.

4.1.3.3. All-Trans Retinal İnkübasyon Etkisi

ROS homojenatları yüksek Ca^{2+} (1 mM $CaCl_2$) ve düşük Ca^{2+} (1 mM EGTA) konsantrasyonlarında farklı all-trans retinal ile Mg-GC-Tamponuyla inkübe edilmiştir. Örneklerin daha sonra HPLC analizleri yapılmış ve spesifik akitivite değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.8. ve Çizelge 4.9.'da verilmiş ve Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Hem düşük, hem de yüksek Ca^{2+} konsantrasyonlarında, özellikle 100 μM all-trans retinal ilavesinden sonra retGC aktivitesinde azalma görülmüştür.

Çizelge 4.8. Düşük Ca^{2+} konsantrasyonunda farklı konsantrasyonlarda all-trans retinalle inkübe edilen ve HPLC analizleri yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri.

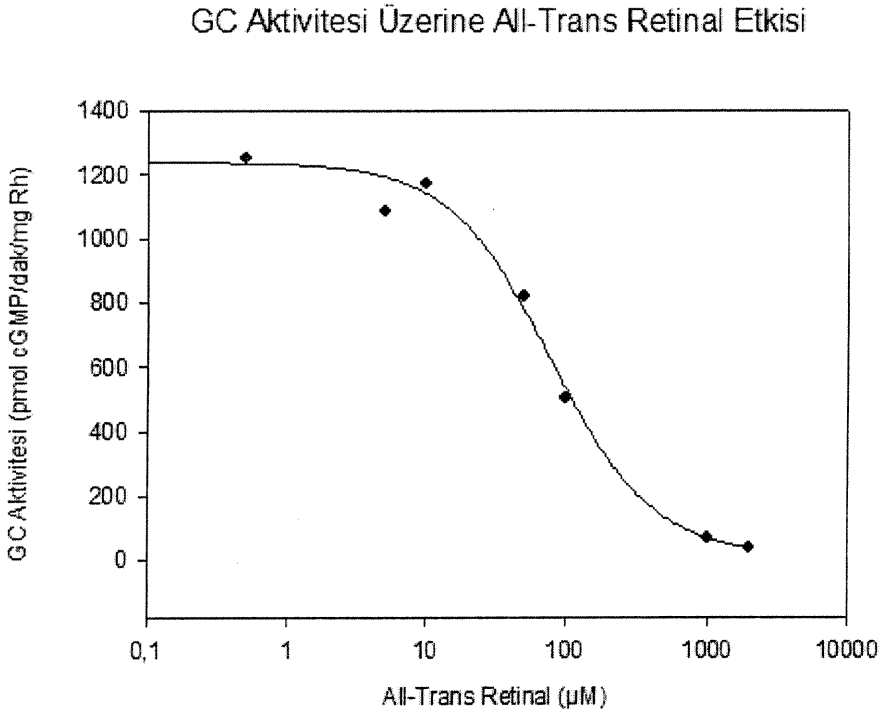
all-trans-ret(μM)	EGTA-cGMP (pmol)	Aktivite-EGTA (pmol cGMP/dak/mgRh)
0	2021,7	8530,5
0,5	2050,0	8649,8
1	2179,5	9196,3
5	1980,1	8354,9
10	1837,2	7752,1
50	1464,6	6179,7
100	1570,3	6625,9
1000	46,8	197,7
2000	17,9	75,7



Şekil 4.9. Düşük Ca^{2+} konsantrasyonunda retGC aktivitesi üzerine all-trans retinal etkisi.

Çizelge 4.9. Yüksek Ca^{2+} konsantrasyonunda, farklı konsantrasyonlarda all-trans retinalle inkübe edilen ve HPLC analizleri yapılan örneklere ait spesifik aktivite değerleri

All-trans-ret(μM)	cGMP (pmol)	Spesifik Aktivite (pmol cGMP/dak/mg Rh)
0	304,7	1285,5
0,5	296,7	1251,5
1	391,1	1650,3
5	257,1	1084,7
10	278,2	1173,7
50	193,7	817,3
100	119,0	502,0
1000	16,9	71,3
2000	9,4	39,6



Şekil 4.10. Yüksek Ca^{2+} konsantrasyonunda retGC aktivitesi üzerine all-trans retinal etkisi.

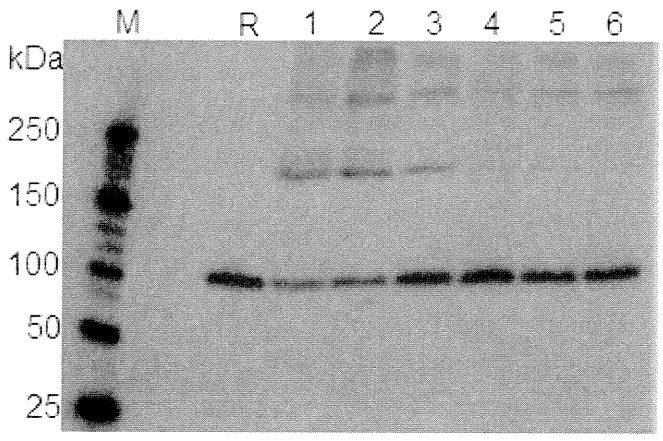
4.1.4. Çapraz Bağlama ve Bağışıklık Deneylerine Ait Bulgular

4.1.4.1. ATP'nin Retinal Guanilat Siklaz-1 Dimerizasyonu Üzerine Etkisi

Çomak hücresi dış segmentleri (ROS) ve yıkanmış ROS membranları 10 mM BS^3 ve farklı konsantrasyonlarda ATP içeren tamponla (50 mM HEPES (pH 7,5), 1mM cGMP, 1mM GTP, 5 mM $MgCl_2$) inkübe edilmiştir. Örnekler daha sonra SDS-PAGE jel elektroforeziyle analiz edilerek Western-Blot analizi için PVDF membrana aktarılmıştır.

4.1.4.1.(1). ROS ile ATP'nin İnkübasyonu

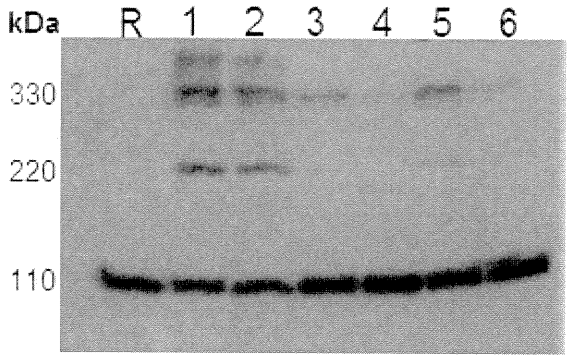
Şekil 4.11. farklı konsatrasyonlarda ATP ile inkübe edilmiş çomak dış segmentlerindeki ret-GC1 dimerizasyonunu göstermektedir. Burada M monoklonal antibadi ile işaretlenmiş protein standardını, R çapraz bağlayıcı içermeyen örneği, 1-6 numaralı örnekler ise sırasıyla 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mM ATP içeren, poliklonal antibadiyle işaretlenmiş örnekleri ifade etmektedir. retGC1 monomer (110 kDa), dimer (220 kDa) ve trimer (330 kDa) oluşumu görülmektedir. 0,1 ve 0,5 mM ATP konsantrasyonlarından itibaren ROS-GC1 dimerizasyonu inhibe olmuştur.



Şekil 4.11. ROS homojenatının farklı konsantrasyonlarda ATP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.

4.1.4.1.(2). Yıkanmış ROS Membranları ile ATP'nin İnkübasyonu

ROS homojenatları yıkama tamponu (10 mM HEPES pH 7,4; 0,1 mM PMSF; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT) ile 2 kez yıkanarak çözünebilen fraksiyonlar uzaklaştırıldı ve 50 mM HEPES, 1 mM GTP, 5 mM $MgCl_2$ içeren tampon içerisinde çözüldü. Şekil 4.12.'de ROS-GC1 dimerizasyonu üzerine ATP'nin etkisi görülmektedir. Burada R çapraz bağlayıcı içermeyen örneği, 1-6 numaralı örnekler ise sırasıyla 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mM ATP içeren, poliklonal antibadiyle işaretlenmiş örnekleri ifade etmektedir. 110 kDa'daki bantlar retGC1 monomerine ait iken, 220 ve 330 kDa bantları sırasıyla retGC1 dimeri ve trimerine aittir. 0,1 ve 0,5 mM ATP konsantrasyonlarından itibaren ROS-GC1 dimerizasyonu inhibe olmuştur.



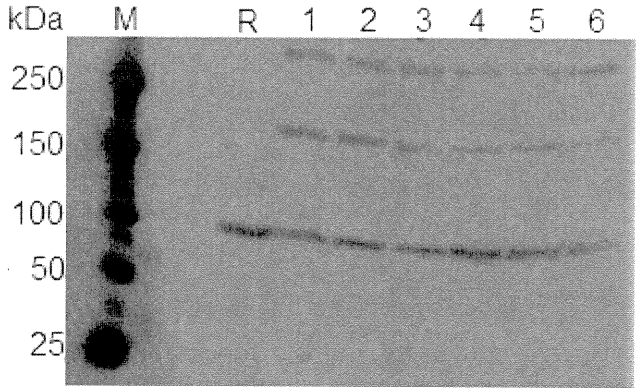
Şekil 4.12. ROS membranlarının farklı konsantrasyonlarda ATP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.

4.1.4.2. AMP-PNP'nin Retinal Guanilat Siklaz-1 Dimerizasyonu Üzerine Etkisi

4.1.4.2.(1) ROS ile AMP-PNP İnkübasyonu

Farklı AMP-PNP konsantrasyonları ve 1 mM BS^3 ile inkübe edilen ROS homojenatları SDS-PAGE jel elektroforezinden sonra PVDF membran üzerine transfer edilmiş ve poliklonal retGC1 antibadisiyle işaretlenmiştir. Şekil-10'da M, monoklonal antibadiyle işaretlenmiş protein standardını, R çapraz bağlayıcı, BS^3, içermeyen örneği, 1-6 ise sırasıyla 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mM AMP-PNP ile inkübe

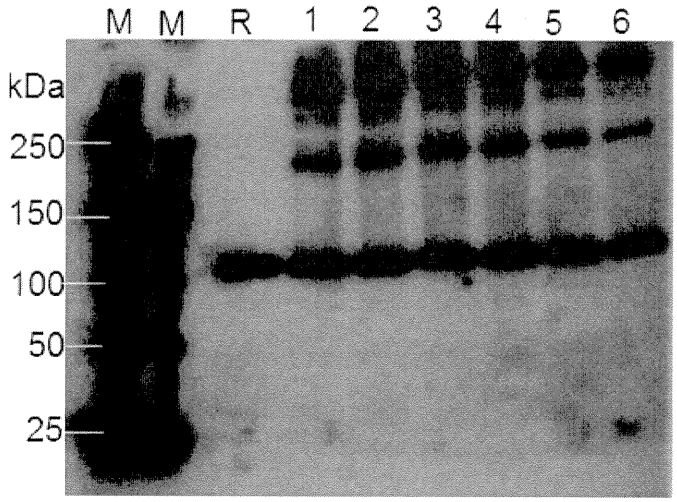
edilmiş örnekleri göstermektedir. RetGC1 monomer, dimer ve trimer oluşumu görülmektedir. Örneklerde, AMP-PNP konsantrasyonun değişimiyle birlikte retGC1 dimeri oluşumunda herhangi bir azalma görülmemiştir.



Şekil 4.13. ROS homojenatlarının farklı konsantrasyonlarda AMP-PNP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.

4.1.4.2.(2) Yıkanmış ROS Membranları ile AMP-PNP İnkübasyonu

ROS homojenatları yıkama tamponu (10 mM HEPES pH 7,4; 0,1 mM PMSF; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT) ile 2 kez yıkandı ve 50 mM HEPES, 1 mM GTP, 5 mM $MgCl_2$ içeren tampon içerisinde çözüldü. Değişen AMP-PNP konsantrasyonları ve 1 mM BS^3 ile inkübe edilen ROS membranları SDS-PAGE jel elektroforezinden sonra PVDF membran üzerine transfer edilmiş ve poliklonal retGC1 antibadisiyle işaretlenmiştir. Şekil 4.14.'de M, monoklonal antibadiyle işaretlenmiş protein standardını, R çapraz bağlayıcı, BS^3, içermeyen örneği, 1-6 ise 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mM AMP-PNP ile inkübe edilmiş örnekleri göstermektedir. RetGC1 monomer, dimer ve trimer oluşumu görülmektedir. Örneklerde, AMP-PNP konsantrasyonun değişimiyle birlikte retGC1 dimeri oluşumunda herhangi bir azalma görülmemiştir.



Şekil 4.14. ROS membranlarının farklı konsantrasyonlarda AMP-PNP ile inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonu üzerine etkisi.

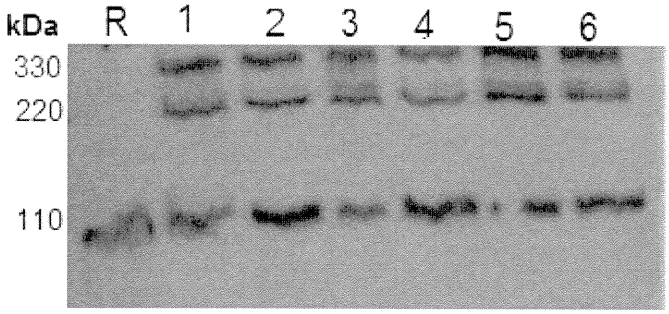
4.1.4.3. All-trans Retinal'in RetGC-1 Dimerizasyonu Üzerine Etkisi

All-trans retinal inkübasyonunun retGC1 dimerinin oluşumuna etkisini incelemek üzere ROS homojenatları, 50 mM HEPES (pH 7,5), 1mM GTP, 5 mM $MgCl_2$, 1mM BS^3 (10mM) ve farklı konsantrasyonlarda all-trans retinal içeren tamponla 20 dakika boyunca inkübe edilmiş, 50 mM Tris (pH= 8,0) ile reaksiyon durdurulmuştur. İnkübasyon hem yüksek (1mM $CaCl_2$), hem de düşük (1 mM EGTA) Ca^{2+} konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, aynı işlemler çözünür fraksiyonları uzaklaştırmak için yıkama tamponuyla (10 mM HEPES pH 7,4; 0,1 mM PMSF; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT) 2 kez yıkandıktan sonra ROS membranlarıyla tekrarlanmıştır. Sonuçlar Şekil 4-15, Şekil 4-16, Şekil 4-17, Şekil 4-18'de verilmiştir.

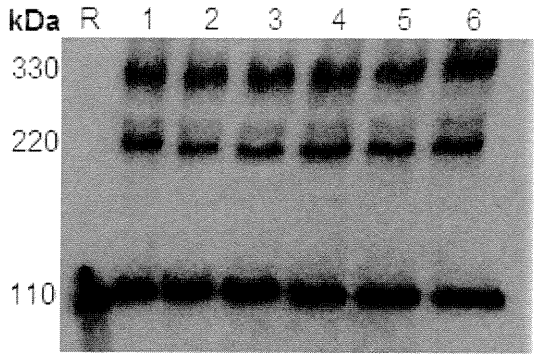
4.1.4.3.(1). ROS ile All-trans Retinal İnkübasyonu

Şekil 4.15. ve Şekil 4.16. sırasıyla yüksek kalsiyum (1mM $CaCl_2$) ve düşük kalsiyum (1 mM EGTA) konsantrasyonlarındaki ROS homojenatları, all-trans retinalin değişen konsantrasyonları (0 – 0,5 – 5 – 50 – 100 – 1000 μM) ile BS^3

varlığındaki inkübasyonun ardından SDS-PAGE ve Western-Blot deneyleri sonucu elde edilen verileri göstermektedir. Her iki koşulda da, retGC1 ait olan monomer, dimer ve trimer oluşumu görülmektedir. All-trans retinalin, ROS homojenatları ile yapılan çapraz bağlama deneylerinde retGC1 dimerinin oluşumuna herhangi bir etkisi görülmemiştir.



Şekil 4.15. ROS homojenatlarının yüksek kalsiyum konsantrasyonunda (1mM $CaCl_2$) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.

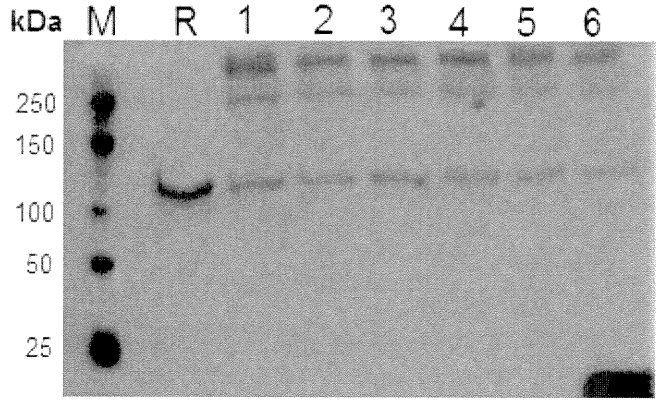


Şekil 4.16. ROS homojenatlarının düşük kalsiyum konsantrasyonunda (1mM EGTA) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.

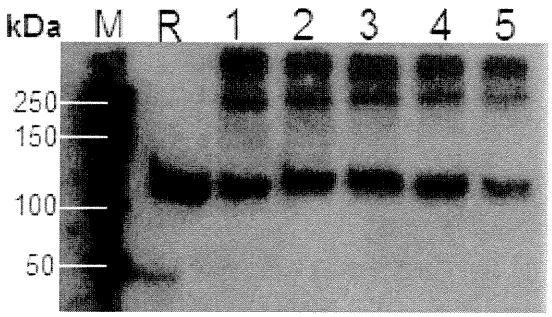
4.1.4.3.(2). Yıkanmış ROS Membranları ile All-trans Retinal İnkübasyonu

Şekil 4.17. ve Şekil 4.18. sırasıyla yüksek kalsiyum (1mM $CaCl_2$) ve düşük kalsiyum (1 mM EGTA) konsantrasyonlarındaki ROS membranları, all-trans retinalin değişen konsantrasyonları (0 – 0,5 – 5 – 50 – 100 – 1000 μM) ile BS^3

varlığındaki inkübasyonu ardından SDS-PAGE ve Western-Blot deneyleri sonucu elde edilen verileri göstermektedir. Her iki koşulda da, retGC1 ait olan monomer, dimer ve trimer oluşumu görülmektedir. All-trans retinalin, ROS membranları ile yapılan çapraz bağlama deneylerinde retGC1 dimerinin oluşumuna herhangi bir etkisi görülmemiştir.



Şekil 4.17. ROS membranlarının yüksek kalsiyum konsantrasyonunda (1mM $CaCl_2$) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.



Şekil 4.18. ROS membranlarının düşük kalsiyum konsantrasyonunda (1mM EGTA) farklı all-trans retinal derişimlerinde inkübasyonunun retGC1 dimerizasyonuna etkisi.

4.2. Tartışma

Bu çalışmada retinal guanilat siklazların, fizyolojik aktiviteleriyle ilişkili oldukları düşünülen adenin nükleotidlerinin (Yamazaki ve ark. 2005) siklaz aktivitesi üzerine düzenlenme etkileri ve all-trans retinalin fonksiyonu incelenmeye çalışılmıştır.

Enzim kaynağı olarak, temin edilmesinin kolay oluşu, bol miktarda retina ve buna bağlı olarak retGC içermesi nedeniyle dana gözleri seçilmiştir. Frins ve ark. (1996) bildirdiği metoda göre karanlığa adapte edilmiş dana gözlerinden loş kırmızı ışıklı ortamda retinalar toplanmış ve sükroz yoğunluk gradiyenti santrifügasyonuyla çomak hücresi dış segment homojenatı hazırlanmıştır. Bu yöntemle hazırlanan homojenatın yaklaşık % 95 oranında retGC1, % 5 oranında ise retGC2 içerdiği bildirilmiştir (Hwang ve ark. 2002b). Homojenatın rodopsin içeriği SDS ile plazma membranın parçalanmasından sonra fotometrik olarak ölçülmüş ve 9,48 mg Rh/mL olarak bulunmuştur.

Hazırlanan homojenatın dış segmentin çözünür kısımdaki proteinleri muhafaza edip etmediğini kontrol etmek için artan serbest Ca^{2+} konsantrasyonlarında GC aktivitesi ölçülmüş ve aktivite beklenildiği üzere GCAPlerde meydana gelen yapısal değişiklik nedeniyle siklazı aktive edememesi nedeniyle azalmıştır. Spesifik aktivite yarı mikro molar serbest Ca^{2+} mertebesinde % 50, mikro molar mertebesinde ise % 85 oranında azalmıştır. Sonuçlar literatür değerleriyle uyumludur (Hwang ve ark 2002a-b, 2001; Frins ve ark. 1996).

ATP ve AMP-PNP preinkübasyon deneyleri Yamazaki ve ark. (2003) metoduna göre yapılmış, ancak GC aktivitesi ölçümü Koch ve Stryer (1988) yöntemine göre ölçülmüştür. RetGC aktivitesinde daha önce bildirilen artma gözlenememiştir (Yamazaki ve ark. 2005, 2003). Bunun muhtemel sebebi ATP'nin deney koşullarında hidroliz oluşu veya istenmeyen bir ışık uyarımının gerçekleşmiş olması olabilir. Ancak aynı koşullarda ATP ile preinkübe edilen ROS homojenatlarındaki aktivitenin, AMP-PNP'ye göre yüksek olması önceki sonuçlarla uyumludur. Yamazaki ve ark. (2003, 2005, 2006) rapor ettikleri sonuçların daha

sonra doğrulanmamış olması bu konuda daha fazla çalışma yapılmasını öngörmektedir.

Dean ve ark. (2002) retinoidlerin, özellikle all-trans retinalin cGMP kapılı iyon kanallarının kapanmasına neden olduğunu bildirmişler, Yamazaki ve ark. (2006) ise all-trans retinalin retGC aktivitesini azaltabileceğini belirtmişlerdir. All-trans retinalin öngörüldüğü gibi bir etkiye sahip olup olmadığının araştırılması için, ROS homojenatları loş kırmızı ışık altında farklı all-trans retinal konsantrasyonlarıyla inkübe edilmiştir. GC aktivitesinin özellikle 100 μM'lık all-trans retinal konsantrasyonundan itibaren hem yüksek kalsiyum (1mM $CaCl_2$) hem de düşük kalsiyum (1mM EGTA) konsantrasyonlarında önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

Yu ve ark. (1999), retGC1'in aktif formunun dimeri olduğunu rapor etmişlerdir. Buradan hareketle ATP ve AMP-PNP preinkübasyon deneyleri ve all-trans retinal inkübasyonunun retGC1'in dimerizasyonuna etkisini incelemek üzere çapraz bağlama, western-blot ve bağışıklık deneyleri birbiri ardına yapılmıştır. ATP ile yapılan çapraz bağlama çalışmalarında hem ROS homojenatlarında, hem de çözünen fraksiyonların uzaklaştırıldığı ROS membranlarında retGC1 dimerinin oluşumu gözlenmiştir. 0,5 mM'lık ATP konsantrasyonundan itibaren retGC1 dimerinin oluşumu inhibe olmuştur. Bu ise ATP'nin retGC1 ile etkileştiğini ve yapısal bir değişime neden olduğunu göstermektedir. Aynı koşullar altında, ATP'nin hidrolize dirençli homoloğu AMP-PNP ile tekrarlandığında herhangi bir inhibisyon etkisine rastlanmamıştır. Bu nedenle, ATP'nin retGC1'e kovalent bağla bağlanıp yapısal değişikliğe sebebiyet vermesi, proteinin fosforilasyonundan daha az olası gibi görünmektedir.

All-trans retinalle yapılan çapraz bağlama çalışmalarında ise gerek yüksek, gerek düşük Ca^{2+} konsantrasyonlarında dimer oluşumunda belirgin bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum hem ROS homojenatı, hem de ROS membranları için geçerlidir. All-trans retinalle yapılan GC inkübasyonları enzim aktivitesinin artan all-trans retinal konsantrasyonuyla azaldığını gösterirken, çapraz bağlama deneylerinden dimer formunun oluşumuna etkisinin olmaması, all-trans retinalin enzimin katalitik alt ünitesini değil, diğer alt ünitelerinden birini (muhtemelen kinaz homoloğu ya da

juxtamembran alt ünitesi) etkilemiş olabileceğini göstermektedir. All-trans retinalin yüksek lipofilik özelliğe sahip olması ve ortamda nispeten yüksek konsantrasyonda bulunması membran yapısında ve buna bağlı olarak membran bileşenlerinde yapısal değişikliklere sebebiyet vermiş olabilir. Diğer bir sebep ise, all-trans retinalin enzim-substrat ilişkisini kovalent bir bağlanma gerçekleştirmeden zayıflatması olabilir. Retinal siklazların alt ünite delesyonları, all-trans retinalin retGC aktivitesini etkileme mekanizması hakkında daha sağlıklı bilgiler verebilecektir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Çomak hücresi dış segment homojenatı, karanlığa adapte edilmiş dana gözlerinden sükroz yoğunluk santrifügasyonu ile hazırlandı. Homojenatın rodopsin içeriği 9,48 mg Rh/mL olarak tespit edildi. ROS membranlarının hazırlanmasında çözünebilir fraksiyondaki protein miktarı 1,908 mg Protein/mL, pelletteki protein miktarı ise 8,983 mg Protein/mL olarak bulunmuştur.

2. GCAP kontrollü retGC aktivitesinin serbest Ca^{2+} konsantrasyonlarıyla kontrolünü gözlemlemek için yapılan GC deneyinde, yarı mikro molar serbest Ca^{2+} mertebesinde GC aktivitesi % 50, mikro molar mertebesinde ise % 85 oranında azalmıştır.

3. ATP ve AMP-PNP preinkübasyon deneylerinde Yamazaki ve ark. (2003) daha önce bildirdiği yüksek GC aktiviteleri değerleri gözlemlenememiştir.

4. All-trans retinal ile yapılan GC inkübasyonlarında GC aktivitesinin özellikle 100 μM'lık all-trans retinal konsantrasyonlarından sonra hem yüksek kalsiyum hem de düşük kalsiyum konsantrasyonunda önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

5. ROS homojenatı ve yıkanmış ROS membranlarıyla yapılan çapraz bağlama çalışmalarında 0,5 mM ATP konsantrasyonlarından itibaren retGC1 dimerizasyonu hızla azalmıştır. Aynı gözlemler hidrolize dayanıklı homolog AMP-PNP ile gözlenmemiştir.

6. All-trans retinalle yapılan çapraz bağlama çalışmaları, all-trans retinalin retGC1 dimerinin oluşumuna gerek yüksek, gerekse düşük Ca^{2+} konsantrasyonlarında herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Çalışmalar ROS ekstraktı ve yıkanmış ROS homojenatları için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

5.2. Öneriler

1. Retinal guanilat siklazın bazal ve GCAP kontrollü aktivitesi üzerine 11-cis retinalin etkisi araştırmak üzere ROS homojenatı ve çözünür bileşenlerin uzaklaştırıldığı ROS membranları farklı konsantrasyonlarda 11-cis retinal ile inkübe edilip GC aktiviteleri ölçülebilir.

2. Farklı konsantrasyonlarda 11-cis retinal ve all-trans retinol varlığında ROS homojenatı ve çözünür bileşenlerin uzaklaştırıldığı ROS membranlarıyla çapraz bağlama çalışmaları yapılarak retinal guanilat siklazın dimerizasyonuna 11-cis retinal ve all-trans retinolün etkisi incelenebilir.

3. Retinal guanilat siklazlarla rodopsinin olası etkileşimin incelenmesi için, fosforillenmiş ve fosforillenmemiş rodopsinin retinal siklazlarla çapraz bağlama deneyleri yapılabilir. Ayrıca, yüzey plazma rezonans (SPR) spektroskopisiyle gerçek zaman etkileşimleri gözlemlenebilir.

4. Rodopsin ve saflaştırılmış retinal guanilat siklazla yeniden yapılandırma deneyleri yapılabilir.

5. Retinal siklazın kinaz homoloğu ve jukstamembran alt ünitelerinin birlikte ve ayrı ayrı delesyonu sağlanarak ATP ve AMP-PNP preinkübasyon deneyleri ve çapraz bağlama deneyleri tekrarlanabilir. Böylece adenin nükleotidlerinin guanilat siklazı etkileme mekanizması araştırılabilir.

6. Retinal siklazın alt ünite delesyonları gerçekleştirilerek retinal homologlarının etki merkezleri GC aktivite ölçümleri, çapraz bağlama çalışmaları ve SPR spektroskopisiyle incelenebilir.

KAYNAKLAR

BİRMAN H, 1996. Atrial Natriüretik Faktör. İst. Tıp Fak. Mecmuası 62: 95-96

BRADFORD M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

CHEN C.K., 2005. The Vertebrate Phototransduction Cascade: Amplification and Termination Mechanism. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 155: 101–121

_____, TSINA E., CORNWALL M. C., CROUCH R. K., VIJAYARAGHAVAN S., KOUTALOSZ Y., 2005. Reduction of All-trans Retinal to All-trans Retinol in the Outer Segments of Frog and Mouse Rod Photoreceptors. Biophys. J. 88: 2278–2287.

DEAN D. M., NGUITRAGOOL W., MIRI A., MCCABE S. L., ZIMMERMAN A. L., 2002. All-trans-retinal Shuts Down Rod Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels: A Novel Role For Photoreceptor Retinoids in the Response to Bright Light? Neurobiol. 99: 8372-8377.

DUDA T., GORACZNIAK R., SURGUCHEVA I., RUDNICKA-NAWROT M., GORCZYCA W. A., PALCZEWSKI K., SITARAMAYYA A., BAEHR W., SHARMA R. K., 1996. Calcium Modulation of Bovine Photoreceptor Guanylate Cyclase. Biochem. 35: 8478-8482.

_____, and KOCH K.-W., 2002. Retinal Diseases Linked With Photoreceptor Guanylate Cyclase. Mol. and Cell. Biochem. 230: 129-138.

FRINS S., BÖNIGK W., MÜLLER F., KELLNER R., KOCH K.-W., 1996: Functional Characterization of a Guanylyl Cyclase-activating Protein from Vertebrate Rods: Cloning, Heterologus Expression and Localization. JBC 271: 8022-8027.

GORACZNIAK R.M., DUDA T., SITARAMAYYA A., SHARMA R.K., 1994. Structural and Functional Characterization of the Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase. Biochem. J. 302: 455-461.

_____, DUDA T., SHARMA R.K., 1997. Structural and Functional Characterization of

a Second Subfamily Member of the Calcium-Modulated Bovine Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase, ROS-GC2. Biochem. and Biophy. Res. Com. 234: 666–670.

HWANG J.-Y., SCHLESINGER R., and KOCH K.-W., 2001. Calcium-Dependent Cysteine Reactivities in The Neuronal Calcium Sensor Guanylate Cyclase-Activating Protein 1. FEBS Lett. 508: 355-359

_____, and KOCH K.-W., 2002a. The Myristoylation of the Neuronal Ca^{2+}- Sensors Guanylate Cyclase-Activating Protein 1 and 2. Biochim. et Biophys. Acta 1600: 111-117.

_____, and KOCH K.-W., 2002b. Calcium- and Myristoyl-Dependent Properties of Guanylate Cyclase-Activating Protein-1 and Protein-2. Biochem. 41: 13021-13028.

IMANISHI Y., YANG L., SOKAL I., FILIPEK S., PALCZEWSKI K., BAEHR W., 2004. Diversity of Guanylate Cyclase-Activating Proteins (GCAPs) in teleost Fish: Characterization of Three Novel GCAPs (GCAP4, GCAP5, GCAP7) from Zebrafish (Danio Rerio) and Prediction of Eight GCAPs (GCAP1-8) in Pufferfish (Fugu Rubripes), J. Mol. Evol. 59: 204–217.

KANDEL E.R.,, SCHWARTZ J.H., JESSEL T.M., 2000. Principles Of Neural Science. Principles of Neural Science, 4th ed., pp.507-513. McGraw-Hill, New York.

KOCH K.-W., and STRYER L., 1988. Highly Cooperative Feedback Control of Retinal Rod Guanylate Cyclase by Calcium Ions. Nature 334: 64-66.

_____, 1991: Purification and Identification of Photoreceptor Guanylate Cyclase. JBC 266: 8634-8637.

_____, LAMBRECHT H.-G., HABERECHT M., REDBURN D. and SCHMIDT H.H.H.W., (1994). Functional Coupling Of A Ca^{2+}/Calmodulin Dependent Nitric Oxide Synthase and a Soluble Guanylyl Cyclase in Vertebrate Photoreceptor Cells. EMBO J. 13: 3312-3320

_____, DUDA T. and SHARMA R. K., 2002. Photoreceptor Specific Guanylate Cyclases in Vertebrate Phototransduction. Mol. and Cell. Biochem. 230: 97-106.

LAEMLI U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

LAMBA T.D., PUGH JR. E.N., 2004: Dark Adaptation and the Retinoid Cycle of Vision. Prog. in Ret. and Eye Res. 23: 307–380.

LANGE C., DUDA T., BEYERMANN M., SHARMA R. K., KOCH K.-W., 1999. Regions in Vertebrate Photoreceptor Guanylyl Cyclase ROS-GC1 Involved in Ca^{2+}-Dependent Regulation by Guanylyl Cyclase-Activating Protein GCAP-1. FEBS Let. 460: 27-31.

MENDEZ A., BURNS M. E., SOKAL I, DIZHOOR A. M., BAEHR W., PALCZEWSKI, K., BAYLOR, D. A., CHEN J. (2001). Role of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in setting the flash sensitivity of rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 9948–9953

NELSON D.L., COX M.M., 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. Lehninger Principles of Biochemistry, 3th ed. 448-462. Worth, New York.

PALCZEWSKI K., SOKAL I., BAEHR W., 2004. Guanylate Cyclase-Activating Proteins: Structure, Function, and Diversity. Biochem. and Biophy. Res. Com. 322: 1123–1130.

_____, VAN HOOSER J.P., GARWIN G.G., CHEN J., LIOU G.I., SAARI J.C., 1999. Kinetics of Visual Pigment Regeneration in Excised Mouse Eyes and in Mice with a Targeted Disruption of the Gene Encoding Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein or Arrestin. *Biochemistry*. 38: 12012–12019.

PERRAULT I., ROZET J.-M., GERBER S., GHAZI I., LEOWSKI C., DUCROQ D., SOUIED E., DUFIER J.-L., MUNNICH A., KAPLAN J., 1999. Leber Congenital Amaurosis. Mol. Gen. and Met. 68: 200–208.

PESHENKO I. V. and DIZHOOR A. M., 2004. Guanylyl Cyclase-Activating Proteins (GCAPs) are Ca^{2+}/Mg^{2+} Sensors. JBC 279: 16903–16906.

PUGH JR. E.N., NIKONOV S. and LAMB T.D., 1999: Molecular Mechanisms of Vertebrate Photoreceptor Light Adaptation.Cur. Op. in Neurobiol. 9: 410-418.

SAN A, SELÇUK N.Y., 1993: Atrial Natriüretik Peptid. Türk Nefroloji Diyaliz ve

Transplantasyon Dergisi 1: 1-6

SCHAFFNER W. and WEISSMAN C., 1973. A Rapid, Sensitive, and Spesific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution. Anal. Biochem. 55: 502-514.

SCHREM A., LANGE C., BEYERMANN M., KOCH K.-W., 1999. Identification of a domain in guanylyl cyclase-activating protein 1 that interacts with a complex of guanylyl cyclase and tubulin in photoreceptors. JBC 274: 6244-6249.

SHARMA R. K., DUDA T., VENKATARAMAN V., KOCH K.-W., 2004. Calcium-Modulated Mammalian Membrane Guanylate Cyclase ROS-GC Transduction Machinery in Sensory Neurons: A Universal Concept. Biochem. Res. 6: 111-144.

SOKAL I., HAESELER F., ARENDT A., ADMAN E.T., HARGRAVE P.A., PALCZEWSKI K., 1999. Identification of a Guanylate Cyclase-Activating Protein-Binding Site within the Catalytic Domain of Retinal Guanylyl Cyclase 1. Biochemistry 38: 1387-1393.

TSIEN R., POZZAN T., 1989. Measurement of Cytosolic Free Ca^{2+} with Quin2. Methods Enzymol. 172: 230-262.

WALDMAN S.A., MURAD F., 1987. Cyclic GMP Synthesis and Function. Pharm. Rev. 39: 163-193.

YAMADA K.M., WESTON J.A., 1974. Isolation of a Major Cell Surface Glycoprotein from Fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 3492-3496.

YAMAZAKI A., YU H., YAMAZAKI M., HONKAWA H., MATSUURA I., USUKURA J. and YAMAZAKI R. K., 2003. A Critical Role for ATP in the Stimulation of Retinal Guanylyl Cyclase by Guanylyl Cyclase-Activating Proteins. JBC 278: 33150-33160.

_____, YAMAZAKI M., YAMAZAKI R. K., and USUKURA J., 2006. Illuminated Rhodopsin Is Required for Strong Activation of Retinal Guanylate Cyclase by Guanylate Cyclase-Activating Proteins. Biochem. 45: 1899-1909.

YAMAZAKI M., USUKURA J., YAMAZAKI R. K., YAMAZAKI A., 2005. ATP is Required for Physiological Activation of Retinal Guanylate Cyclase. . Biochem. and Biophy. Res. Com. 338: 1291-1298.

YAU K.-W., 1994. Phototransduction Mechanism in Retinal Rods and Cones. Invest.Ophthal. & Vis. Sci. 35: 9-32.

YU H., OLSHEVSKAYA E., DUDA T., SENO K., HAYASHI F., SHARMA R. K., DIZHOOR A. M., and YAMAZAKI A., 1999. Activation of Retinal Guanylyl Cyclase-1 by Ca^{2+}-Binding Proteins Involves Its Dimerization. JBC 274: 15547-15555.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi burada tamamladım. 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazandım. 2004 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladım. 2005-2006 akademik yılında, Almanya'nın Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg Üniversitesinde Socrates-Erasmus öğrenci değişim programı kapsamında yüksek lisans tez çalışmamı yürüttüm.