

# $G_{\alpha}$ cDNA'sının pTrcHis Sistemine Alt-Klonlanması

## [Subcloning of $G_{\alpha}$ cDNA into pTrcHis System]

Oya Orun Akalın<sup>(1)</sup>

Beki Kan<sup>(2)</sup>

(1) Yrd.Doç.Dr., Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, 34668, Haydarpaşa, İstanbul, Türkiye

(2) Prof.Dr., Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, 34668, Haydarpaşa, İstanbul, Türkiye

### Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Tıbbiye Cad. No. 49, 34716 İstanbul, Türkiye  
Tel&Faks: 0216-348 05 85  
e-mail: oakalin@marmara.edu.tr

Kayıt tarihi 5 Şubat 2003; kabul tarihi 18 Mart 2003  
[Received 5 February 2003; accepted 18 March 2003]

### ÖZET

Heterotrimerik GTP-bağlayıcı proteinler, membranı yedi kez kateden hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek, hücre içinde farklı fizyolojik yanıtların oluşmasına katkıda bulunurlar. G proteinleri üç altbirimden oluşurlar: alfa, beta ve gama. GTP-bağlama ve G-protein tipleri arası özgünlükten alfa altbirimi sorumludur. Memeli beyin dokusunda ve merkezi sinir sisteminde en yaygın bulunan heterotrimerik G-protein tipi olan  $G_{\alpha}$  proteininin işlevi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Günümüzde proteinlerin işlevsel özelliklerini açığa çıkarmak için X-ışın kristalografisi ve NMR gibi çeşitli yapısal tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu yapısal tekniklerin hepsi yüksek saflıkta ve derişimde proteine ihtiyaç göstermektedir. Bu çalışmada yapı-işlev çalışmalarında kullanılmak üzere yüksek miktarda saf protein eldesini mümkün kılacak bir ekspresyon sisteminde proteinin rekombinant olarak üretilmesi amaçlanmıştır. Aranılan özelliklerde protein elde edebilmek için  $G_{\alpha}$  cDNA dizisi, ticari olarak üretilmiş "Xpress System Protein Purification" (Invitrogen) içerisinde yer alan pTrcHis-2A vektörüne alt-klonlandı. Bu vektör ilgilenilen dizinin C-ucuna eklediği histidin etiketi sayesinde proteinin tek aşamada afinite kromatografisi ile saflaştırılmasını mümkün kılmaktadır. PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra agarozdan saflaştırılan  $G_{\alpha}$  cDNA'sı restriksiyon enzimleri ile kesildi ve aynı restriksiyon kesim enzimleri ile kesilmiş olan vektör ile T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak birbirine yapıştırıldı. Böylelikle oluşturulan yeni vektör özel bir E.coli soyu olan ve  $CaCl_2$  yöntemiyle alıcı duruma getirilmiş TOP10 (Invitrogen) hücrelerine ısı şoku yöntemiyle aktarıldı.  $G_{\alpha}$  cDNA'sının varlığı restriksiyon kesim jelde enzimleri ile görüntülendi ve pTrcHis-2A vektörüne doğru yönelimle yerleştiği ve PCR sonrası çoğaltılan dizide bir mutasyon olmadığı dizi analizi ile doğrulandı. Oluşturulan bu yeni vektörde ekspresyon düzeyinin beklenildiği gibi yüksek olması durumunda saflaştırılma yapılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** G-protein ekspresyonu,  $G_{\alpha}$ -proteini, pTrcHis vektörü

### ABSTRACT

Heterotrimeric G-proteins participate in a diverse set of physiological responses by coupling seven-transmembrane cell surface receptors. G-proteins consist of three subunits: alpha, beta and gamma. The alpha subunit, which contains binding sites for guanine nucleotides and has intrinsic GTPase activity, confers G-protein specificity.

The function of  $G_{\alpha}$ , the most abundant heterotrimeric G-proteins in mammalian brain tissue and central nervous system, has not been elucidated yet. Many structural techniques such as X-ray crystallography and NMR are employed to analyse functional features of proteins. All of these techniques require protein in high concentration and purity. In this study,  $G_{\alpha}$  cDNA was subcloned into the pTrcHis-2A vector to produce high levels of pure recombinant protein for structure-function studies.

$G_{\alpha}$  cDNA sequence was subcloned to the vector pTrcHis-2A, which is a component of the commercial "Xpress System Protein Purification" (Invitrogen) kit. This vector allows purification of over-expressed protein in a one-step affinity chromatography by adding histidine residues to its C-terminal.  $G_{\alpha}$  cDNA was amplified with PCR and isolated from agarose, then cut with restriction enzymes. The vector was also cut with the same restriction enzymes and ligated into the  $G_{\alpha}$  cDNA using T4 DNA ligase. The new construct was transformed into the special E.coli cell line TOP10 produced by Invitrogen. Competent cells were prepared using the  $CaCl_2$  method, and transformation was performed by applying the heat shock method. The presence of  $G_{\alpha}$  cDNA was monitored in agarose gel after restriction enzyme analysis. The direction of the insert and the nucleotide sequence of the amplified gene were verified by sequence analysis.

**Key Words:** G-protein expression,  $G_{\alpha}$ -protein, pTrcHis vector

## GİRİŞ

Heterotrimerik GTP-bağlayıcı proteinler, G-protein kenetli hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek, hücre içinde farklı fizyolojik yanıtların oluşmasına katkıda bulunurlar. G proteinleri üç altbirimden oluşurlar:  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ . GTP-bağlama özelliğine sahip ve ayırıcı özellikteki  $\alpha$  altbirimleri 4 ailede toplanan en az 16 izoform içerirler.  $\beta$  ve  $\gamma$  altbirimleri ise birbirine sıkıca bağlı bir dimer durumunda bulunurlar ve ancak denatüre edici koşullarda ayrılabilirler.  $G_o$ , heterotrimerik G proteinlerinin merkezi sinir sistemi ve beyinde en yaygın bulunan tipidir. Fizyolojik işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, nöronal büyüme konilerinde yoğun olarak saptanmış (1), nöroendokrin tümörler (2) ve Alzheimer hastalığındaki olası rollerine ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmıştır (3).

Şimdiye dek yürütülen çalışmaların bir çoğunda  $G_o$  proteini alfa altbirimi ( $G_{\alpha}$ ) beyin dokusundan saflaştırılmıştır (4). Ancak bu yöntem farklı izoformların birlikte izole olmasına yol açtığı gibi, elde edilen saflık ve miktarın yapı çalışmaları için yeterli düzeyde olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle  $G_{\alpha}$  proteinlerinin rekombinant olarak klonlanmasına çalışılmıştır. Bu çalışmada  $G_{\alpha}$  cDNA dizisinin, ticari olarak üretilmiş "Xpress System Protein Purification" (Invitrogen) sistemine ait pTrcHis-2A vektörüne NdeI-EcoRI kesim bölgelerinden yararlanarak takılması gerçekleştirilmiştir. Bu vektörler kontrolü yüksek trc promotöründen yararlanmakta, proteini C-ucu histidin etiketli olarak ve yüksek miktarda ekspres edebilmektedirler. Histidin etiketi, proteinin afinite kromatografisi ile tek aşamada saflaştırılmasını mümkün kılmaktadır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### Kimyasallar

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda kalıp olarak kullanılan  $G_{\alpha}$  cDNA'sı pGEM-2 vektörü içerisinde Dr. Randall Reed (John Hopkins Univ.) tarafından sağlandı. PCR primerleri Synthaid Biotechnologies Inc. tarafından sentezlendi. Plazmid izolasyon kiti Qiagen ya da Promega'dan, PCR ürün temizleme kiti ve AgarACE enzimi Promega'dan, T4 DNA ligaz Boehringer Mannheim'dan, CIAP ve PCR malzemeleri MBI-Fermentas'tan, diğer kimyasallar ise Merck ya da Sigma Chemical Co.'dan sağlanmıştır.

### $G_{\alpha}$ cDNA'sının PCR ile çoğaltılması

$G_{\alpha}$  cDNA'sı PCR ile, uygun restriksiyon enzim kesimi bölgelerini içeren aşağıdaki primer dizileri kullanılarak çoğaltıldı:

#### Nde I kesim bölgesini içeren N-ucuna özgü primer

GGG GCC **CAT ATG** GGA TGT ACT CTG AGC GCA GAG

#### EcoRI kesim bölgesini içeren C-ucuna özgü primer

CAG GAC AAG **GAA TTC** GTA CAA GCC ACA GCC CCG GAG ATT

Altı çizili diziler enzim kesim bölgelerini işaret etmektedir.

$G_{\alpha}$  cDNA'sı 50  $\mu$ l reaksiyon hacminde, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M

dNTP, 25 pmol oligonükleotit primerler, 1  $\mu$ g kalıp DNA (pGEM-2/ $G_{\alpha}$ ) ve 1 birim Taq DNA polimeraz kullanılarak çoğaltıldı. PCR döngüleri 95°C'ta 1 dak. denatürasyon sonrası 1 birim Taq DNA polimeraz'ın eklenmesiyle başlatıldı ve her döngü 95°C'ta 1 dak. denatürasyon, 63°C'ta 1 dak. tutunma ve 72°C'ta 1 dak. tamamlama aşamalarını içermek üzere 25 döngüde gerçekleştirildi.

### $G_{\alpha}$ cDNA'sının pTrcHis-2A vektörüne takılması

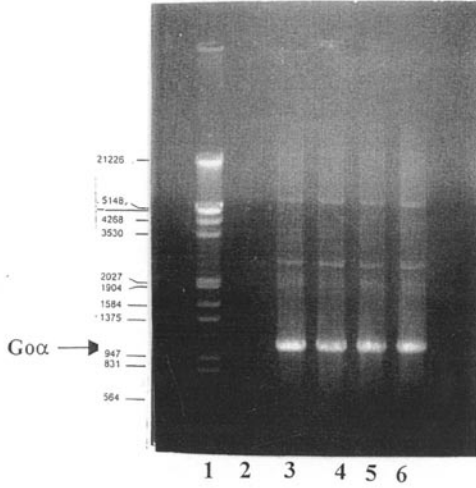
PCR ile çoğaltılan  $G_{\alpha}$  cDNA'sı agaroz jelde gözlenildikten sonra, preparatif amaçlı bir gel hazırlanarak 80  $\mu$ l (5-6  $\mu$ g) örnek jele yüklendi. AgarACE enzimi (Promega) kullanılarak agarozdan saflaştırılan dizi Sac I (MBI Fermentas) ve EcoRI (ACS) restriksiyon kesim enzimleri ile kesilerek "PCR sonrası saflaştırma kiti" (Promega) ile temizlendi. Ekspresyon amacıyla kullanılacak plazmid de (pTrcHis-2A) benzer şekilde kesilip, uçları defosforile edildi (CIAP, MBI-Fermentas) ve saflaştırılarak yapıştırma reaksiyonuna hazırlandı. Plazmid izolasyonları için amaca uygun olarak bazen klasik alkali izolasyon yöntemi (5), daha temiz örneğin gerektiği durumlarda ise Qiagen saflaştırma kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kesilmiş ve saflaştırılmış pTrcHis-2A vektörü (0.125  $\mu$ g/ $\mu$ l), agarozdan izole edilen ve benzer şekilde kesilerek saflaştırılan  $G_{\alpha}$  dizisiyle (0,025  $\mu$ g/ $\mu$ l) T4 DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim) kullanılarak yapıştırıldı. Reaksiyonda 1  $\mu$ l T4 DNA ligaz (5 ünite/ $\mu$ l) kullanıldı ve yapışma reaksiyonu 5 dak. oda sıcaklığında inkübasyon ile gerçekleştirildi.

### Alıcı hücre hazırlanması ve transformasyon

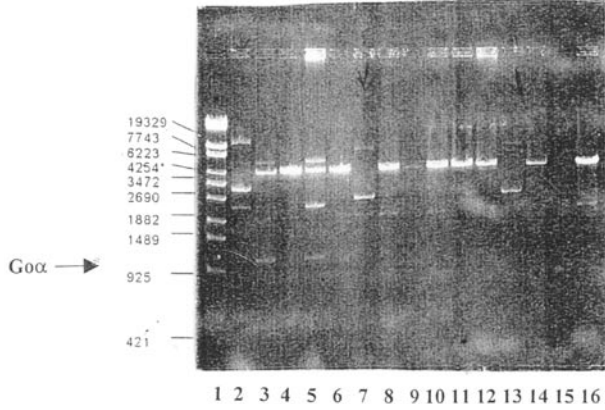
Oluşturulan yeni plazmid CaCl<sub>2</sub> (50 mM) yöntemi ile alıcı hücre durumuna getirilmiş klonlama hücrelerine (TOP 10, Invitrogen) ısı şoku yöntemi ile (42°) aktarıldı (5). Aktarım sonrası hücreler 50  $\mu$ g/ml ampisilin içeren LB besiyeri dökülmüş petri kaplarına yayıldı ve 37°C'ta gece boyu inkübe edildi. Büyüyen kolonilerden önce plazmid izolasyonu, sonra restriksiyon enzim kesimi yapılarak  $G_{\alpha}$  cDNA'sını içeren koloniler saptandı. Bu kolonilerden bir tanesi seçilerek izole edilen plazmid,  $G_{\alpha}$  dizisini doğrulamak için dizi analizine gönderildi. Dizi analizi SeqLab tarafından "automated ABI sequencer" kullanılarak gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Yöntemler bölümünde aktarılan şekilde gerçekleştirilen PCR sonucunda elde edilen dizi parçaları Şekil 1'de görülmektedir. PCR ürünlerinden bir tanesi seçilerek bu kez preparatif amaçlı olarak, yüksek miktarda jele yüklendi. Agaroz jel ekstraksiyonu sonrası örnek miktarı spektrofotometre ölçümü ile toplam 6.55  $\mu$ g olarak belirlendi. Yapıştırma reaksiyonu sonrası oluşturulan yeni pTrcHis-2A/ $G_{\alpha}$  vektörü alıcı TOP 10 hücrelerine aktarıldı. Aktarma sonrası büyüyen kolonilerden rasgele 20 koloni toplanarak,  $G_{\alpha}$  cDNA'sını içeren kolonileri saptamak amacıyla plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmid izolasyonu, alkalik lizis yöntemiyle (5) 3 ml'lik gece boyu kültürlerden saflaştırıldı. Tüm koloniler SacI ve EcoRI ile kesilerek içinde  $G_{\alpha}$  dizisi bulunan koloniler %1 agaroz elektforezi ile belirlendi. Enzim kesimi yapılan kolonilerin agaroz gel elektforezi Şekil 2'de görülmektedir. Analiz edilen 20 koloninin ikisinde  $G_{\alpha}$



**Şekil 1** Farklı PCR koşullarında çoğaltılan  $G_{\alpha}$  cDNA'sının agaroz gel elektroforezi. **1**, DNA standartları (Eco130I, MBI Fermentas); **2**, DNA kalıbı içermeyen kontrol; **3**, 2  $\mu$ l DNA kalıbı (pGEM-2), 1.5 mM  $MgCl_2$ ; **4**, 4  $\mu$ l DNA kalıbı, 1.5 mM  $MgCl_2$ ; **5**, 3  $\mu$ l DNA kalıbı, 750  $\mu$ M  $MgCl_2$ ; **6**, 6  $\mu$ l DNA kalıbı, 1.5 mM  $MgCl_2$ .



**Şekil 2**  $G_{\alpha}$  cDNA'sını içeren kolonilerin saptanması. **1**, DNA standartları, **2**, **7** ve **13** numaralı kuyular restriksiyon enzimi ile kesilmemiş kontrol plazmidleri, (**3-6**) ; (**8-12**) ve (**14-16**) numaralı kuyular restriksiyon enzimiyle kesilmiş kolonileri göstermektedir. **3** ve **5** numaralı kuyularda  $G_{\alpha}$  dizisi saptanmıştır.

dizisinin bulunduğu görüldü. Bu kolonilerden gliserol stok oluşturuldu. Kolonilerden bir tanesi seçilerek, bu soydan izole edilen plazmid DNA dizi analizine yollandı.

DNA dizi analizi sonucu Şekil 3'te görülmektedir. Dizi analizi sonucunda  $G_{\alpha}$  cDNA'sının doğru olarak çoğaltılmış olduğu ve pTrcHis-2A vektörüne bağlanırken protein okuma çerçevesinde kayma olmadığı anlaşıldı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

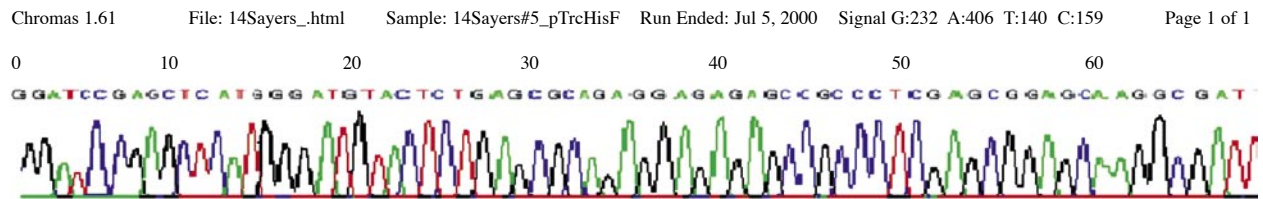
GTP-bağlayıcı G-proteinleri hücre zarı tarafından alınan sinyallerin hücre içi sinyallere dönüştürülmesinde görev alırlar. Bu proteinler hücre zarının sitoplazmik yüzünde yer alırlar ve pek çok fizyolojik sürecin gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar. Sinyal ileti sistemlerinin en az üçte birinin G-proteinleri aracılığı ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir.  $G_o$  proteini ise G-proteinlerinin beyinde ve merkezi sinir sisteminde en yaygın bulunan tipidir.

$G_o$  proteininin yapısı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Günümüzde insan genomunun büyük ölçüde çözümlenmesi ile bu genom tarafından kodlanan protein tiplerinin ve işlevlerinin açıklanabilmesi çalışmaları hızlanmıştır. Bu amaçla yürütülen yapı çalışmalarına giderek ağırlık verilmiştir. Yapı çalışmaları proteinlerin üç boyutlu yapıları hakkında bilgi verir. Bu bilgi hastalıklara müdahale ya da ilaç tasarımı gibi konularda büyük kolaylık sağlamaktadır.

Proteinlerin üç boyutlu yapı analizinin yapılabilmesi için kullanılan NMR, X-ışın kristalografisi, küçük açı saçılması, spektroskopi gibi farklı tekniklerden hangisi seçilirse seçilsin, bu tekniklerin uygulanması yüksek miktarda ve yüksek saflıkta proteine ihtiyaç gösterir. Proteinlerin doğal kaynaklarından yeterli miktarda saflaştırma yapmak çok güç bir işlemdir ve çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Böyle saflaştırılması güç proteinleri prokaryot hücrelerde ekspresyon vektörleri aracılığı ile rekombinant olarak üretmek mümkündür. Bu amaçla proteinler bazı ekspresyon sistemlerine klonlanarak yüksek miktarda sentezlenebilir ve kolaylıkla saflaştırılabilirler.

Bu çalışmada  $G_{\alpha}$  cDNA'sı ticari olarak geliştirilmiş ekspresyon ve saflaştırma sistemlerinden birisi olan pTrcHis-2A vektörüne takılmıştır (Invitrogen). Bu vektör ilgilenilen diziyi histidin rezidüleri ile füzyon halinde eksprese ederek proteinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasını mümkün kılmaktadır. pTrcHis sistemi hem içerdiği güçlü trc promotörü sayesinde etkin bir transkripsiyonu mümkün kılmakta, hem de histidin etiketinin küçük olması nedeniyle, saflaştırma öncesi etiketin kırılıp atılma zorunluluğu ortadan kalktığından verimin düşmesi önlenmektedir. Vektörün diğer önemli özellikleri lac represörünün bağlanmasına izin veren lac operatör bölgesini, erken sonlanmaları önleyecek rrnB antiterminasyon bölgesini, füzyon proteininin kolaylıkla saptanmasını sağlayacak myc epitopunu içermesidir.

Çalışmanın planlanması aşamasında pTrcHis vektör sisteminde histidin rezidüleri klonlama bölgesinin C-ucuna takılı bulunduğundan, dizimizi çoğaltmak için kullandığımız primerlerin sonlanma kodunu içermemesine dikkat edildi.



**Şekil 3** Dizi analizi sonucu saptanan  $G_{\alpha}$  cDNA'sı. Dizinin yalnızca bir bölümü gösterilmiştir. Sonuçlar Chromas v.1.61 programı kullanılarak görüntülenmiştir.

Yapılan deneylerin sonucunda G<sub>oα</sub> cDNA'sının pTrcHis-2A vektörüne takılması başarıyla gerçekleştirilmiş olup, sonuç DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulanmıştır.

#### **Teşekkür**

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu ve Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı tarafından desteklenmiştir. Değerli katkıları için Dr.Zehra SAYERS ve Dr.Aslı TOLUN'a teşekkürü borç biliriz.

#### **Kaynaklar**

1. Chen LT, Gilman AG, Kozasa T. (1999) A candidate target for G protein action in brain. *J. Biol. Chem.* 274, 26931-26938.
2. Kato K, Asano T, Kamiya N, Haimoto H, Hosoda S, Nagasaka A, Ariyoshi Y, Ishiguro Y. (1987) Production of the alpha-subunit of guanine-nucleotide binding protein Go by neuroendocrine tumors. *Cancer Research* 47, 5800-5805.
3. Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein Go. *Nature* 362, 75-79.
4. Nürnberg B, Spicher K, Harhammer R, Boserhof A, Frank R, Hilz H, Schultz G. (1994) Purification of a novel G-protein  $\alpha_o$ -subtype from mammalian brain. *Biochem. J.* 300, 387-394.
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Plasmid Vectors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* (Derleyen: Nolan, C.) s. 183-184, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.