

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Kätlin Karlson

**Mg<sup>2+</sup> JA Mn<sup>2+</sup> MÕJU NUKLEOTIIDIDE  
HETEROTRIMEERSETE G-VALKUDEGA SEOSTUMISELE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Lauri Tõntson

Kaitsmisele lubatud .....

*allkiri, kuupäev*

Tartu 2013

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
1. SISSEJUHATUS.....	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
2.1 G-valguga seotud retseptorid .....	6
2.2 G-valgud.....	6
2.3 G-valkude puhastamine.....	7
2.4 Mangaani efekt 5-HT <sub>1A</sub> retseptorile .....	9
2.5 GTP $\gamma$ S sidumise meetod valkude uurimises .....	10
2.6 Valkude märgistamine fluorestseeruvate molekulidega.....	10
2.7 Biarseensete värvide seostumine.....	11
2.8 FRET valkude uurimisel .....	12
2.9 Fluorestsentsi anisotroopia .....	12
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
3.1 Kasutatud materjalid ja aparatuur .....	14
3.2 Meetodid ja metoodika.....	14
3.2.1 G-valkude alaühikuid sisaldavate membraanpreparaatide puhastamine.....	14
3.2.2 SDS-PAGE ja polüakrüülamiidgeeli hõbedaga värvimine .....	15
3.2.3 G-valkude $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ ja $\alpha_{i3}$ alaühikute valgupreparaatide nukleotiiditundlikkuse mõõtmine.....	15
3.2.4 Mn <sup>2+</sup> mõju F <sub>2</sub> FlAsHile .....	16
3.2.5 GTP $\gamma$ S lahjendusseeriad Mg <sup>2+</sup> või Mg <sup>2+</sup> +Mn <sup>2+</sup> taustal .....	17

4. ANDMETE TÖÖTLEMINE.....	18
5. TULEMUSED JA ARUTELU.....	19
5.1 G-valkude $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ ja $\alpha_{i3}$ alaühikuid sisaldavate membraanpreparaatide puhastamine ..	19
5.2 G-valkude $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ ja $\alpha_{i3}$ alaühikute valgupreparaatide nukleotiiditundlikkuse mõõtmine .....	20
5.3 $Mn^{2+}$ mõju $F_2F1AsHile$ .....	21
5.4 $Mg^{2+}$ ja $Mn^{2+}$ mõju $GTP\gamma Si$ seostumisele .....	22
6. KOKKUVÕTE.....	26
7. SUMMARY .....	27
KASUTATUD KIRJANDUS .....	28

## KASUTATUD LÜHENDID

G- Valk – guaniinnukleotiide siduv Valk

GPCR – G-Valkudega seotud retseptor

GDP – guanosiin-5'-difosfaat

GTP – guanosiin-5'-trifosfaat

GppNHp - guanosiin-5'-( $\beta\gamma$ -imino)trifosfaat

GMP – guanosiin-5'-monofosfaat

DTT – ditiotreitol ((2S,3S)-1,4-bis(sulfanüül)butaan-2,3-diool)

FRET - Försteri resonantsenergia ülekanne

GTP $\gamma$ S – guanosiin-5'-O-[gamma-tio]trifosfaat

5-HT – serotoniin

SHEtOH –  $\beta$ -merkaptotetanool

C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> – polüoksüetüleen-10-laurüül-eeter

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees

TCEP – tris(2-karboksüetüül)fosfiin

APS – ammooniumpersulfaat

Da – dalton

IC<sub>50</sub> – kontsentratsioon, mille juures saavutatakse pool maksimaalsest inhibeerivast toimest

## 1. SISSEJUHATUS

G-valgud ehk guaniinukleotiide siduvad valgud on valkude perekond, mis tegeleb väljaspoolt rakku tulevate keemiliste signaalide ülekandega raku sisemusse. Mitmed haigused nagu diabeet, pimedus, allergiad, depressioon, südame-veresoonkonna haigused ning kindlad vähktõve vormid on seotud G-valkudega seotud retseptorite (GPCR) väärtalitlusega signaaliülekandes.

Mangaan on oluline mikroelement, mis säilitab mitmeid biokeemilisi ja rakusiseseid reaktsioone. Vaatamata oma olulisusele, on mangaan ülemäärasel kontsentratsioonil toksiline. Suurenenud akumulatsioon mõningates aju piirkondades põhjustab neuroloogilise häire, mida kutsutakse manganismiks. Manganismil on sarnased sümptomid Parkinsoni tõvega, mistõttu võib selle avastamine keeruline olla. Varasemalt on täheldatud  $Mn^{2+}$  i suurt ja koespetsiifilist mõju serotoniin 1A retseptoriga seotud signaaliülekandele [11, 12] ning välja pakutud, et see mõju võib olla vahendatud retseptoriga seotud G-valkudega poolt.

Antud töö eesmärgiks oli puhastada ja analüüsida kolme peamist serotoniin 1A retseptoriga seostuvat G-valgu  $\alpha_i$  alaühikut, sidudes nende külge fluorofoorid, mis seostuvad konformatsioonitundlikult  $\alpha$  alaühiku tsüsteiinidega, võimaldades sellega uurida  $Mg^{2+}$  ja  $Mn^{2+}$  mõju nukleotiidi seostumisele, mõõtes fluorestsentsi anisotroopiat.

## 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 2.1 G-valguga seotud retseptorid

G-valkudega seotud retseptorid (GPCR) on suurim inimese genoomis esinev membraansete valkude klass, kuhu kuulub üle 1000 retseptori. GPCR-id vahendavad suurema osa inimese füsioloogilistest vastustest hormoonidele, virgatsainetele, lõhna- ja maitseainetele ning mängivad olulist rolli ravimimärklaudadena. Mõnede hinnangute kohaselt on neile retseptoritele suunatud kuni 50% tänapäeva ravimitest [1, 2]

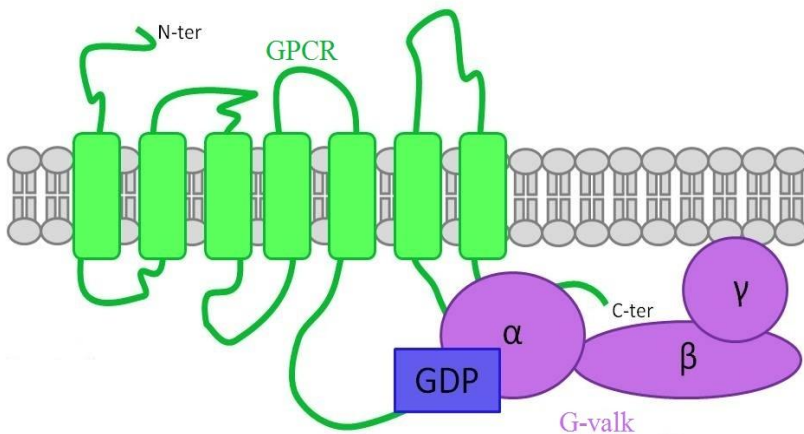
GPCR koosneb seitsmest homoloogilisest helikaalsest hüdrofoobsest transmembraanses domeenist, ekstratsellulaarsest aminotermineest ja intratsellulaarsest karboksüülterminusest. Transmembraansetes segmentides on aminohapete järjestused konserveerunud, ekstratsellulaarses ja intratsellulaarses ruumis on rohkem muutusi. Suurem mitmekesisus aminohappelises järjestuses on N-terminaalses osas [3].

### 2.2 G-valgud

G-valgud on rühm molekule, mida kutsutakse heterotrimeerseteks guaniinnukleotiide siduvateks valkudeks. Kui ligand interakteerub heptahelikaatse retseptoriga raku pinnal, siis ligand kas stabiliseerib retseptorit või kutsub selles esile konformatsioonimuutuse, mis aktiveerib raku membraani sisemisel pinnal heterotrimeerse G-valgu, mis koosneb  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühikust.  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühik moodustavad tihedalt seotud dimeeri, mida on võimalik lõhkuda ainult denatureerimisel. Seega vaadeldakse  $\beta\gamma$ -dimeeri kui ühtset tervikut. [4]

Klassikaliselt jagatakse G-valgud neljaks perekonnaks, põhinedes nende  $\alpha$ -alaühiku sarnasusel:  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{q/11}$  ja  $G\alpha_{12/13}$ . Kui  $G\alpha$ - alaühik on seostunud GTPga saab see reguleerida rakusiseseid efektoreid nagu adenülaadi tsüklaasi, fosfolipaas  $C_\beta$ ,  $K^+$  ja  $Ca^{2+}$  ioonkanaleid ja tsükliilise GMP fosfodiesteraasi. G-valk  $G\alpha_s$  aktiveerib adenülaadi tsüklaasi, mis katalüüsib ATP (adenosiin-5'-trifosfaat) lõhustamist cAMPiks (tsükliiline adenosiin-3',5'-monofosfaat) ja  $PP_i$ ks, aga  $G\alpha_i$  inhibeerib seda.

G-valgu aktivatsiooni võib jagada nelja etappi: 1) algfaasis on G-valk  $\alpha\beta\gamma$ -trimeerina ja  $\alpha$ -alaühiku külge on seotud GDP, 2) ligandi seostumine retseptoriga kutsus esile konformatsioonimuutuse ja GDP vabaneb  $\alpha$ -alaühikult, 3)  $Mg^{2+}$  juuresolekul seostub  $\alpha$ -alaühik GTPga ja  $G\alpha$ -GTP kompleks eraldub  $\beta\gamma$ -dimeerist, mille tulemusena on mõlemad kompleksid võimelised üle kandma signaale rakusisestele efektoritele, 4) signaali kestvuse määrab GTP hüdrolyüsi kiirus  $\alpha$ -alaühikul, mille tulemusena saab GTPst GDP ja  $\alpha$ - ning  $\beta\gamma$ -alaühik reassoitsieeruvad ning kogu tsükkel võib uuesti alata. G-valgu aktivatsiooni reguleerib  $G\alpha$  GTPaas, mis lõhustab GTP GDPks ja  $P_i$ ks. GTP analoogid  $GTP\gamma S$  ja  $GppNHp$  ei hüdrolyüüsu ja säilitavad sellega G-valgu aktiveerituse. [4,5]



**Joonis 1.** G-valgu ja temaga seotud retseptori skemaatiline kujutis. [6]

### 2.3 G-valkude puhastamine

Valkude uurimise seisukohalt on oluline, et uuritav valk oleks võimalikult puhas ning hästi iseloomustatav. Puhastamiseks on välja töötatud mitu erinevat meetodit: väljasoolamine, ioonvahetuskromatograafia, geel-filtratsioon ja afiinsuskromatograafia.

Valkude puhastamine looduslikest kudedest on problemaatiline, sest G-valgu sisaldus on madal ning ühe perekonna eraldamine on keeruline. [7] Rohkete puhastusetappide käigus väheneb saagis ja funktsionaalse valgu hulk.

G-valkude puhastamine algab valku sisaldava koe homogeniseerimisega või – lüüsimisega puhverlahuses (Na-HEPES, Tris-HCl), mis sisaldab redutseerijat ( $\beta$ -merkaptotoetanool, DTT), detergente, mis peale membraanide mahatsentrifuugimist solubiliseerivad membraanvalke, ja proteaasi inhibiitorit, mis takistab valgu proteolüüsi. G-valkude  $\alpha$ -alaühikute puhastamisel on soovitatav lisada substraat GDP, mis stabiliseerib alaühikut katse käigus.

Kui valku sisaldav kude on homogeniseeritud, siis saab teostada tsentrifuugimist. Tsentrifuugimine on vajalik selleks, et eraldada membraanfraktsioon. Samuti aitab see vältida kolonnide kiiret ummistumist ning vabaneda valesti pakitud või posttranslatoorsete modifikatsioonideta valkudest, mis ei seostu membraaniga ja seega ei vahenda signaali.

Enne kromatograafia läbiviimist on vaja G-valgud solubiliseerida, sest kromatograafiat saab läbi viia ainult siis, kui valgud on lahustunud kujul. Valkude aktiivsuse ja funktsionaalsuse säilitamise seisukohalt on detergendi valik väga oluline. Sobiva detergendi juuresolekul saab ka selektiivselt perifeersed membraanvalgud integraalsetest membraanvalkudest eraldada.

Kui kõik eelnevad puhastusetapid on läbitud, võib alustada kromatograafilise meetodiga. Afiinsuskromatograafia võimaldab valke lahutada, põhinedes valkude vastasmõjul spetsiifilise ligandiga, mis on kovalentselt seotud kromatograafilise maatriksiga. Afiinsuskromatograafia on eelistatud rekombinantsete valkude puhastamiseks, sest see meetod on suure selektiivsusega. Rekombinantsete valkude puhastamiseks afiinsuskromatograafia abil, märgitakse huvipakkuv valk spetsiifilise märgisega (heksahistidiin, glutatioon-S-transferaas, Strep), mis seostub afiinsuskandjaga. [8]

Ni-afiinsuskromatograafia kasutab histidiini võimet siduda niklit. Heksahistidiiniga valgu märgistamisel (His-Tag) seotakse valgu külge kuuest histidiini aminohappe molekulist koosnev märgis. Nikkel seotakse agarooosi graanuli külge kelaadi abiga, kasutades nitriiloatsetaati. His-Tag on tänapäeval kõige laialdasemalt kasutatav valgu märkimise meetod afiinsuskromatograafias. [9]

Strep-tag II on lühike peptiid, mis koosneb kaheksast aminohappest (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Strep-tag II seostub selektiivselt streptavidiini derivaadiga Strep-Tactin.



Kuna seostuv peptiid on väga väike, siis säilitab valk oma struktuuri ja funktsiooni. See meetod võimaldab afiinsuskromatograafiat läbi viia füsioloogilistes tingimustes ning Strep-tagiga märgistatud valke saab puhastada ühe etapiga. Pärast lühikest pesuetappi teostatakse õrn puhastatud valgu elueerimine, mis on võimalik lahusega, mis sisaldab destiobiotiini. [10]

Selle töö käigus kasutati tandemafiinsuskromatograafiat. Strep-märgistatud  $\gamma$ -alaühik ekspresseeriti koos  $\alpha$ - ja  $\beta$ - alaühikuga. Kromatograafilise protsessi käigus seostus  $\beta\gamma$ -dimeer kolonniga, võttes kaasa ka  $\alpha$ -alaühiku.

## 2.4 Mangaani efekt 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile

On teada, et keemiline ülekanne närvide vahel on peamiseks suhtlusmeetodiks närvisüsteemis. Ülekande alustamiseks on vaja eelsünaptilises närvilõpmes sünteesida signaalmolekul. Signaalmolekulideks võivad olla paljud madalamolekulaarsed ühendid (ACh, NE, 5-HT), aminohapped (glutamaat, glütsiin) ja peptiidid, hormoonid ning ka valgus. [11]

Serotoniini (5-HT) peetakse üheks evolutsiooniliselt vanimaks neurotransmitteriks. 5-HT vahendab oma mõju peamiselt G-valguga seotud retseptorite kaudu ja vähemalt 13 erinevat GPCRi on teada. 5-HT<sub>1A</sub> retseptorid asuvad sünapseeletes ja järgsetes neuronite osades ja on teada, et nad seostuvad peamiselt ainult G<sub>i</sub> perekonna G-valkudega.

Magneesium ja mangaan on mikroelemendid, mida on vaja organismi normaalseks talituseks. Magneesium (Mg<sup>2+</sup>) on mitmete ensüümide kofaktor ja ta seostub paljude teiste biomolekulidega. G-valkude puhul on Mg<sup>2+</sup> kaasatud valgu õigesti kokkupakkimisse ja on vajalik ka ensümaatiliseks aktiivsuseks. Mg<sup>2+</sup> vabastab *in vitro* eksperimentides raku membraanidega G-valgu GDPst, võimaldades agonistil suure afiinsusega seostuda nukleotiidivaba G-valgu ja retseptori kompleksiga. Mangaan on osutunud isegi potentsiaalsemaks indutseerijaks agonisti suure afiinsusega seostumisel 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile, aga mangaani mõju on koespetsiifiline, mis võib olla seotud erineva G-valkude sisaldusega nendes kudedes. On mitmeid märke, et Mg<sup>2+</sup> ja Mn<sup>2+</sup> konkureerivad samadele sidumiskohtadele retseptor-G-valk kompleksis, aga neil on erinev afiinsus. [12]

## 2.5 GTP $\gamma$ S sidumise meetod valkude uurimises

Klassikaline radioaktiivselt märgitud GTP $\gamma$ S sidumise meetod mõõdab G-valgu aktiveerituse taset pärast agonisti sidumist G-valguga seotud retseptorile. Selle meetodi suureks eeliseks on see, et mõõdetakse funktsionaalset mõju retseptori hõivamisel ühel kõige esimesel retseptor-vahendatud etapil. GTP $\gamma$ S asendab endogeense GTP ja seostub G $\alpha$  alaühikuga pärast retseptori aktiveerimist, et moodustada G $\alpha$ -GTP $\gamma$ S kompleks. Kuna  $\gamma$ -tiofosfaatside on vastupidav hüdroolüüsile, siis ei saa G-valgud taastada heterotrimeerset vormi ning seega GTP $\gamma$ S märgitud G $\alpha$  alaühikud akumulereuvad ja neid saab mõõta radioaktiivse märgisega nukleotiidi hulga järgi. [13]

Hindamaks muutuseid reaajas *in vitro*, on võimalik kasutada fluorestsents tehnoloogiaid, mis on ohutumad. Ühe näitena võib tuua valkude märgistamise fluorestsentsnukleotiididega. See meetod võimaldab mõõtmisi teha homogeenises keskkonnas, aga selle puuduseks *in vivo* katsetes on sageli suur mittespetsiifiline sidumine.

## 2.6 Valkude märgistamine fluorestseeruvate molekulidega

Valkude märgistamine fluorestseeruvate molekulidega võimaldab uurida ja visualiseerida valkude dünaamikat ja valk-valk interaktsioone ning on oluline meetod valkude funktsioonide uurimisel. Florestseeruvate valkude geneetiline modifitseerimine, näiteks roheliselt fluorestseeruvate valkude (GFP) modifikatsioon, on kõige populaarsem valkude märgistamise meetod tänu suurele spetsiifilisusele ja meetodi lihtsusele. Kahjuks selle meetodi fluorestseeruvad molekulid on nii suured, et võivad häirida valgu funktsiooni ja struktuuri, millega nad seotud on. See on viinud uute meetodite väljatöötamiseni, mis põhinevad valkude selektiivsel märgistamisel väiksemate keemiliste ühenditega. Selektiivne keemiline märgistamine saavutatakse üldiselt märgistatava valgu markermolekuli kohtspetsiifilisel sidumisel. [14]

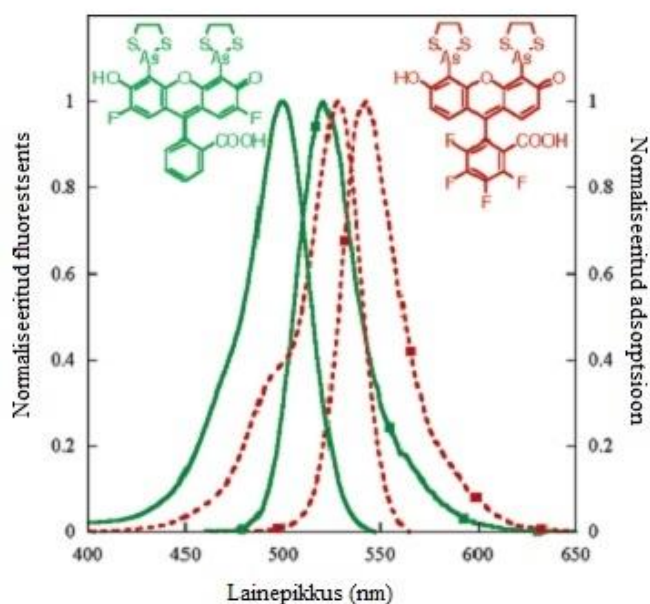
SNAP-tagiga valkude märgistamisel on mitmeid eeliseid võrreldes traditsiooniliste meetoditega. Näiteks saab SNAP-tagiga seotud valke muuta ligandide või teiste siduvate fragmentidega. Snap-tag'i omadused lisavad täiendava tasandi, hindamaks valgu funktsiooni ja dünaamikat rakubioloogias. [15]

Valke on võimalik ka keemiliselt fluorestsentsmürgistada. Selleks sobivad SH ja NH<sub>2</sub> rühmad. Et vältida valgu struktuuri häirimist, peab markermolekul olema väike ja selle polaarsus peab vastama seostumiskoha polaarsusega. Probleemiks on see, et väga reaktiivsed fluorestsentsmürgised võivad mürgistada nii SH kui ka NH<sub>2</sub> rühmasid. Üheks väga reaktiivseks markermolekuliks on akrüülool. [16] Samuti on võimalik valkude struktuuri analüüsida fluorestsentsligandidega, mis interakteeruvad konformatsioonitundlikult valkude hüdrofoobsete aladega. [17]

## 2.7 Biarseensete värvide seostumine

Biarseensed värvid, näiteks 4',5'-bis(1,3,2-diaarsaan-2-üül)-fluorestseiin (FLAsH), seostuvad spetsiifiliselt lühikesele peptiidjärjestusele, mida nimetatakse tetratsüsteiini motiiviks (CCPGCC, CCKACC, CCxxCC), suure afiinsusega. FLAsHi derivaadid, F<sub>2</sub>FLAsH ja F<sub>4</sub>FLAsH, on paremate fluorestseerivate omadustega. FLAsHiga võrreldes on F<sub>2</sub>FLAsHil kõrgem neelduvus, suurem Stokesi nihe, suurem kvantsaagis, parem fotostabiilsus ja väiksem pH sõltuvus. [14, 18, 19]

Biarseensete värvide kasutamisel on ka mõningad puudused. Värvid võivad seostuda mittespetsiifiliselt endogeensete valkude tsüsteiinipaarile või põhjustada mürgistust, mis raskendab nende kasutamist *in vivo* katsetes. [20] Antud töös on mittespetsiifiline seostumine positiivne omadus, võimaldades uurida endogeenseid valke *in vitro*.



**Joonis 2.** F<sub>2</sub>FLAsH (roheline) ja F<sub>4</sub>FLAsH (punane) struktuurid ning absorptsioon- ja emissioonspektrid. [18]

## 2.8 FRET valkude uurimisel

Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET) on võimas meetod uurimaks valkude interaktsioone. Selle meetodi puhul on vajalik, et doonori emissioonspekter kattuks akseptori absorptsioonspektriga. Kui ka akseptormolekul on fluorofoor, siis FRETiga suureneb akseptori fluorestsentsemissioon ning seda tuntakse kui tundlikku emissiooni. Biarseensete värvide ja nähtavalt fluorestseeruvate valkude kombinatsioon FRETi doonor-akseptor paarina võimaldab hinnata ning mõõta molekulaarseid interaktsioone elavates rakkudes. [21]

Kui fluorestsentsvärv on ergastatud olekus, siis kustutaja (*quencher*) puudumisel põhiolekusse naastes, kiirgab ta valgust. Kui kustutaja on lähedal, siis ergastatud fluorofoor saab naasta põhiolekusse, andes oma energia üle kustutajale, mis selle käigus ergastatakse, ilma kiirgamata. FRETi summutamine sõltub fluorofoori energia ülekandmise võimest kustutajale. See saab võimalikuks siis, kui fluorofoori emissioonspekter kattub kustutaja absorptsioonspektriga. Et kustutaja saaks summutada mitme erineva fluorofoori fluorestsentsi, peab sellel olema lai absorptsioonspekter ja suur kustutamise koefitsient. [22] Üheks kustutajaks on guaniinituum, mille kustutav toime tuleneb fotoindutseeritud elektroni ülekandest. [23]

## 2.9 Fluorestsentsi anisotroopia

Anisotroopia mõõtmisi kasutatakse sageli biokeemilistes fluorestsentsi rakendustes. Anisotroopia mõõtmised annavad informatsiooni valkude suuruse ja kuju või erinevate molekulaarsete keskkondade jäikuse kohta. Seda meetodit on kasutatud valk-valk assotsiatsioonide ja membraanide voolavuse hindamiseks. Samuti on meetodid laialdaselt rakendatud fluorestsentsmärgistatud ligandide valkudega seostumise jälgimiseks.

Anisotroopia mõõtmised põhinevad fluorofooride fotoselektiivsel ergastamisel polariseeritud valgusega. Fluorofoorid neelavad eelistatult selliseid footoneid, mille elektrilised vektorid on joondatud paralleelselt fluorofoori siirdemomendiga.

On mitmeid nähtusi, mis võivad alandada mõõdetava anisotroopia väärtusi, võrreldes maksimaalse teoreetilise väärtusega. Kõige tavalisemaks põhjuseks on rotatsiooniline difusioon. Difusioon esineb ergastatud oleku eluajal ja tõrjub fluorofoori dipooli emissiooni. Molekulid saavad mitmeid kordi pöörelda oma ergastatud oleku ajal, mis kestab 1-10 nanosekundit, ja polarisatsiooni orientatsioon on juhuslik. Ergastatud oleku ülekanne fluorofooride vahel vähendab samuti anisotroopiate väärtuseid.

F<sub>2</sub>FLAsH on väga sobilik fluorestsentsi anisotroopia mõõtmisteks, sest ta seostub korraga kahe tsüsteiinijäägi külge, mille tagajärjel väheneb rotatsiooniline difusioon ja anisotroopiate väärtused on suuremad. [23]

### 3. EKSPERIMENTAALNE OSA

#### 3.1 Kasutatud materjalid ja aparatuur

Valkude puhastamisel ja katsetes kasutatud  $\beta$ -SHEtOH oli ostetud Merckist (Darmstadt, Saksamaa). Valkude puhastamisel ja katsetes kasutatud NaCl, MgCl<sub>2</sub>, HEPES ja EDTA olid ostetud Applichem GmbHst (Darmstadt, Saksamaa). Valkude puhastamisel kasutatud Na-kolaat, dodetsüülsahharoos, destiobiotiin ning puhastamisel ja katsetes kasutatud C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> ja TCEP olid ostetud Sigma-Aldrich GmbHst (München, Saksamaa). Valkude märgistamiseks kasutatud F<sub>2</sub>FlAsH oli sünteesitud Ain Uustare poolt.

Rakususpensiooni homogeniseerimiseks ultraheliga kasutati Bandelin Sonopulsi (Bandelin electronic GmbH, Berliin, Saksamaa), tsentrifuugimiseks kasutati tsentrifuugi Sigma Laborzentrifugen 3K30 (Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Saksamaa). Valkude puhastamiseks kasutati Strep-Tactini afiinsuskoloni (IBA GmbH, Göttingen, Saksamaa) ja valke analüüsiti SDS-PAGEga (Bio-Rad Mini Protean 3, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Valgusisalduse määramiseks fraktsioonides kasutati UV-spektrofotomeetrit NanoDrop 1000 (NanoDrop products, Wilmington, DE, USA). Valkude FRET analüüsiks kasutati BMG PHERAstar Plusi (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Saksamaa).

#### 3.2 Meetodid ja meetodika

##### 3.2.1 G-valkude alaühikuid sisaldavate membraanpreparaatide puhastamine

Külmutatud rakupelletile lisati 1 kordne ruumala homogeniseerimispuhvrit, mis sisaldas 20 mM HEPES, pH=7,8, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM  $\beta$ -SHEtOH, 5  $\mu$ M GDP ja proteaasi inhibiitorit (Roche' Complete EDTA-free). Rakud homogeniseeriti ultraheliga 5 korda 10 sekundit jää peal. Homogenaadile lisati solubiliseerimispuhver, mis sisaldas homogeniseerimispuhvrit, 1% Na-kolaati ja 0,2% dodetsüülsahharoosi. Tuubi loksutati (ELMI DOS-20S, ELMI Ltd, Riia, Läti) 1 tund maksimaalsel kiirusel 4 °C juures. Seejärel tsentrifuugiti sade põhja kiirusel 40000 g 30 minuti jooksul 4 °C juures. Saadud supernatant kanti eelnevalt 2 kolonni ruumala

pesupuhvriga, mis sisaldas 20 mM HEPES, pH=7,8, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -SHEtOH, 0,5% C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>, voolutatud Strep-Tactini kolonni, et läbi viia afiinsuskromatograafia. Kolonni pesti 20 kolonni ruumala pesupuhvriga. Elueerimiseks kasutati elueerimispuhvrit, mis sisaldas pesupuhvrit ja 5 mM destiobiotiini. Fraktsioonidest võeti analüüsiks 20  $\mu$ l ning lisati 30  $\mu$ l 2x SDS-PAGE laadimispuhvrit. Fraktsioonide valgusisaldus mõõdeti UV-spektrofotomeetri NanoDrop 1000-ga 280 nm juures ja seejärel fraktsioonid säilitati -80 °C juures.

### 3.2.2 SDS-PAGE ja polüakrüülamiidgeeli hõbedaga värvimine

12% eraldusgeel sisaldas 2 ml Tris-HCl puhvrit (pH=8,8), 3,2 ml 30% akrüülamiidi/0,8% bisakrüülamiidi, 40  $\mu$ l 10% APSi, 10  $\mu$ l TEMEDit ja 2,7 ml Milli-Q vett. Geelil lasti 30-45 minutit polümeriseeruda. Järgnevalt valati eraldusgeeli peale laadimisgeel, mis sisaldas 625  $\mu$ l Tris-HCl puhvrit (pH=6,8), 325  $\mu$ l 30% akrüülamiidi/0,8% bisakrüülamiidi, 12,5  $\mu$ l 10% APSi, 2,5  $\mu$ l TEMEDit ja 1,5 ml Milli-Q vett. Geelil lasti 15-30 minutit polümeriseeruda.

Rakulüsaate, millele oli lisatud 30  $\mu$ l 2x SDS-PAGE laadimispuhvrit, kuumutati 10 minutit 98 °C juures. 5-10  $\mu$ l proovi lahutati SDS-page geelil kasutades kontsentreerivas alas pinget 70V ja lahutavas alas 130V.

Elektroforeesi lõppedes värviti geel vastavalt Pierce<sup>®</sup> Silver Stain Kit protokollile. [24]

### 3.2.3 G-valkude $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ ja $\alpha_{i3}$ alaühikute valgupreparaatide nukleotiiditundlikkuse mõõtmine

Valmistati 14 ml katsepuhvrit (20 mM HEPES, pH=7,8, 10 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -SHEtOH, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>). Märgistamise jaoks valmistati 10 nM F<sub>2</sub>FlAsH lahus katsepuhvris. Saadud F<sub>2</sub>FlAsH lahusest valmistati 9,9  $\mu$ M GTP $\gamma$ S ja 9,9  $\mu$ M GDP lahused. 75 nM (UV-neelduvuse järgi 280 nm juures) valgulahused valmistamistati katsepuhvris.

Mikroitiiterplaadi (Corning 3993, Corning Life Sciences, Lowell, MA, USA) nelja rea seitsmesse viimasesse kaevu lisati 50 µl katsepuhvrit, esimesse kaevu lisati 100 µl valmistatud valgulahust. Esimesest kaevust võeti 50 µl lahust ja tehti seerialahjendused 50+50 µl kuni seitsmenda kevuni. Kahe rea kõigisse kaevudesse lisati 50 µl valmistatud GTPγS lahust ning ülejäänud kahe rea kõigisse kaevudesse lisati 50 µl valmistatud GDP lahust.

Fluorestsentsi anisotroopiat (FA) mõõdeti kolme tunni jooksul 520 nm juures temperatuuril 28 °C, kasutades selleks BMG PHERAstar Plus mikrotiiterplaadilugejat.

### 3.2.4 Mn<sup>2+</sup> mõju F<sub>2</sub>FlAsHile

Valmistati 14 ml katsepuhvrit (20 mM HEPES, pH=7,8, 10 mM NaCl, 2 mM β-SHEtOH, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>). Katsepuhvris valmistati 20 nM (UV-neelduvuse järgi 280 nm juures) βγM valgulahus ja 10 nM F<sub>2</sub>FlAsHi lahus. F<sub>2</sub>FlAsH lahust kasutati 10 µM GDP ja 10 µM GTPγS lahuste valmistamiseks. Mangaani lahjendusseeria tegemiseks valmistati 4 mM Mn<sup>2+</sup> lahus 10 µM GDP ja 10 µM GTPγS lahuses.

Mikroitiiterplaadi kahe rea seitsmesse viimasesse kaevu lisati 50 µl GDP lahust ja kahe rea viimasesse seitsmesse kaevu 50 µl GTPγS lahust. Esimestesse kaevudesse lisati vastavalt 100 µl Mn<sup>2+</sup> lahust GDPs ja GTPγSis. Tehti seerialahjendus 50+50 µl kuni seitsmenda kaevuni. Ühe GDP ja ühe GTPγSi rea kõigisse kaevudesse lisati 50 µl valgulahust ning ülejäänud kaevudesse 50 µl katsepuhvrit.

Fluorestsentsi anisotroopiat mõõdeti kahe tunni jooksul 520 nm juures temperatuuril 28 °C BMG PHERAstar Plusiga.

Et uurida Mn<sup>2+</sup> mõju α-alaühiku juuresolekul, valmistati 14 ml katsepuhvrit (20 mM HEPES, pH=7,8, 10 mM NaCl, 2 mM β-SHEtOH, 1 mM TCEP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>). Katsepuhvris valmistati 20 nM (UV-neelduvuse järgi 280 nm juures) valgulahus ja 10 nM F<sub>2</sub>FlAsHi lahus. F<sub>2</sub>FlAsH lahust kasutati 10 µM GDP ja 10 µM GTPγS lahuste valmistamiseks. Mangaani lahjendusseeria tegemiseks valmistati 4 mM Mn<sup>2+</sup> lahus 10 µM GDP ja 10 µM GTPγS lahuses.

Mikroitiiterplaadi kahe rea seitsmesse viimasesse kaevu lisati 50 µl GDP lahust ja kahe rea viimasesse seitsmesse kaevu 50 µl GTPγS lahust. Esimestesse kaevudesse lisati vastavalt



100  $\mu\text{l}$   $\text{Mn}^{2+}$  lahust GDPs ja  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ . Tehti seerialahjendus 50+50  $\mu\text{l}$  kuni seitsmenda kaevuni. Kõigisse kaevudesse lisati 50  $\mu\text{l}$  valgulahust.

Fluorestsentsi anisotroopiat mõõdeti kolme tunni jooksul 520 nm juures temperatuuril 28 °C BMG PHERAstar Plusiga.

### 3.2.5 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ lahjendusseeriad $\text{Mg}^{2+}$ või $\text{Mg}^{2+}+\text{Mn}^{2+}$ taustal

Valmistati 7 ml katsepuhtrit (20 mM HEPES, pH=7,8, 10 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -SHEtOH, 1 mM TCEP, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1%  $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ ). Märgistamise jaoks valmistati 10 nM  $\text{F}_2\text{FlAsH}$  lahus katsepuhtris.  $\text{F}_2\text{FlAsH}$  lahust kasutati  $\text{F}_2\text{FlAsH} + \text{Mn}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) lahuse valmistamiseks. Alaühikute  $\alpha_{i1}$  ja  $\alpha_{i3}$  20 nM (UV-neelduvuse järgi 280 nm juures) valgulahused ja alaühiku  $\alpha_{i2}$  40 nM (UV-neelduvuse järgi 280 nm juures) valgulahus valmistamistati katsepuhtris.

10kordse lahjenduse korral valmistati 20  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ja 20  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S} + \text{Mn}^{2+}$  lahused. Neist tehti seerialahjendus  $\text{F}_2\text{FlAsH}$  lahuses 25+225  $\mu\text{l}$  kuni seitsmenda mikrotuubini. Valmistatud lahjendused jagati mikrotiiterplaadil nii, et kahe rea kaevudesse lisati valmistatud lahjendused, mis ei sisaldanud mangaani, ja kahe rea kaevudesse lahjendused, mis sisaldasid mangaani. Nelja rea kõigisse kaevudesse lisati 50  $\mu\text{l}$  valgulahust. Lisaks sellele viidi alaühikuga  $\alpha_{i1}$  läbi katse, kus valmistati 6,4  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ja 6,4  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S} + \text{Mn}^{2+}$  lahused. Tehti seerialahjendus  $\text{F}_2\text{FlAsH}$  lahuses 25+225  $\mu\text{l}$  ning edasi toimiti nagu eelpool kirjeldatud.

4kordse lahjenduse korral valmistati 2  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ja 2  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S} + \text{Mn}^{2+}$  lahused. Mikrotiiterplaadi kahe rea seitsmesse viimasesse kaevu lisati 50  $\mu\text{l}$   $\text{F}_2\text{FlAsH}$  lahust ning kahe rea seitsmesse viimasesse kaevu 50  $\mu\text{l}$   $\text{F}_2\text{FlAsH} + \text{Mn}^{2+}$  lahust. Ridade esimestesse kaevudesse lisati vastavalt 66,7  $\mu\text{l}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$  lahust või 66,7  $\mu\text{l}$   $\text{GTP}\gamma\text{S} + \text{Mn}^{2+}$  lahust. Esimesest kaevust võeti 16,7  $\mu\text{l}$  lahust ja tehti seerialahjendused 16,7+50  $\mu\text{l}$  kuni seitsmenda kaevuni. Nelja rea kõigisse kaevudesse lisati 50  $\mu\text{l}$  valgulahust.

Fluorestsentsi anisotroopiat mõõdeti kahe tunni jooksul 520 nm juures temperatuuril 28 °C, kasutades selleks BMG PHERAstar Plusi.

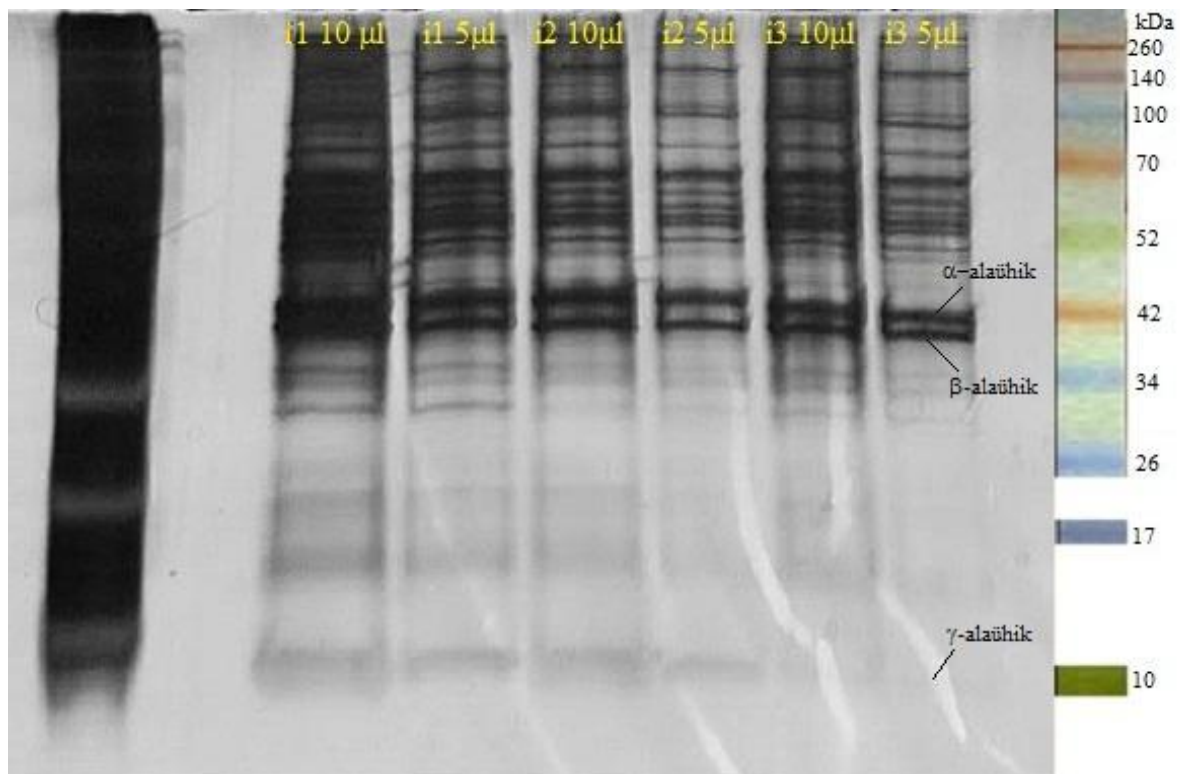
#### **4. ANDMETE TÖÖTLEMINE**

Andmeid töödeldi programmiga GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.) ning analüüsiti mittelineaarsete vähimruutude meetodil. Mikrotiiterplaadi katsed tehti duplikaatides või kvadruplikaatides ja andmed esitati kujul  $\pm$ SEM.

## 5. TULEMUSED JA ARUTELU

### 5.1 G-valkude $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ ja $\alpha_{i3}$ alaühikuid sisaldavate membraanpreparaatide puhastamine

G-valgu  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$  ja  $\alpha_{i3}$  alaühikuid puhastati afiinsuskromatograafia meetodil, kasutades Strep-Tactin afiinsuskoloni. Valke analüüsiti SDS-PAGE abil ja valkude visualiseerimiseks värviti geeli hõbedaga.



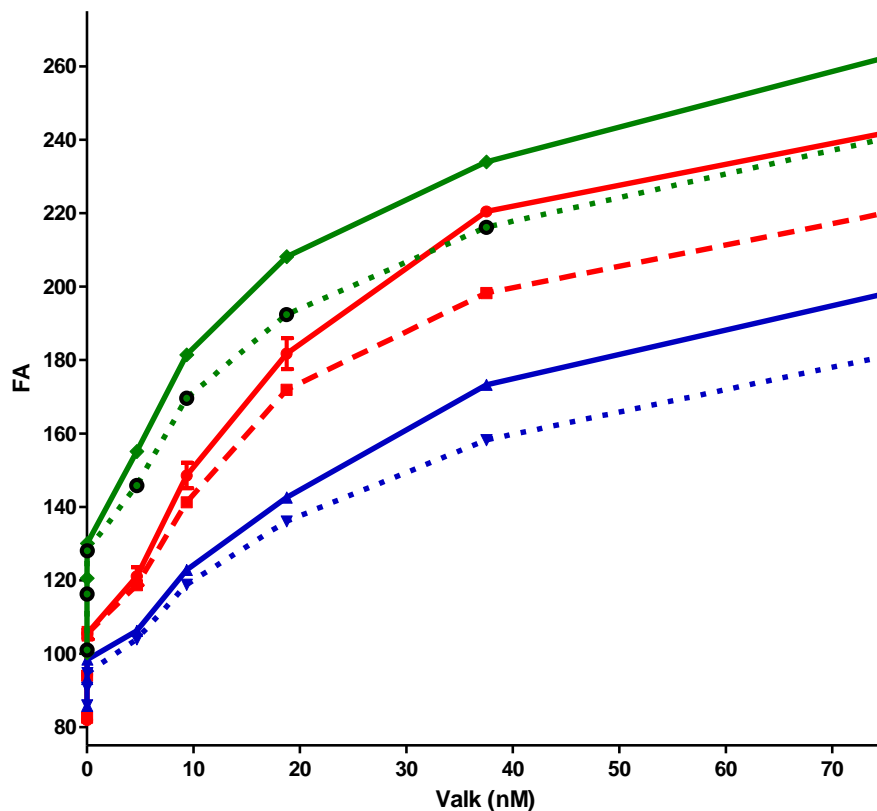
**Joonis 3.** Kolme G $\alpha$ -alaühiku SDS-PAGE värvitud hõbedaga. 42 kDa juures on ekspresseeritud  $\alpha$ -alaühik, ~38 kDa juures on  $\beta$ -alaühik ja ~10 kDa juures on  $\gamma$ -alaühik.

Geeli pilti analüüsiti pilditöötlusprogrammiga ImageJ 1.46. See programm võimaldab geeli raja vöötide intensiivsuste järgi hinnata uuritava valgu sisaldust koguvalgust, teisendades vöötide intensiivsused kromatogrammiks. Tulemused näitasid, et G-valgu sisaldus koguvalgus on 30-35%.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaühikute sisaldused valgupreparaatides olid võrreldavad, mis näitab et preparaadis sisalduv G-valk oli valdavalt heterotrimeerne. Saadud

tulemusi kasutati G-valkude kontsentratsioonide hindamiseks kasutades üldvalgusisalduse määramiseks UV-neelduvust 280 nm juures.

## 5.2 G-valkude $\alpha_{i1}$ , $\alpha_{i2}$ ja $\alpha_{i3}$ alaühikute valgupreparaatide nukleotiiditundlikkuse mõõtmine

Valgupreparaatides olevate G-valkude ja F<sub>2</sub>FlAsHi vahelise nukleotiiditundlike fluorestsentsanisotroopia signaalide võrdlemiseks valmistati 75 nM valgulahused katsepuhvril. Valkude märgistamiseks valmistati 10 nM F<sub>2</sub>FlAsH lahus. Nukleotiidilahused (GTP $\gamma$ S ja GDP) valmistati 9,9  $\mu$ M. Katsed viidi läbi kahe tunni jooksul, mõõtes fluorestsentsi anisotroopiat 520 nm juures temperatuuril 28 °C.



**Joonis 4.** G $\alpha$ -alaühikute i1, i2 ja i3 nukleotiiditundlike anisotroopiate sõltuvus valgulahusekontsentratsioonist. Punaste joontega on tähistatud alaühikuga  $\alpha_{i1}$  tehtud katsed GDPga (pidev joon) ja GTP $\gamma$ Siga (katkendlik joon). Siniste joontega on tähistatud alaühikuga

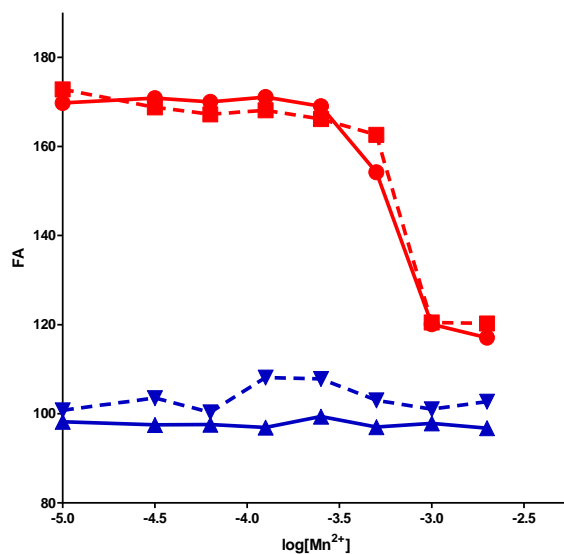
$\alpha_{i2}$  tehtud katsed GDPga (pidev joon) ja GTP $\gamma$ Siga (katkendlik joon). Roheliste joontega on tähistatud alaühikuga  $\alpha_{i3}$  tehtud katsed GDPga (pidev joon) ja GTP $\gamma$ Siga (katkendlik joon).

Vaatamata SDS-PAGE tulemustele ja UV-neelduvuse katse tulemustele, mis viitasid, et valgupreparaadid on ligilähedaselt sama G-valgusisaldusega, näitas fluorestsentsi anisotroopia katse, et  $\alpha_{i2}$  alaühiku sisaldus näib võrreldes  $\alpha_{i1}$ -e ja  $\alpha_{i3}$ -ga olevat oluliselt madalam. Samas erinevus GDP ja GTP $\gamma$ S signaalide vahel oli kõigil alaühikutel võrreldav, mis viitab, et F<sub>2</sub>FlAsH võib  $\alpha_{i2}$  alaühikuga interakteerudes olla vabam pöörlema.

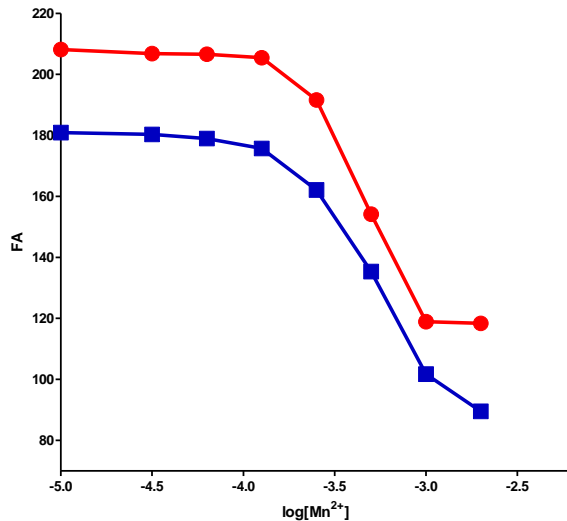
Tulemuste põhjal otsustati, et edasised katsed, kus uuritakse Mg<sup>2+</sup> ja Mn<sup>2+</sup> mõju heterotrimeeride nukleotiidi seostumisele, viiakse läbi valgulahustega, kus  $\alpha_{i1}$  ja  $\alpha_{i3}$  alaühiku lahused katsepuhvril on 20 nM ja  $\alpha_{i2}$  alaühiku lahus katsepuhvril on 40 nM.

### 5.3 Mn<sup>2+</sup> mõju F<sub>2</sub>FlAsHile

Et uurida Mn<sup>2+</sup> mõju F<sub>2</sub>FlAsHile, viidi läbi mangaani lahjendusseria valguvabas keskkonnas,  $\beta\gamma$ M juuresolekul ja  $\alpha$ -alaühiku juuresolekul. Fluorestsentsi anisotroopiat mõõdeti kahe või kolme tunni jooksul 520 nm juures temperatuuril 28 °C BMG PHERAstar Plusiga.



**Joonis 5.** Fluorestsentsi anisotroopia sõltuvus  $Mn^{2+}$  kontsentratsioonist. Punase pideva joonega on tähistatud GDP +  $\beta\gamma M$  katsepunktid ja katkendliku joonega  $GTP\gamma S + \beta\gamma M$  katsepunktid. Sinise pideva joonega on tähistatud GDP katsepunktid valguvabas keskkonnas ja katkendliku joonega  $GTP\gamma S$  katsepunktid valguvabas keskkonnas.



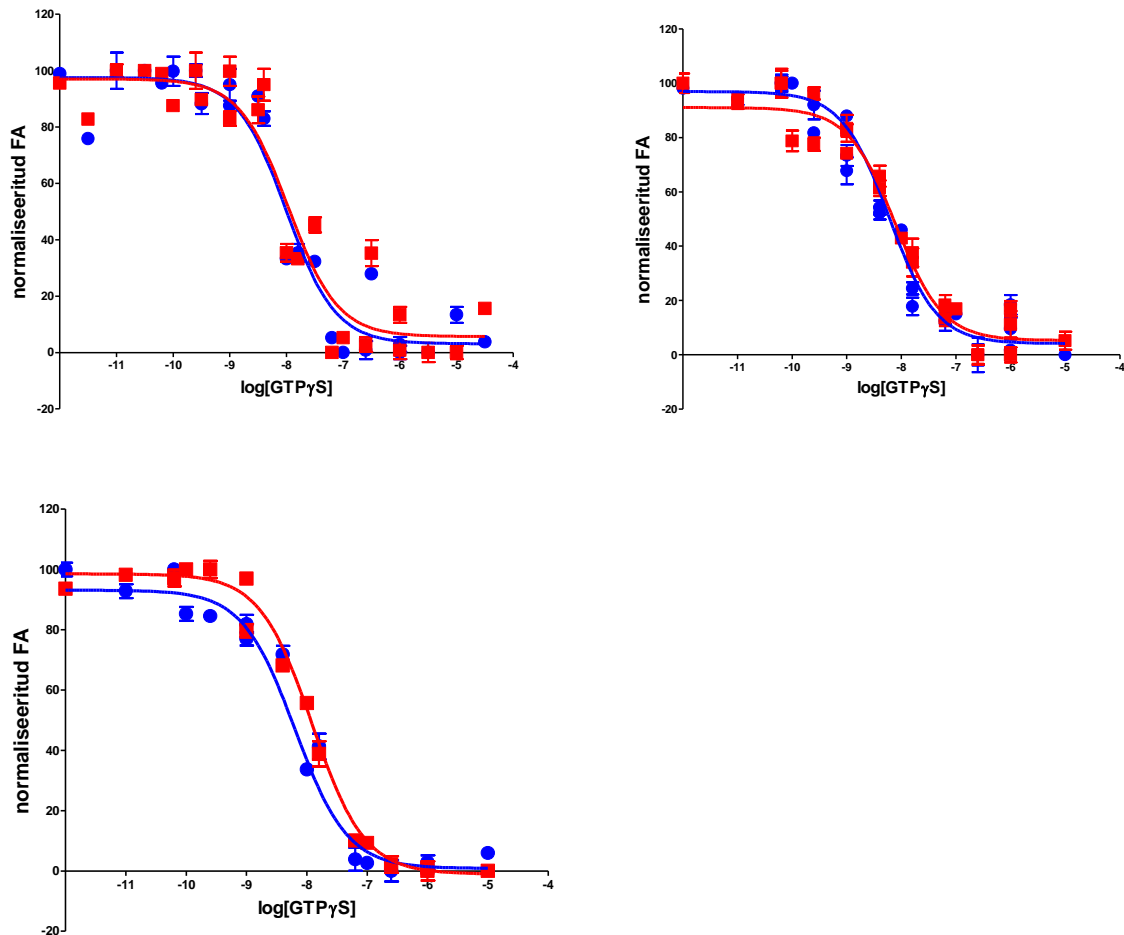
**Joonis 6.** Fluorestsentsi anisotroopia sõltuvus  $Mn^{2+}$  kontsentratsioonist  $\alpha$ - ja  $\beta\gamma$ -alaühiku juuresolekul. Punasega on tähistatud GDPga katsepunktid ja sinisega  $GTP\gamma Si$  katsepunktid.

Katsete tulemused näitasid, et fluorestsentsi anisotroopia suuremal  $Mn^{2+}$  kontsentratsioonil valgu juuresolekul väheneb ja erinevus GDP ja  $GTP\gamma Si$  vahel muutub väiksemaks. Ilma  $\alpha$ -alaühikuta preparaadi katsetest on näha, et signaali vähenemine ei ole seotud  $\alpha$ -alaühikuga.

Edasisteks katseteks  $\alpha$ -alaühikuga valiti  $100 \mu M Mn^{2+}$  kontsentratsioon, kus mittespetsiifilist fluorestsentsi vähenemist veel ei esine ning signaali erinevus GDP ja  $GTP\gamma Si$  vahel ei ole vähenenud. Ühtlasi on leitud, et mangaani mürgistuse puhul on ajus mangaani kontsentratsioon kuni  $100 \mu M$  [11], seega on valitud katioonide kontsentratsioonid ( $1 mM Mg^{2+}$  ja  $100 \mu M Mn^{2+}$ ) lähedased füsioloogilistele kontsentratsioonidele.

#### 5.4 $Mg^{2+}$ ja $Mn^{2+}$ mõju $GTP\gamma Si$ seostumisele

Valitud kationide mõju uurimiseks  $\text{GTP}\gamma\text{Si}$  seostumisele, viidi läbi lahjendusseeriad. Katsed viidi läbi kahe tunni jooksul, mõõtes fluorestsentsi anisotroopiat 520 nm juures temperatuuril 28 °C.



**Joonis 7.**  $G\alpha$ -alaühikute i1, i2 ja i3 normaliseeritud ja anisotroopiate sõltuvus  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  kontsentratsioonist.  $\text{Mg}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$  katsete tulemused on sinised ja  $\text{Mg}^{2+}$  katsete tulemused punased. Andmed normaliseeriti, võttes iga katse  $\text{Mg}^{2+}$  ja  $\text{Mg}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$  ga kõrgeim anisotroopia väärtus 100%ks ning madalaim väärtus 0%ks. Normaliseeritud andmed seejärel sobitati  $\log\text{IC}_{50}$  järgi.

Jooniselt 7. on näha, et kõrgemate  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  kontsentratsioonide juures on anisotroopia väiksem kui madalate kontsentratsioonide juures. Seda võib põhjustada  $\text{GTP}\gamma\text{Si}$  poolt esile kutsutud konformatsioonimuutus, mis suurendab  $G\alpha$ -alaühiku külge seostunud  $\text{F}_2\text{FLAsHi}$  rotatsiooni põhjustades sellega madalama anisotroopia. Teine põhjus võib olla selles, et

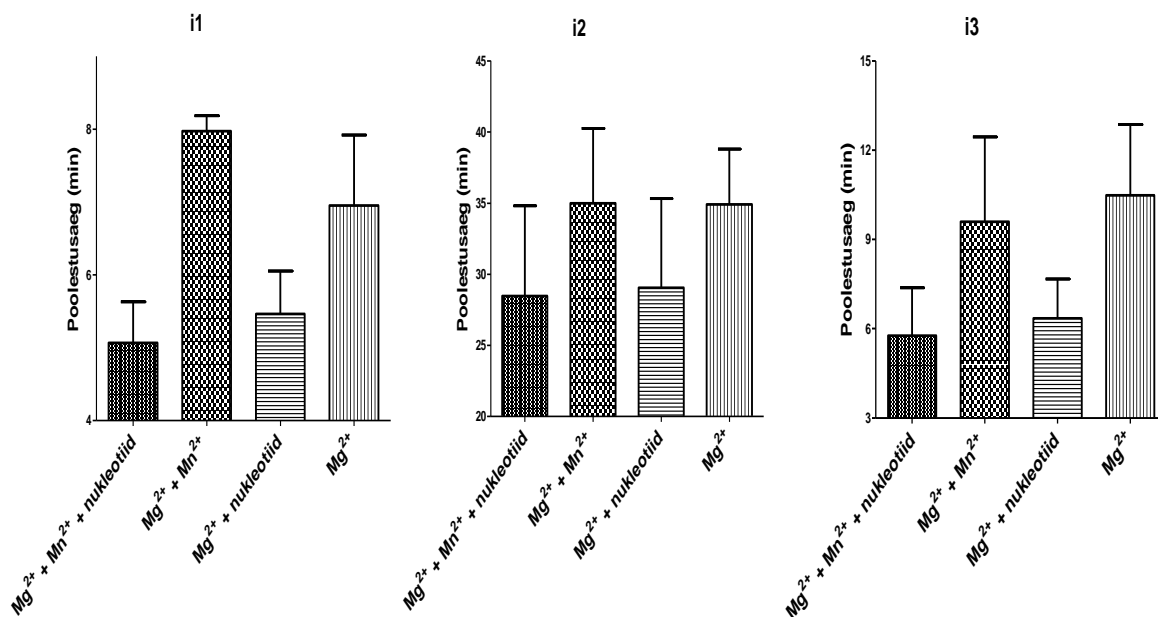
GTP $\gamma$ S seostub F<sub>2</sub>FlAsHile piisavalt lähedale kustutamaks selle fluorestsentsi, mille tulemusena kiirgab F<sub>2</sub>FlAsH lühemat aega ja põhjustades madalamad anisotroopia tulemused. Sergei Kopanchuki poolt läbi viidud FLIM mõõtmised näitavad, et vähemalt viimane variant näib tõele vastavat, kuna GTP $\gamma$ S lisamisel F<sub>2</sub>FlAsH märgitud  $\alpha$ -alaühikule langeb fluorestsentsi eluiga kiiremini, võrreldes nukleotiidi puudumisega ning F<sub>2</sub>FlAsHi 1 ns ja 4.3 ns eluigade (mille proportsioonid sõltuvad G-valgu sisaldusest) kõrvale tekib uus 0.1 ns komponent.

Katsete tulemusest on näha, et 100  $\mu$ M Mn<sup>2+</sup> kontsentratsiooni juures mõõdetud fluorestsentsi anisotroopia tulemused ei erine oluliselt ainult magneesiumit sisaldanud katsete tulemustest.

	logIC <sub>50</sub> (Mg <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> )	logIC <sub>50</sub> (Mg <sup>2+</sup> )
i1	-8,00±0,05	-7,96±0,06
i2	-8,22±0,03	-8,11±0,05
i3	-8,20±0,04	-7,91±0,03

Võimalik, et sellise Mn<sup>2+</sup> kontsentratsiooni juures ei olegi efekti, aga suurema kontsentratsiooni juures mõõta ei saa, kuna siis hakkab Mn<sup>2+</sup> mõjutama F<sub>2</sub>FlAsH-i ja  $\beta\gamma$  kompleksi, mis vähendab signaali akent. Efekti puudumine võrreldes varasemate katsetega, kasutades fluorestsentsmärgistatud nukleotiide, võib olla tingitud ka Mg<sup>2+</sup> suurest ülehulgast Mn<sup>2+</sup> suhtes, sest meie laboris tehtud katsed ainult Mg<sup>2+</sup> (1 mM) või Mn<sup>2+</sup> (1 mM) juuresolekul, näitasid, et katsetes, kus puhver ei sisaldanud piisavalt nukleotiidi G-valgu küllastamiseks, pärssis Mn<sup>2+</sup> GTP $\gamma$ S sidumist, võrreldes Mg<sup>2+</sup>ga. Mn<sup>2+</sup> nihutas G-valgu nukleotiidiga seostumise tasakaalu  $\alpha$ -alaühiku nukleotiidivaba oleku kasuks, samal ajal kui Mg<sup>2+</sup> stabiliseeris GTP $\gamma$ Siga seostunud kompleksi. [25]





**Joonis 8.**  $G\alpha$ -alaühikute  $i_1$ ,  $i_2$  ja  $F_2F_1AsHi$  seostumise assotsiatsioonikineetika valgukompleksi koostisest.

Uuritud kolme  $G\alpha$ -alaühikute  $F_2F_1AsH$  komplekside assotsiatsioonikineetika erinevad üksteisest. Jooniselt 8. on näha, et alaühiku  $\alpha_{i2}$  nukleotiidiga poolestusaja ja nukleotiidita poolestusaja vahe on väiksem kui alaühikute  $\alpha_{i1}$  ja  $\alpha_{i3}$  korral.

Alaühiku  $\alpha_{i2}$   $Mn^{2+}$  ja  $Mg^{2+}$  erinev mõju kompleksi tekkele on kõige väiksem. Võrreldes nukleotiidita komplekside ja ka nukleotiidiga komplekside assotsiatsioonikineetikat, ei ole erinevust  $Mg^{2+} + Mn^{2+}$  ja  $Mg^{2+}$  keskkonna komplekside vahel.

Nagu eespool mainitud, on alaühikute  $\alpha_{i1}$  ja  $\alpha_{i3}$  fluorestsentsanisotroopia signaalid ja nukleotiiditundlikkus suurem. Alaühik  $\alpha_{i3}$  näib seostuvat nukleotiidiga kõige kiiremini.

## 6. KOKKUVÕTE

Mg<sup>2+</sup> ja Mn<sup>2+</sup> mõju uurimiseks nukleotiidi seostumisele, puhastati kolm G $\alpha$ -alaühikut i1, i2 ja i3 Sf9 putukarakkudest, kasutades aafiinsuskromatograafiat. G-valgu alaühikute olemasolu ja sisaldust kontrolliti SDS-PAGE abil, mille geeli värviti hõbedaga.

Katsed näitasid, et Mn<sup>2+</sup> mõjus F<sub>2</sub>FlAsHi ja  $\beta\gamma$ M kompleksile ning see viis nukleotiiditundlikkuse vähenemiseni.  $\alpha$ -alaühikute kontsentratsiooni määramise katsetest oli näha, et  $\alpha_{i2}$  interaktsioon F<sub>2</sub>FlAsHiga ei näi sama tugev kui teiste  $\alpha$ -alaühikutega.

GTP $\gamma$ S lahjendusseeriade katsete normaliseeritud anisotroopiate tulemused ei näidanud Mn<sup>2+</sup> mõju erinevust Mg<sup>2+</sup> mõjust. See võis tuleneda Mg<sup>2+</sup> ülehulgast Mn<sup>2+</sup> suhtes või ei olegi Mn<sup>2+</sup>il sellise kontsentratsiooni juures efekti nukleotiidi seostumisele.

Mg<sup>2+</sup> ja Mn<sup>2+</sup> mõju G $\alpha$ -alaühikute F<sub>2</sub>FlAsH komplekside tekkekiirusele oli väike, erinedes kõige rohkem  $\alpha_{i3}$  alaühiku korral. Nukleotiidiga seostunud kompleksidele oli katioonidel samuti väike efekt, erinedes jälle kõige rohkem alaühiku  $\alpha_{i3}$  korral.

Et selgitada Mn<sup>2+</sup> mõju nukleotiidi seostumisele G-valguga on vaja läbi viia rohkem katseid erinevates tingimustes ja erinevatel Mn<sup>2+</sup> kontsentratsioonidel.

# The effects of $Mg^{2+}$ and $Mn^{2+}$ on nucleotide binding to heterotrimeric G-proteins

Kätlin Karlson

## 7. SUMMARY

To study the influence of  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  on nucleotide binding to G-proteins three  $G\alpha$ -subunits i1, i2 and i3 were purified. The existence of G-protein subunits was verified with SDS-PAGE, the gel was later silver stained.

GTP $\gamma$ S dilutions showed no effect of different influences of  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . This may have resulted from excess of  $Mg^{2+}$  in comparison to  $Mn^{2+}$  in our experiments. It is also possible that  $Mn^{2+}$  does not have an effect at 100  $\mu$ M concentration. The results showed that with higher concentrations of GTP $\gamma$ S the anisotropy has lower values. This may have resulted from GTP $\gamma$ S's quenching effect on F<sub>2</sub>FlAsH. Another possibility is, that GTP $\gamma$ S initiates a conformational change in the  $\alpha$ -subunit and increases the rotation of F<sub>2</sub>FlAsH.

The effect of  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on  $G\alpha$ -subunits-F<sub>2</sub>FlAsH complexes' stability was low, differing the most in experiments with  $\alpha_{i3}$ . Complexes with nucleotides also did not have distinctive effects of  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ .

Further studies have to be carried out to determine the effects of  $Mn^{2+}$  on G-protein nucleotide binding.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Wettschureck, N.; Offermanns, S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol. Rev.* 2005, 85, 1159–1204.
- [2] Akermoun, M.; Koglin, M.; Zvalova-Iooss, D.; Folschweiller, N.; Dowell, S. J.; Gearing, K. L. Characterization of 16 human G protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expres. Purif.* 2005, 44, 65–74
- [3] Kobilka, B. K. G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, 1768, 4, 794–807.
- [4] Di Cesare Mannelli, L.; Pacini, A.; Toscano, A.; Fortini, M.; Berti D., Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Baglioni, P.; Bartolini, A.; Gi/o proteins: Expression for direct activation enquiry. *Protein Expres. Purif.* 2006, 47, 303-310.
- [5] Gille, A.; Seifert, R. Low-affinity interactions of BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S and BODIPY-FL-GppNHp with G<sub>i</sub>- and G<sub>s</sub>-proteins. *N-S. Arch. Pharmacol.* 2003, 368, 3, 210-215.
- [6] Wood, A. Proteins: GPCRs  
<http://www.fastbleep.com/biology-notes/40/116/1088> viimati uuendatud 2013
- [7] ] Kozasa, T.; Gilman, A. G. Purification of Recombinant G proteins from Sf9 cells by using Hexahistidine Tagging of Associated Subunits. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 4, 1734-1741.
- [8] Affinity chromatography, Principles and methods, Amersham Pharmacia biotech  
<http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/PHARMACIA-AffinityManual.pdf> viimati alla laetud 09.04.2013
- [9] Nickel Affinity Chromatography Protocol/Guide  
<http://classes.soe.ucsc.edu/bme220l/Spring11/Reading/ExampleIMACprotocol.pdf> viimati alla laetud 09.04.2013
- [10] Strep-tagged Protein Purification Handbook  
[www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=104797](http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=104797) viimati uuendatud juuli 2011
- [11] Parkel, S. Ligand binding to 5-HT<sub>1A</sub> receptors and its regulation by Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, doktoritöö. Tartu Ülikool, Loodus- ja tehnoloogiainstituut. 2010, 7-94.
- [12] Parkel, S.; Tõntson, L.; Rinken, A. Millimolar Mn<sup>2+</sup> influences agonist binding to 5-HT<sub>1A</sub> receptors by inhibiting guanosine nucleotide binding to receptor-coupled G-proteins. *NeuroToxicology.* 2011, 32, 25–30.

- [13] Harrison, C.; Traynor, J. R. The  $^{35}\text{S}$  GTP $\gamma$ S binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* 2003, 74, 489-508.
- [14] Soh, N. Selective Chemical Labeling of Proteins with Small Fluorescent Molecules Based on Metal-Chelation Methodology. *Sensors.* 2008, 8, 1004-1024.
- [15] Sun, X.; Zhang, A.; Baker, B.; Sun, L.; Howard, A.; Buswell, J.; Maurel, D.; Masharina, A.; Johnsson, K.; Noren, C. J.; Xu, M. Q.; Correa, I. R. Development of SNAP-Tag Fluorogenic Probes for Wash-Free Fluorescence Imaging. *Chembiochem.* 2011, 12, 14, 2217-2226.
- [16] Klymchenko, A. S.; Avilov, S. V.; Demchenko, A. P. Resolution of Cys and Lys labeling of  $\alpha$ -crystallin with site-sensitive fluorescent 3-hydroxyflavone dye. *Anal. Biochem.* 2004, 329, 1, 43-57.
- [17] Wang, J. L.; Edelman, G. M. Fluorescent probes for conformational states of proteins. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 5, 1185-1191.
- [18] Spagnuolo, C. C.; Vermeij, R. J.; Jares-Erijman, E. A. Improved Photostable FRET-Competent Biarsenical-Tetracysteine Probes Based on Fluorinated Fluoresceins. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 12, 12040-12041.
- [19] Nakanishi, J.; Maeda, M.; Umezawa, Y. A new protein conformation indicator based on biarsenical fluorescein with an extended benzoic acid moiety. *Anal. Sci.* 2004, 20, 2, 273-278.
- [20] Adams, S. R.; Campell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 21, 6063-6076.
- 14, 15, 23
- [21] Elder, A. D.; Domin, A. A quantitative protocol for dynamic measurements of protein interactions by Förster resonance energy transfer –sensitized fluorescence emission. *J. R. Soc. Interface.* 2009, 6, 59-81.
- [22] FRET fluorescence quenchers  
<http://www.atdbio.com/content/35/FRET-fluorescence-quenchers> viimati alla laetud  
 23.05.2013
- [23] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. Springer, New York, 2006, 311.
- [24] Pierce<sup>®</sup> Silver Stain Kit

<http://www.piercenet.com/instructions/2161478.pdf> viimati uuendatud september 2011

[25] Tõntson, L.; Babina, A.; Võsumaa, T.; Kopanchuk, S.; Rinke, A. Characterization of heterotrimeric nucleotide-depleted  $G\alpha_i$ -proteins by Bodipy-FL-GTPcS fluorescence anisotropy. Arch. Biochem. Biophys. 2012, 524, 2, 93-98.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kätlin Karlson

(sünnikuupäev: 04.02.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  $Mg^{2+}$  ja  $Mn^{2+}$  mõju nukleotiidide heterotrimeersete G-valkudega seostumisele,

mille juhendaja on Lauri Tõntson,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2013**