

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jure ŠKRABAN

**MESTO VEZAVE GALNONA NA ALFA PODENOTO
HETEROTRIMERNEGA G-PROTEINA VRSTE G_i**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BINDING SITE FOR GALNON ON THE G_i ALPHA SUBUNIT OF
HETEROTRIMERIC G-PROTEIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. V celoti je bilo opravljeno na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Matjaža Zorka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Matjaž Zorko
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora: 22. 01. 2007

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jure Škraban

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 577.1:57.083(043.2)=863
KG G-proteini/ α podenota/PPP/galnon/mastoparan/GTP γ S/celice sf9/bakulovirusi
KK /
AV ŠKRABAN, Jure
SA ZORKO, Matjaž (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana
LI 2007
IN MESTO VEZAVE GALNONA NA ALFA PODENOTO
HETEROTRIMERNEGA G-PROTEINA VRSTE G_i
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP IX, 61 str., 21 sl., 128 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Večina peptidov ne more preiti membrane in vstopiti v celico. Znanih pa je nekaj peptidov, ki v celico lahko prodrejo. Nekateri od teh peptidov so potencialno uporabni kot prenašalci učinkovin v celice in tkiva in so poznani pod kratico CPP (Cell-penetrating peptides). Posebna vrsta CPP pa so tisti, ki so tudi sami fiziološko učinkoviti. Pred kratkim so razvili spojine, ki so po delovanju podobne CPP a se od njih razlikujejo po tem, da niso peptidi. Ena izmed njih je spojina galnon. Galnon je nepeptidni agonist galaninskih receptorjev. V razmerah in vivo vpliva na številne fiziološke procese. Deluje preko galaninskih in tudi preko nekaterih drugih receptorjev, poleg tega pa še z neposredno vezavo na G-proteine in ima vrsto fizioloških učinkov. Med drugim aktivira G_i ter inhibira G_s vrsto heterotrimerne G-proteinov. S pomočjo molekulskega modeliranja so pokazali na dve možni mesti vezave na površini podenote alfa, tako pri vrsti G_i kakor pri vrsti G_s .
V nalogi smo želeli natančneje opredeliti mesta vezave galnona na podenoto α heterotrimerne G-proteinov tipa G_i . Delo smo zastavili na membranah celic sf9, v katerih smo skušali presežno izraziti heterotrimerne G-proteine $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$. Ker nam to ni uspelo, smo se preusmerili na membrane iz korteksa podganjih možganov. Izolirane membrane smo najprej s pomočjo mastoparana, katerega delovanje je dobro poznano, funkcionalno okarakterizirati. Nato smo ponovili analizo aktivacije heterotrimerne G_{i1} -proteinov v prisotnosti različnih koncentracij galnona in dobili pričakovane rezultate. Oblika krivulje namiguje na možnost kooperativne vezave, saj se ta v koncentracijskem območju galnona med $5 \times 10^{-5} M$ in $10^{-4} M$ dvigne zelo strmo (Hillov koeficient je bil preko 5). To kaže na vezavo galnona na več mest na podenoti α_{i1} . Nato smo naredili krivulje izpodrivanja $[^{35}S]GTP\gamma S$ z $[^{32}S]GTP\gamma S$ brez prisotnosti ligandov, ob prisotnosti mastoparana in nato še ob prisotnosti dveh različnih koncentracij galnona. S primerjanjem oblike krivulj izpodrivanja in kinetičnim modeliranjem smo pokazali, da se galnon verjetno neposredno vpleta v vezavo GTP γ S, pri tem pa se ne sme vezati na povsem isto mesto kot GTP γ S. Zato sklepamo, da se mesti za vezavo galnona in GTP γ S le delno prekrivata, kar povzroči, da galnon ovira pristop in reverzibilno vezavo GTP γ S na G_{ai} , pospešuje pa ireverzibilno stopnjo te vezave. Dejstvo, da se krivulje izpodrivanja vročega GTP γ S s hladnim v prisotnosti mastoparana, za katerega se ve, da se veže na G_{ai} alosterično, bistveno razlikujejo od tistih za galnon, podpira naše rezultate.
S pomočjo molekulskega modeliranja so identificirali še eno potencialno mesto vezave galnona na podenoto α_{i1} in α_s in to na površini zunaj aktivnega centra v katerega se veže GTP. Da bi ugotovili če se galnon veže na to mesto, smo skonstruirali peptid 1 za podenoto α_{i1} in peptid 2 za podenoto α_s . V obeh primerih smo predvideli, da naj bi se lizinski ostanek v peptidih vezal na isto mesto kot lizinski ostanek v galnonu, zato naj bi peptida z galnomom kompetirala. Rezultati pa so pokazali, da peptida ne aktivirata G-proteinov in tudi ne vplivata na aktivacijo G_{ai} z galnomom. To sicer ustreza domnevi, da se galnon verjetno ne veže na predvideni periferni mesti na podenatah G_{ai} in G_{os} , vendar je ta rezultat zelo nezanesljiv.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.1:57.083(043.2)=863
CX G-proteins/ α subunit/PPP/galnon/mastoparan/GTP γ S/sf9 cells/baculoviruses
CC /
AU ŠKRABAN, Jure
AA ZORKO, Matjaž (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2007
TI THE BINDING SITE OF GALNON ON THE ALPHA SUBUNIT OF HETEROTRIMERIC G-PROTEIN OF G_i TYPE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 61 p., 21 fig., 128 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Most peptides are unable to cross the cell membrane and thus enter the cell. However, some peptides are able to enter the cells and deliver active substances into cells and tissues. These peptides are known as Cell-penetrating peptides (CPPs). Special type of CPPs are those, which are also biologically active. Recently new nonpeptidic CPPs were developed. One of these compounds is galnon, a nonpeptidic agonist of galanin receptors. It influences numerous physiological processes in vivo by acting via galanin and other receptors, but it can also penetrate cells and bind directly to G-proteins. Studies have shown that it activates G_i and inhibits G_s proteins. Molecular modeling highlighted two potential binding sites of galnon on α subunits of both G_i and G_s.
Our goal was to better define the binding sites of galnon on G_i. We started our work by using membranes from sf9 cells in which we tried to overexpress heterotrimeric G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ proteins. After failing with the overexpression, membranes from rat cerebral cortex were used as an alternative source of G-proteins. First we functionally characterized membranes with mastoparan utilizing its well known effect on G-proteins. Then the activation of G-proteins by galnon was analyzed and the results in accordance with the previous studies were obtained. A steep activation curve with Hill coefficient of over 5 was obtained in the concentration range of galnon between 5×10^{-5} M and 1×10^{-4} M. This implies the possibility of the cooperative binding of galnon, and suggests the existence of more than one binding site of galnon on α_i subunit. Finally, we analyzed the displacement of the radioactive [³⁵S]GTP γ S with the nonradioactive [³²S]GTP γ S in the absence of ligands, in the presence of mastoparan, and in the presence of galnon in two different concentrations, respectively. By comparing the obtained displacement curves and by using of kinetic modeling we concluded that galnon probably does interfere with the binding of GTP γ S, but it does not bind to the exactly the same binding site as GTP γ S. It seems that the binding sites of galnon and GTP γ S only partly overlap, resulting in decreased affinity of G_{ai} for the reversible binding of GTP γ S and increased rate of conversion of the reversible complex G_{ai}.GTP γ S into the irreversible one. These conclusions are corroborated by the fact that the displacement of radioactive GTP γ S by the nonradioactive GTP γ S in the presence of an allosteric ligand mastoparan proceeds by substantially different curves from those obtained with galnon.
In the previous studies molecular modeling was used to identify one more potential binding site for galnon on α_{i1} and α_s subunits. This site is on the surface of α subunits, outside of the active centre, which binds GTP. We have constructed two peptides (peptide 1 and peptide 2) to find out, whether galnon binds to the proposed sites. In order to achieve competition between galnon and peptides the peptides were constructed in such a way, that the lysine residues of the peptides and the lysine residue of galnon were expected to bind to the same site on G_{ai}. The results show, that the peptides neither activate G-proteins, nor affect the activation of G-proteins by galnon. This is in accordance with the possibility that galnon do not bind to the proposed peripheral sites, however, we were not able to provide any stronger support for this hypothesis.

KAZALO VSEBINE

		str.
	Ključna dokumentacijska informacija (KWI)	III
	Key word documentation (KWD)	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo slik	VII
	Okrajšave in simboli	VIII
	Slovarček	IX
1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	NAMEN RAZISKAVE IN ZNANSTVENA HIPOTEZA.....	3
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	G-PROTEINI	4
2.1.1	Monomerni G-proteini	4
2.1.2	Heterotrimerne G-proteini	5
2.1.2.1	Struktura podenote α	7
2.1.2.2	Dimer $\beta\gamma$	10
2.1.2.3	Signalni cikel G-proteinov	12
2.2	RECEPTORJI S SEDMIMI TRANSMEMBRANSKIMI SEGMENTI (7-TMSR)	14
2.2.1	Struktura in funkcija 7-TMSR	15
2.3	SINTETIČNI PEPTIDI.....	16
2.3.1	Peptidi, ki lahko vstopajo v celice (Cell-penetrating peptides, CPP)	17
2.3.2	Galnon	19
2.3.2.1	Načrtovanje in sinteza galnona	19
2.3.2.2	Biološki učinki galnona	20
2.3.2.3	Vezava galnona na G-proteine	22
2.3.2.4	Konstruiranje peptida 1 in 2.....	23
2.3.3	Mastoparan	23
3	METODE IN MATERIALI	26
3.1	CELIČNE KULTURE	25
3.2	BAKULOVIRUSNI KUNSTRUKTI PODENOTE α_{i1} IN DIMERA $\beta_{1}\gamma_{2}$ G_{i1} -PROTEINOV	26
3.3	RAZMNOŽEVANJE REKOMBINANTNIH VIRUSOV V CELICAH SF9	26
3.4	IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH G_{i1} -PROTEINOV	27

3.5	IZOLACIJA MEMBRAN CELIC SF9	27
3.6	IZOLACIJA KORTEKSA IZ PODGANJIH MOŽGANOV	27
3.7	IZOLACIJA MEMBRAN IZ KORTEKSA PODGANJIH MOŽGANOV ...	28
3.8	DOLOČANJE ZAČETNE HITROSTI VEZAVE [³⁵ S]GTP γ S NA G- PROTEINE V MEMBRANAH CELIC SF9 IN MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV	28
3.9	ANALIZA IZRAŽANJA REKOMBINANTNIH α i1 IN β 1 γ 2 Z ELEKTROFOREZO PAGE-SDS, PRENOS NA NITROCELULOZNO MEMBRANO IN DETEKCIJA S PROTITELESI.....	29
3.10	SINTEZA GALNONA IN PEPTIDOV	30
3.11	KINETIČNE ŠTUDIJE	31
3.12	GRAFIČNI PRIKAZ IN OBDELAVA PODATKOV	32
3.13	MATERIALI.....	32
4	REZULTATI	34
4.1	ANALIZA IZRAŽANJA Gi-PROTEINOV S POMOČJO SDS-PAGE ELEKTROFOREZE TER IMUNODETEKCIJE NA NITROCELULOZNI MEMBRANI.....	34
4.2	ČASOVNI POTEK VEZAVE [35S]GTP γ S NA REKOMBINANTNE HETEROTRIMERNE Gi ₁ -PROTEINE V MEMBRANAH CELIC SF9.....	36
4.3	ANALIZA AKTIVNOSTI REKOMBINANTNIH HETEROTRIMERNIH Gi1-PROTEINOV V MEMBRANAH CELIC SF9 OB PRISOTNOSTI GALNONA	36
4.4	ANALIZA AKTIVNOSTI HETEROTRIMERNIH G-PROTEINOV V MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV OB PRISOTNOSTI GALNONA TER MASTOPARANA.....	37
4.5	ANALIZA AKTIVNOSTI HETEROTRIMERNIH G-PROTEINOV V MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE GALNONA	38
4.6	ANALIZA MESTA VEZAVE GALNONA NA PODENOTO ALFA HETEROTRIMERNIH G-PROTEINOV V MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV	39
4.6.1	Izpodrivanje [35S]GTPγS (radioaktiven GTPγS) z GTPγS ("hladen" GTPγS) na membranah iz korteksov podganjih možganov v prisotnosti galnona in mastoparana.....	39
4.6.2	Analiza aktivnosti heterotrimernih G-proteinov v membranah iz korteksov podganjih možganov ob prisotnosti peptida 1 ali 2.....	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
6	VIRI	51

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula galnona	2
Slika 2: Predlagani mesti vezave galnona na podenoto α pri Gi-proteinih in Gs-proteinih.....	2
Slika 3: Shematična predstavitev heterotrimerne G-proteina	6
Slika 4: Prikaz kristalne strukture heterotrimerne G _i -proteina G $\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ iz podgane Rattus norvegicus z vezanim GDP	7
Slika 5: Sorodnost različnih α podenot glede na aminokislinsko zaporedje	8
Slika 6: Shematični prikaz strukture podenote G β	10
Slika 7: Struktura kompleksa med fosducinom in dimerom $\beta\gamma$ heterotrimerne G _t -proteina (transducina).....	11
Slika 8: Signalni cikel heterotrimernih G-proteinov.....	13
Slika 9: 3D struktura galnona narejena z molekulskim simulacijskim programom CHARM..	20
Slika 10: Sliki A in B prikazujeta konformacijo mastoparana-X, ko je vezan na podenoto α_{i1}	25
Slika 11: Analiza izražanja α_{i1} in β_1 podenote rekombinantnih heterotrimernih G _{i1} -proteinov v membranah celic sf9 ter podenot heterotrimernih G _{i1} -proteinov v membranah iz korteksa podganjih možganov s SDS-PAGE elektroforezo	34
Slika 12: Analiza izražanja α_{i1} in β_1 podenote rekombinantnih heterotrimernih G _{i1} -proteinov v membranah celic sf9 ter podenot heterotrimernih G _{i1} -proteinov v membranah iz korteksa podganjih možganov z metodo prenosa proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano in detekcijo s specifičnimi protitelesi	35
Slika 13: Časovni potek vezave [³⁵ S]GTP γ S na rekombinantne heterotrimerne G _{i1} -proteine v membranah celic sf9	36
Slika 14: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na G-proteine v membranah celi sf9 v prisotnosti 10 ⁻⁴ M koncentracije galnona, izražene v odstotkih bazalne aktivnosti (brez galnona).....	37
Slika 15: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na heterotrimerne G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v prisotnosti 10 ⁻⁴ M koncentracije galnona in mastoparana, izražene v odstotkih bazalne vrednosti	38
Slika 16: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na heterotrimerne G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije galnona, izražene v odstotkih bazalne aktivnosti	39
Slika 17: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije GTP γ S in ob prisotnosti različnih koncentracij galnona in mastoparana.....	40
Slika 18: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije GTP γ S in ob prisotnosti različnih koncentracij galnona in mastoparana.....	40
Slika 19: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije peptida 1	42
Slika 20: Začetne hitrosti vezave [³⁵ S]GTP γ S na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije peptida 2.....	42
Slika 21: Relativna začetna hitrost vezave [³⁵ S]GTP γ S na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije hladnega GTP γ S.....	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AC	adenilat-ciklaza
ADP	adenozin-5'-difosfat
cAMP	ciklični adenzin-3', 5'-monofosfat
cGMP	ciklični gvanozin-3', 5'-monofosfat
CPP	peptid, ki lahko vstopa v calico (cell-penetrating peptide)
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
HEPES	(2-[4-(2 hidroksietil) -1-piperazinil]) etilensulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
g	težni pospešek
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GTP	gvanozin-5'-trifosfat
GTP γ S	gvanozin-5'-O-3-tiotrifosfat
[³⁵ S]GTP γ S	radioaktivni gvanozin-5'-O-3-tiotrifosfat
PLC	fosfolipaza C
7-TMSR	receptorji s sedmimi transmembranskimi segmenti
TE	tris-EDTA

SLOVARČEK

CPP: CPP so 10-30 aminokislin dolgi peptidi, ki lahko prehajajo skozi celično membrano s pomočjo različnih mehanizmov in omogočajo prehajanje večjih in polarnih molekul, ki so vezane na njih, čez plazmalemo v celico.

Galnon: Galnon je nepeptidni agonist galaninskih receptorjev. Je majhna molekula z molekulsko maso 677 kDa. Veže se na galaninske receptorje in tam deluje kot agonist, saj jih aktivira in preko G-proteinov inhibira adenilat-ciklazo, deluje pa tudi z neposredno vezavo na G-proteine. Nepeptidni značaj daje spojini nekatere prednosti pred običajnimi peptidnimi ligandi. Te so večja stabilnost in možnost prehajanja krvne možganske bariere. Zato je galnon potencialno zanimiv kot farmacevtska učinkovina.

G-proteini: Med G-proteine spada več družin različnih celičnih proteinov, ki opravljajo zelo raznolike naloge. Njihovo ime izhaja iz dejstva, da vežejo gvaninska nukleotida gvanozin trifosfat (GTP) in gvanozin difosfat (GDP) in imajo GTP-azno aktivnost. G-proteini igrajo osrednjo vlogo pri prenosu signala, pomembno vlogo pa imajo še pri številnih drugih celičnih procesih kot so transport veziklov, sestavljanje citoskeleta, celična rast in sinteza proteinov. G-proteine lahko razdelimo v dve veliki skupini: monomerne (majhne) G-proteine in heterotrimerne G-proteine.

Mastoparan: Mastoparani so skupina sorodnih peptidov izoliranih iz osjega strupa. Močno stimulirajo sekrecijo v različnih sesalčjih celicah.. Delujejo neposredno na G-proteine tako, da oponašajo aktivirane receptorje.

7-TMSR: Receptorji, ki so sklopljeni z G-proteini spadajo v veliko družino receptorjev s sedmimi transmembranskimi segmenti. Njihova skupna značilnost je, da imajo sedem hidrofobnih α vijačnic dolgih 20-25 aminokislin, ki prehajajo skozi fosfolipidni dvosloj. Te transmembranske regije bi naj tvorile žep za vezavo liganda. Receptor je vstavljen v membrano tako, da je N-terminalni del zunaj celice, C-terminalni del pa znotraj nje.

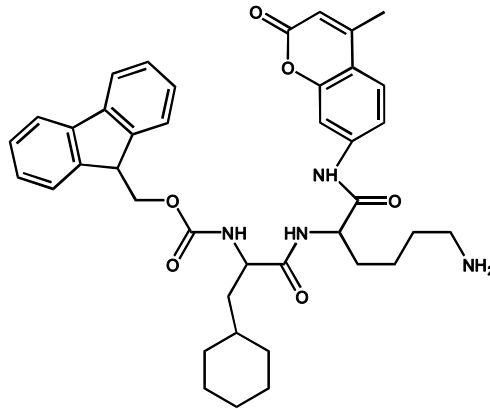
1 UVOD

Večina peptidov ne more preiti membrane in vstopiti v celico. Znanih pa je nekaj peptidov, ki v celico lahko prodrejo. Nekateri od teh so potencialno uporabni kot prenašalci učinkovin v celice in tkiva in so poznani pod kratico CPP (Cell-penetrating peptides). Podrobneje so opisani v dveh knjigah 'Cell-penetrating peptides' (Langel, Ü., editor, CRC Press, Boca Raton, New York, London, Washington 2002 in 2006). Posebna vrsta CPP pa so tisti, ki so lahko fiziološko učinkoviti. Ti CPP so običajno fragmenti receptorskih znotrajceličnih zank ali podobnih proteinov, ki so udeleženi v prenosu signalov in lahko sprožijo celični odziv, večinoma preko aktivacije G-proteinov znotraj celice. Na osnovi take filozofije je bil razvit nepeptidni agonist galaninskih receptorjev, imenovan galnon (Saar in sod., 2002), ki deluje z vezavo na te in na nekatere druge receptorje, prodre pa tudi v celico in se tam tudi neposredno veže na G-proteine in nekatere aktivira, nekatere pa inhibira (Florén in sod., 2005). Pri tem pa mesto vezave galnona na posamezne vrste G-proteinov ni poznano, vendar bi bil ta podatek zelo pomemben, saj je galnon potencialna učinkovina, ki vpliva na različne procese v človeškem telesu.

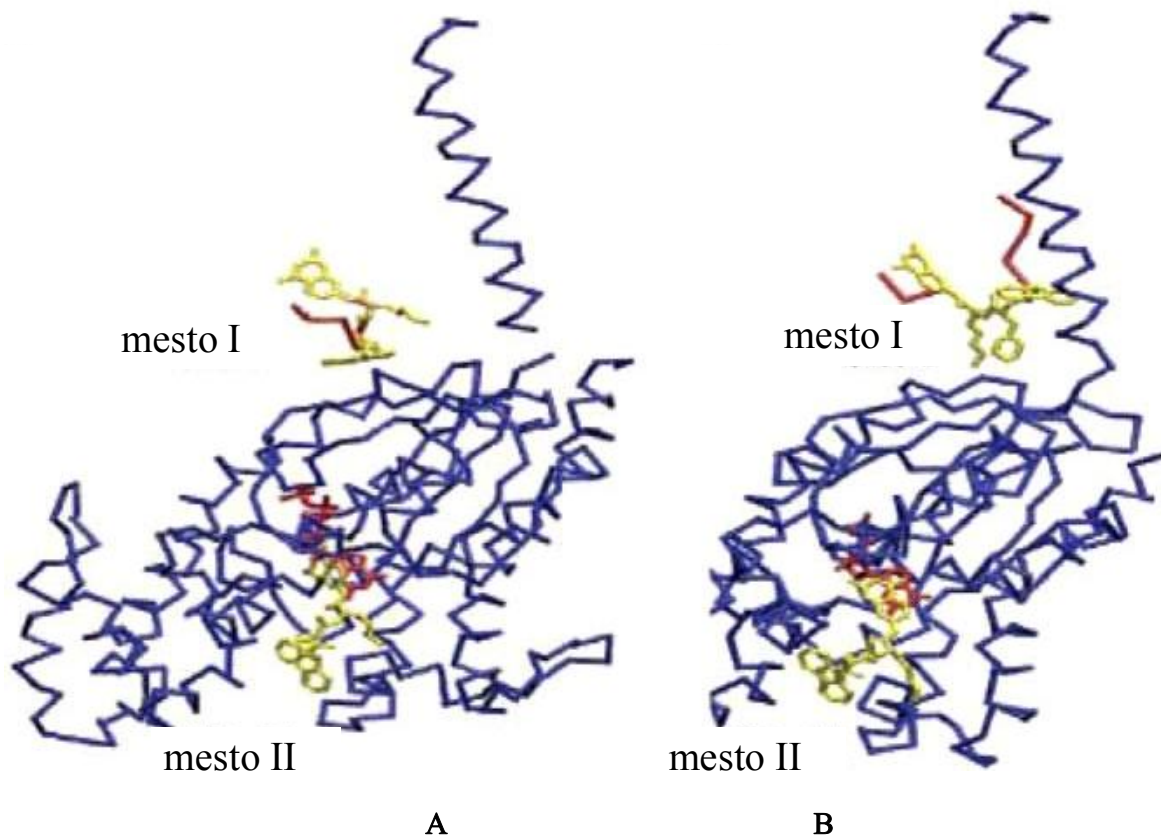
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Galnon (slika 1) je nepeptidni agonist galaninskega receptorja (Florén in sod., 2005), ki v razmerah in vivo vpliva na številne fiziološke procese, kot so občutek za lakoto in bolečino, pa tudi na bolezenska stanja, npr. blaži epileptične napade (Florén in sod., 2005; Abramov in sod., 2004; Badie-Mahdavi in sod., 2005; Wu in sod., 2003; Saar in sod., 2002). Galnon deluje preko galaninskih in tudi preko nekaterih drugih receptorjev, poleg tega pa še z neposredno vezavo na G-proteine, ima pa tudi sposobnost prodiranja v celico skozi celično membrano. Pokazali so, da aktivira G_i ter inhibira G_s vrsto heterotrimernih G-proteinov (Florén in sod., 2005) in po tej poti vpliva na fiziološke procese in vivo, npr. na širjenje žil. S pomočjo molekulskega modeliranja so pokazali na dve možni mesti vezave na površini podenote alfa, tako pri vrsti G_i kakor pri vrsti G_s (Slika 2). Možnih pa je še več drugih mest za interakcijo

med galnonom in G-proteini (Florén in sod., 2005). Ker gre za ligand, ki je potencialno terapevtsko sredstvo za vrsto patoloških in nezaželenih fizioloških stanj, bi bilo zelo pomembno čim boljše poznati njegove interakcije s komponentami signalnih sistemov, predvsem z G-proteini.



Slika 1: Strukturna formula galnona (Fmoc-β-Cha-Lys-AMC)



Slika 2: Predlagani mesti vezave galnona na podenoto α pri G_i -proteinih (**A**) in G_s -proteinih (**B**). **A**: Lizinski ostanek galnona se veže na isto mesto na podenoti α_{i1} , kot edina zanka podenote β , ki vsebuje lizinski ostanek in hkrati pride v stik z α_{i1} podenoto (**A**, mesto **I**, zanka podenote β je rdeče barve). Kumarinska skupina galnona se veže na isto mesto kot gvaninska skupina od GTP (**A**, mesto **II**). **B**: Lizinski ostanek galnona se veže na isto mesto na podenoti α_s , kot edina zanka adenilat-ciklaze, ki vsebuje lizinski ostanek in hkrati pride v stik z α_s podenoto (**B**, mesto **I**, zanka adenilat-ciklaze je rdeče barve). Kumarinska skupina galnona se veže na isto mesto na podenoti α pri G_i -proteinih (**A**) in G_s -proteinih (**B**), kot gvaninska skupina od GTP (**B**, mesto **II**). Na slikah je galnon označen z rumeno, GTP pa z rdečo barvo (Vir: Florén in sod., 2005).

1.2 NAMEN RAZISKAVE IN ZNANSTVENA HIPOTEZA

V nalogi želimo natančneje opredeliti mesta vezave galnona na podenoto α heterotrimernih G-proteinov tipa G_{i1} . Predvsem želimo potrditi oz. ovreči hipotezo, da je na površini alfa podenote G_{i1} več mest za vezavo galnona. V drugi stopnji želimo ta mesta čim bolj natančno locirati, končno pa tudi določiti afiniteto galnona za vezavo. Postavili smo naslednje znanstvene hipoteze:

1. Na površini alfa podenote G_{i1} sta vsaj dve mesti za vezavo galnona.
2. Če se galnon res veže na več mest, je vezava kooperativna.
3. Galnon se verjetno ne veže na mesto, na katero se veže GTP.

2 PREGLED OBJAV

2.1 G-PROTEINI

Med G-proteine spada več družin različnih celičnih proteinov, ki opravljajo zelo raznolike naloge. Njihovo ime izhaja iz dejstva, da vežejo gvaninska nukleotida gvanozin trifosfat (GTP) in gvanozin difosfat (GDP) in imajo GTP-azno aktivnost. G-proteini igrajo osrednjo vlogo pri prenosu signala, pomembno vlogo pa imajo še pri številnih drugih celičnih procesih kot so transport veziklov, sestavljanje citoskeleta, celična rast in sinteza proteinov. G-proteine lahko razdelimo v dve veliki skupini: monomerne (majhne) G-proteine in heterotrimerne G-proteine. Monomerne G-proteine imenujemo tudi male GTPaze.

2.1.1 Monomerni G-proteini

Monomerni G-proteini imajo molekulska masa 20-25 kDa in so vključeni v dinamične celične procese. Delimo jih na pet poddružin po strukturnih in funkcijskih značilnostih. Te poddružine poimenujemo s kraticami Ras, Arf, Rab, Rac, Rac/Rho in Ran. Najbolje raziskana družina majhnih G-proteinov je družina Ras. Pomembni so pri regulaciji mitogeneze in usklajevanju delovanja drugih malih GTPaz. Aktivnost proteinov Ras uravnavajo številni regulatorni proteini, ki se vežejo na njih. Te uvrščamo v tri skupine: GEF (nucleotide exchange factors) stimulirajo sprostitve vezanega GDP z neaktivnega Ras, kar omogoči vezavo GTP in aktivacijo Ras. GAP (GTPase activating proteins) se vežejo na Ras in povzročijo povečanje GTPazne aktivnosti ter tako zmanjšajo aktivnost Ras. GIP (GTPase inhibitory proteins) se vežejo na Ras in inhibirajo GTPazno aktivnost. Poddružini Arf in Rab uravnavata odcepljanje, transport in fuzijo veziklov. Rac/Rho so pomembni pri genski ekspresiji in organizaciji citoskeleta. Ran sodelujejo pri prenašanju proteinov in RNA skozi komplekse jedrnih por (Wilkie in White, 2000).

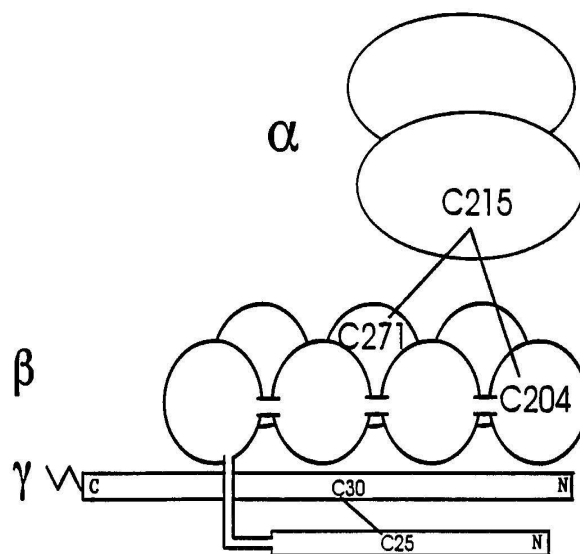
2.1.2 Heterotrimerni G-proteini

Heterotrimerni G-proteini so družina proteinov, ki posredujejo zunajcelične signale od membranskih receptorjev do efektorskih proteinov kot so npr. fosfolipaze, adenilat-ciklaze, ionski kanalčki in fosfodiesteraze. Sprememba aktivnosti efektorskih proteinov vodi do sprememb v celičnem delovanju, ki so lahko takojšnje in trajajo kratek čas, na primer krčenje mišic ali sekrecija različnih snovi iz celic, ali pa se učinki pokažejo z zamikom in trajajo dalj časa, na primer spremembe izražanja genov, ki vodijo v rast in diferenciacijo celic (Hurowitz, 2000; Offermans, 2003).

Heterotrimerni G-proteini so sestavljeni iz podenote α in dimera $\beta\gamma$. Dimer $\beta\gamma$ razpade le pri denaturaciji, v fizioloških razmerah pa deluje kot monomer (Takida in Wedegaertner, 2003). Nomenklatura heterotrimernih G-proteinov temelji na lastnostih α podenote, na podlagi katere jih uvrščamo v štiri družine (G_{as} , G_{aq} , G_{ai} in $G_{\alpha 12}$) glede na strukturne in funkcionalne značilnosti (Conklin in Bourne, 1993; Neer, 1995). Molekulska masa podenote α je 38-52 kDa, podenota β je velika 35-36 kDa, podenota γ pa je velika 7-10 kDa. V sesalčjih celicah so do zdaj odkrili 23 različnih podenot α (Hermans, 2003), 6 podenot β (Wess, 1998) in 12 podenot γ (Schwindinger in Robishaw, 2001). Raznolikost podenot je velika zaradi številnih genov v genomu (17 različnih genov za podenoto α) (Hermans, 2003), poveča pa se še zaradi alternativnega izrezovanja intronov, kotranslacijskih in/ali posttranslacijskih modifikacij (Matsuda in sod., 1994).

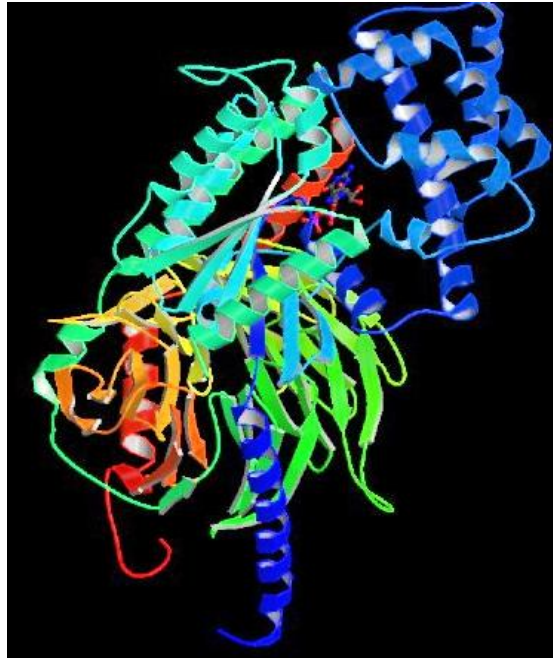
Molekularni mehanizem aktivacije heterotrimernih G-proteinov zahteva, da so ti vezani na citosolni strani plazemske membrane. Vezavo na membrano omogočajo posttranslacijske modifikacije, pri katerih se na podenoti α in γ kovalentno vežejo maščobne kisline. Pri podenoti α poznamo miristoilacijo in/ali palmitoilacijo, pri podenoti γ pa izoprenilacijo. Miristoilacija je kovalentna vezava miristinske kisline (14 C atomov dolga nasičena maščobna kislina) na glicinski ostanek na N-koncu podenote α preko amidne vezi. Palmitoilacija je vezava palmitinske kisline (16 C atomov dolga maščobna kislina) na cisteinski ostanek na N-terminalnem koncu podenote α preko tioestrne vezi. Izoprenilacija je lipidna modifikacija pri

kateri se na C terminalni konec podenote γ veže izoprenoid, farnezilni (15 C atomov) ali geranilgeranilni (20 C atomov) ostanek. Raziskovanje strukture in sestavljanja heterotrimernih G-proteinov iz posameznih podenot α , β in γ je pokazalo, da se podenote v heterotrimeru stikajo in povežejo (proteinsko-proteinske povezave) (Lambright, 1996; Sondek, 1996; Wall, 1998) (slika 3). Pri sestavljanju podenot α in $\beta\gamma$ v heterotrimer sodelujejo še interakcije med proteini in lipidi. Prenilna skupina na izoprenilirani podenoti γ se veže na vezavno mesto na podenoti α in tako omogoči nastanek heterotrimer (Dietrich, 2003). V zadnjem času se uveljavlja model, ki opisuje sestavljanje in potovanje heterotrimer do specifičnega mesta na citosolni strani plazemske membrane. Po njem se na novo sintetizirani podenoti β in γ hitro združita v dimer. V citosolu pride nato do izoprenilacije podenote γ . To omogoči, da se dimer prenese v endoplazemski retikulum, kjer pride do nadaljnjih modifikacij. Končno se podenoti α in $\beta\gamma$ združita in tvorita heterotrimer, še preden prideta do plazemske membrane. Po tem modelu nosi celoten heterotrimer informacijo za specifično lokalizacijo, hkrati pa bi s tem modelom lahko razložili vzdrževanje ustrezne stehiometrije (1:1) podenot α in $\beta\gamma$ (Takida in Wedegaertner, 2003).



Slika 3: Shematična predstavitev heterotrimernega G-proteina. Označeni so položaji cisteinskih ostankov, ki sodelujejo pri povezovanju podenot. Podenote so prikazane shematično. Podenota α ima GTPazno in helikalno domeno, ki sta označeni z dvema ovaloma. Za podenoto β so značilne t.i. WD ponovitve z veliko triptofana (W)

in asparaginske kisline (D), ki so označene s krogi. N-terminalna helikalna domena podenote β in helikalna podenota γ sta označeni s pravokotnikoma (Vir: Garcia-Higuera in sod., 1995).

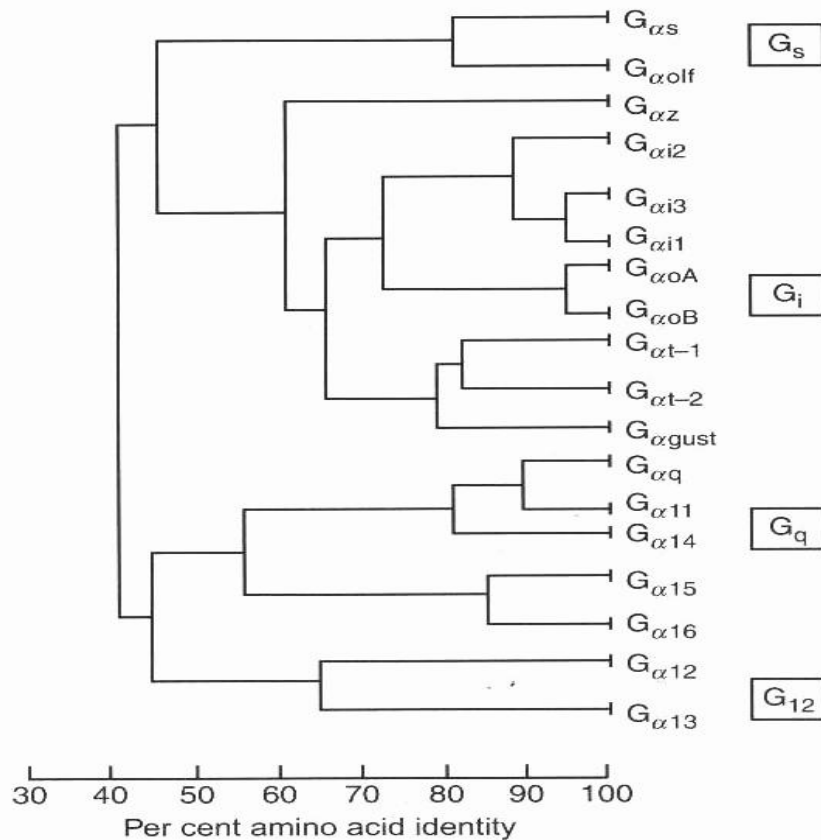


Slika 4: Prikaz kristalne strukture heterotrimernega G_i-proteina G $\alpha_{i1}\beta\gamma_2$ iz podgane *Rattus norvegicus* z vezanim GDP (Wall in sod. 1995). (Vir: 1GP2.PDB).

2.1.2.1 Struktura podenote α

Pri sesalcih so odkrili preko 23 različnih podenot α . V genomu so odkrili 17 različnih genov. Število genskih produktov je večje zaradi alternativnega izrezovanja intronov (Hermans, 2003). Na podlagi aminokislinske sorodnosti jih razvrščamo v štiri skupine: G $_{\alpha s}$, G $_{\alpha q}$, G $_{\alpha i}$ in G $_{\alpha 12}$ (Conklin in Bourne, 1993; Neer, 1995) (slika 5). Izražanje različnih podenot α se razlikuje glede na tkiva. Raven izražanja več različnih podenot je v somatskih celicah precej visoka. Izjema so senzorične celice (vid, okus, voh) in hematopoetske celice, kjer prevladuje samo določena vrsta podenote α . Vsaka celica ponavadi vsebuje vsaj štiri različne vrste podenot (Neer, 1994). V somatskih celicah je izraženih tudi do deset različnih podenot α .

Nekatere se izražajo praktično v vseh celicah ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ in $G_{\alpha 12}$), medtem ko nekatere najdemo v zelo omejenem številu tkiv (Offremanns, 2003).



Slika 5: Sorodnost različnih α podenot glede na aminokislinsko zaporedje (Vir: Albert in Robillard, 2002).

Analize s pomočjo rentgenske kristalografije so pokazale, da je podenota α sestavljena iz dveh domen, GTP-azne (Ras) domene in α -helikalne domene, ki ju povezujeta dve konzervativni povezovalni (linkerski) regiji (Noel in sod., 1993; Coleman in sod., 1994). GTP-azna domena je sestavljena iz šestih β -struktur ($\beta 1$ - $\beta 6$), ki jih obkroža šest α heliksov ($\alpha 1$ - $\alpha 5$ in αG) (Lambright in sod., 1996). Na njej se nahaja vezavno mesto za GTP, receptor, efektor in kompleks $\beta\gamma$ (Noel in sod., 1993). Vezavno mesto za GTP leži v jarku med obema domenama.

Helikalna domena je sestavljena iz centralnega α heliksa ($\alpha 4$), ki ga obdaja pet krajših α heliksov (αB - αF), njena funkcija pa ni znana (Lambright in sod., 1996).

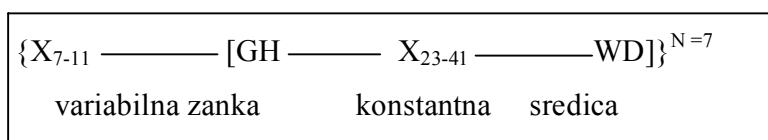
Aktivacija specifične signalne poti je odvisna od vrste G-proteinov, ki jih lahko receptor aktivira. To pa je odvisno od specifične interakcije med receptorji in G-proteini. V heterotrimernem G-proteinu se verjetno tako podenota α kot tudi dimer $\beta\gamma$ dotikata receptorja (Liri in sod., 1999). Podenota α verjetno igra ključno vlogo pri razlikovanju različnih podtipov receptorjev (Savarese in Fraser, 1992; Bourne, 1997; Wess, 1997) in njihovih funkcionalnih stanj (Daaka in sod., 1997; Spengler in sod., 1993). Trenutno veljavni model vezave podenote α na receptor predvideva štiri območja, ki naj bi bila v neposrednem stiku z receptorjem (Bourne, 1997; Blahos in sod., 2001). Najbolj raziskan je C-terminalni konec. Na mestu -3 in -4 (če je -1 končna aminokislina) ima aminokislinske ostanke, ki ključno vplivajo na vezavo receptorja. G_{αo}, G_{αi} in G_{αt} imajo na -4 mestu cisteinski ostanek, G_{αq} pa ima na tem mestu tirozin (Conklin in sod., 1993; Conklin in sod., 1996; Kostenis in sod., 1997; Blahos in sod., 1998; Bahija in sod., 1998; Umemori in sod., 1997). Po vezavi receptorja na podenoto α pride do konformacijske spremembe njenega C-terminalnega dela. Naslednje območje, ki določa specifičnost vezave je N-terminalna regija podenote α . V primeru G_{q/11} so pokazali, da ta regija omejuje vezavo na tiste receptorje, ki signalizirajo preko fosfolipaze C (Kostenis in sod., 1997). Tretja regija, ki skrbi za specifičnost vezave leži med heliksoma $\alpha 4$ in $\alpha 5$. Vsebuje zanko L9 in β -strukturo $\beta 6$ (Noel in sod., 1993). Sodeluje pri specifični vezavi podenote α na rodopsinu podobno družino receptorjev (družina GPCR 1) (Hamm in sod., 1988; Bockaert in sod., 1999; Bae in sod., 1997). Četrta regija leži znotraj zanke, ki povezuje N-terminalni α heliks z β -strukturo $\beta 1$ znotraj GTP-azne domene (Blahos in sod., 2001).

Pri vezavi podenote α na dimer $\beta\gamma$ je ključnih prvih 25 aminokislin na podenoti α (Fung in Nash, 1983; Denker in sod., 1992), verjetno pa sodeluje tudi heliks $\alpha 2$, ker se njegov položaj spremeni odvisno od vezave GTP ali GDP (Lambright in sod., 1994; Thomas in sod., 1993). Mesto za vezavo dimera $\beta\gamma$ se delno prekriva z mestom za vezavo efektorja, na primer adenilat-ciklaze. Delno prekrivanje obeh mest izključuje možnost sočasne vezave dimera $\beta\gamma$ in efektorja na podenoto α (Conklin in Bourne, 1993).

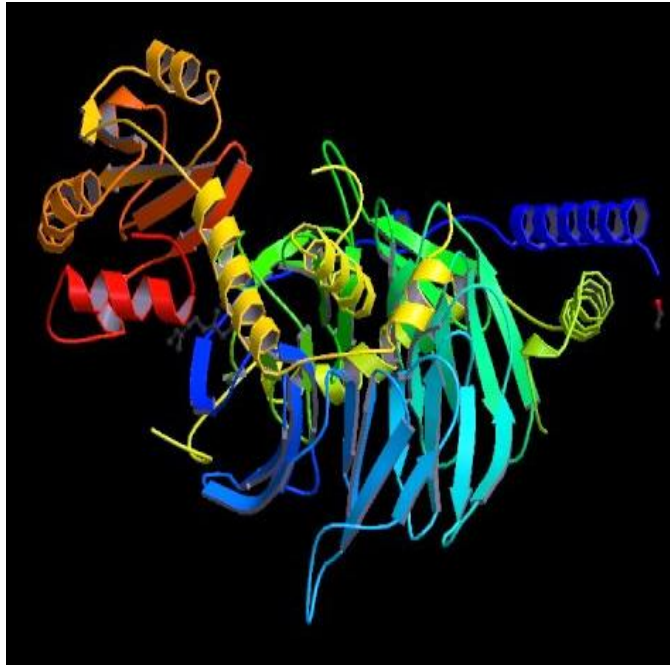
2.1.2.2 Dimer βγ

Podenoti β in γ se v fizioloških razmerah vežeta v zelo stabilen kompleks, zato ju lahko obravnavamo kot funkcionalni monomer, ki razpade le ob prisotnosti denaturantov. Do sedaj so odkrili 6 podenot β in 12 podenot γ. Na podlagi tega je možnih 72 različnih kompleksov βγ. Pomen take raznolikosti ni popolnoma pojasnjen, saj ima večina kompleksov podobno vlogo. V zadnjem času pa raziskave kažejo, da se različni dimeri specifično vežejo na različne podenote α (Claphman in Neer, 1997) in tudi receptorje. Pomembno vlogo pri tem naj bi imela C-terminalna domena podenote γ, ki naj bi se specifično vezala na receptor in tako vplivala na aktivnost podenote α. Vezava podenote γ na receptor bi lahko razložila obvezno prisotnost kompleksa βγ pri aktivaciji podenote α s pomočjo receptorja (Azpiazu in Gautman, 2001).

Podenota β ima N-terminalni amfipatični α-heliks, ki se veže s podenoto γ (Lupas in sod., 1992). Preostalo zaporedje je sestavljeno s sedmih ponavljajočih se enot (β-struktur), velikih približno 43 aminokislinskih ostankov (Fong in sod., 1986). Te ponavljajoče enote so našli še v številnih drugih proteinih (proteini, ki uravnavajo faze celične delitve, transkripcijo, procesirajo mRNA, združujejo proteine citoskeleta in nadzorujejo vezikularni transport). Vsebujejo ohranjeno jedro dolgo 23-41 aminokislinskih ostankov, ki se ponavadi začne s sekvenco Gly-His (GH) in konča s Trp-Asp (WD) in jih zato imenujejo WD ponovitve (slika 6). Vsaka ponovitev tvori strukturo iz štirih antiparalelnih β verig, ki se oblikujejo v lopatice oz. propelerske strukture (slika 7). WD ponovitve so ločene z variabilnim delom 7-11 aminokislinskih ostankov, ki tvorijo zanko (Neer in sod., 1994).



Slika 6: Shematični prikaz strukture podenote G_β (Neer, 1995).



Slika 7: Struktura kompleksa med fosducinom in dimerom $\beta\gamma$ heterotrimernega G_i-proteina (transducina). Fosducin je obarvan rdeče in rumeno, dimer $\beta\gamma$ je obarvan modro in zeleno. Kompleks je bil izoliran iz retine goveda *Bos taurus* (Loew in sod., 1998) (Vir: 1A0R.PDB).

Podenota γ je pretežno sestavljena iz α -heliksa (Lupas in sod., 1992). V raztopini ima asimetrično iztegnjeno obliko (Mende in sod., 1995). Cisteinski ostanek na C-terminalnem koncu je preniliran, kar je pomembno za pritrditev dimera na membrano (Casey, 1994; Wedegaertner in sod., 1995) in tvorbo heterotrimernega kompleksa (Dietrich in sod., 2003). V sredini podenote je štirinajst aminokislin, ki so pomembne za vezavo podenote γ z različnimi podenotami β . Osrednjo vlogo ima cistein, ki naj bi preko S-S mostiča povezoval podenoto γ s podenoto β (slika 3) (Neer, 1995). Podenota β s propelersko strukturo omogoča spiralno povezavo med N-terminalnima heliksoma obeh podenot (Wall in sod., 1995; Lambright in sod., 1996; Sondek in sod., 1996). Interakcije med obema podenotama so zelo močne. Ločijo ju lahko le denurantni. Dimer $\beta\gamma$ ima podobno kot podenota α biološko aktivnost. Veže se

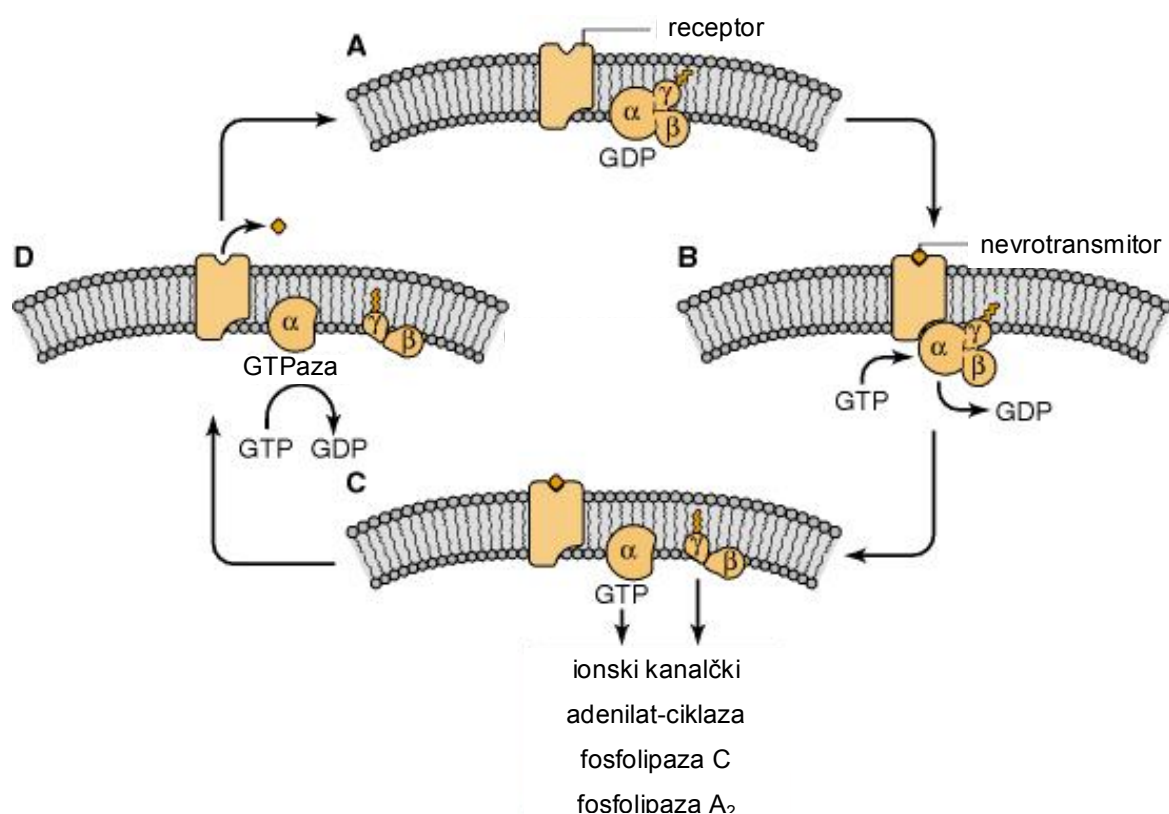
namreč na številne efektorske molekule. Zato vezava na deaktivirano podenoto α z vezanim GDP onemogoči njegovo delovanje (Logothetis in sod., 1987).

2.1.2.3 Signalni cikel G-proteinov

Slika 8 opisuje signalni cikel heterotrimernih G-proteinov. V neaktivnem stanju so G-proteini vezani na celično membrano v obliki heterotrimerov, sestavljenega iz podenot α , β , in γ in povezani z receptorjem. V tem stanju je na podenoto α vezan GDP. Vezava liganda na receptor povzroči konformacijsko spremembo receptorja, to pa povzroči konformacijsko spremembo na receptor vezane podenote α . Njena afiniteta do GDP se zmanjša in ta disociira iz aktivnega mesta. V novi konformaciji ima podenota α večjo afiniteto za GTP kot GDP, poleg tega pa je v celici koncentracija GTP veliko večja od koncentracije GDP, zato GDP zamenja GTP. Vezava GTP na aktivni center podenoti α omogoči zavzetje aktivne konformacije. Podenota α se loči od receptorja in dimera $\beta\gamma$.

Prosti podenoti sta biološko aktivni in uravnavata aktivnost številnih efektorskih proteinov, ki se razlikujejo glede na vrsto podenote in tip celice. Podenota α lahko stimulira ali inhibira adenilat-ciklazo, uravnava odpiranje ali zapiranje kanalčkov za Ca^{2+} in K^{+} ione, aktivira cGMP fosfodiesterazo in fosfolipazo C, sodeluje pri regulaciji izmenjave $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ionov (Gilman, 1987, Simon in sod., 1991; Clapham in Neer, 1993; Neer, 1994; Voyno-Yasenetskaya in sod., 1994). Dolgo časa so mislili, da dimer $\beta\gamma$ deluje le kot negativni regulator podenote α , dokler niso odkrili, da samostojno nadzoruje muskarinske kanalčke za K^{+} (Logothetis in sod., 1987; Clapham in Neer, 1993). Prosti dimer $\beta\gamma$ regulira še fosfolipazo C β , β -adrenergično receptorsko kinazo, adenilat-ciklazo (Clapham in Neer, 1993), kalmodulin (Katada in sod., 1987), fosducin, različne receptorje (Logothetis in sod., 1987), fosfolipazo A₂ in fosfatidilinozitol 3-kinazo (Clapham in Neer, 1993). Dimer $\beta\gamma$ lahko sodeluje še s proteini Ras in aktivira MAP kinazno signalno pot (Faure in sod., 1994; Crespo in sod., 1994).

Aktivno stanje podenote α traja tako dolgo, dokler ne pride do hidrolize GTP v GDP in anorganski fosfat. Za hidrolizo in aktivacijo so potrebni Mg^{2+} ioni (Higashijima in sod., 1987). Vse vrste podenot α so GTPaze, čeprav se njihova GTPazna aktivnost razlikuje (Carty in sod., 1990; Linder in sod., 1990). Po hidrolizi ostane na podenoto α vezan GDP. To omogoči ponovno vezavo z dimerom $\beta\gamma$, nastali neaktivni heterotrimer se ponovno poveže z receptorjem in tako vzpostavi začetno stanje. Hitrost hidrolize GTP je omejujoči dejavnik, ki nadzoruje čas delovanja obeh podenot α in $\beta\gamma$. Ponovna povezava obeh podenot prepreči njuno aktivnost in istočasno pripravi receptor in celotni sistem na ponovno aktivacijo z ligandom.



Slika 8: Signalni cikel heterotrimernih G-proteinov. **A:** V neaktivnem stanju je G-protein vezan na citosolni strani celične membrane v obliki heterotrimer, sestavljenega iz podenot α , β in γ , ki so le šibko povezane z receptorjem. V neaktivnem stanju je na podenoto α vezan GDP. **B:** Po aktivaciji receptorja z ligandom, na primer neurotransmitorjem, se receptor bolj tesno poveže s heterotrimerom, kar vodi do spremembe konformacije

podenote α , disociacije GDP in vezave GTP. **C:** Vezava GTP sproži disociacijo podenote α od receptorja in dimera $\beta\gamma$. Prosta podenota α z vezanim GTP in prost dimer $\beta\gamma$ sta funkcionalno aktivna in regulirata številne efektorje, ki se razlikujejo glede na tip podenote in vrsto celice. Efektorji so lahko ionski kanalčki, adenilat-ciklaza, fosfolipaza C, fosfolipaza A₂. **D:** Zaradi GTPazne aktivnosti podenote α se razgradi GTP v GDP. To povzroči ponovno povezavo podenote α in dimera $\beta\gamma$, kar skupaj z disociacijo liganda z receptorja vodi do ponovne vzpostavitve osnovnega stanja. (Vir: Hyman in Nestler, 1996).

2.2 RECEPTORJI S SEDMIMI TRANSMEMBRANSKIMI SEGMENTI (7-TMSR)

Celica neprestano komunicira s svojim okoljem tako, da sprejema različne signale in se nanje odziva. Signali so lahko kemične spojine, pa tudi elektromagnetno valovanje, npr. svetloba. Hidrofilne spojine praviloma ne vstopajo v celico skozi fosfolipidni dvosloj, ampak se vežejo na proteinske receptorje na površini celice in preko njih prenesejo informacijo v notranjost. Pri vezavi signalne molekule (liganda) na receptor se ta aktivira skupaj s heterotrimerni G-proteini, ki so nanj vezani (Gilman, 1987). Aktivirani G-proteini lahko aktivirajo različne znotrajcelične efektorje (encimi, ionski kanalčki) (Watson in Arkinstall, 1994; Muller in Lohse, 1995). Tarčne encime in ionke kanalčke imenujemo efektorje zato, ker njihova aktivacija vodi do celičnega odziva (Neer 1995). Receptorji sklopljeni z G-proteini so le ena izmed treh glavnih skupin membranskih receptorjev, drugi dve skupini predstavljata receptorje, ki imajo tirozin kinazno aktivnost in ionske kanalčke (Fantl in sod., 1993).

Vsaka vrsta celic ima le določene membranske receptorje, določene vrste G-proteinov in efektorjev. Celica lahko zazna le tiste signale, za katere ima ustrezne receptorje. Primarna specifičnost odziva celice je zagotovljena z interakcijo ligand-receptor. Območje odziva celice pa je določeno s specifičnostjo interakcije receptor-G-protein. Receptorji so zelo selektivni za ligande. Če je receptor sklopljen z eno vrsto G-proteinov, potem lahko aktivira le določene efektorje. Odgovor celice bo ozko specifičen. Receptor, ki aktivira več različnih vrst G-proteinov, lahko aktivira različne efektorje in odziv celice bo manj specifičen, saj se bo aktiviralo več signalnih poti. Interakcija G-protein-efektor je manj pomembna za specifičnost prenosa signala z G-proteini (Neer 1995).

2.2.1 Struktura in funkcija 7-TMSR

Receptorji, ki so sklopljeni z G-proteini spadajo v veliko družino receptorjev s sedmimi transmembranskimi segmenti. Njihova skupna značilnost je, da imajo sedem hidrofobnih α vijačnic dolgih 20-25 aminokislin, ki prehajajo skozi fosfolipidni dvosloj (Dohlman in sod., 1987; Dohlman in sod., 1991). Te transmembranske regije bi naj tvorile žep za vezavo liganda (Kobilka in sod., 1988). Receptor je vstavljen v membrano tako, da je N-terminalni del zunaj celice, C-terminalni del pa znotraj nje (Dohlman in sod., 1991; Wang in sod., 1989). N-terminalni del receptorja je variabilen in lahko vsebuje od deset do nekaj sto aminokislinskih ostankov. Hidrofobni α -heliksi so med seboj povezani s hidrofilnimi zankami, od katerih so tri znotrajcelične in tri zunajcelične. C-konec leži v citosolu. Znotraj in zunajcelične zanke sestavlja deset do štirideset aminokislinskih ostankov. Tretja znotrajcelična zanka in C-terminalni del pa imata lahko tudi več kot 150 aminokislinskih ostankov (Watson in Arkinstall, 1994; Dohlman in sod., 1991; Strader in sod., 1994).

Receptorji praviloma vežejo ligande zelo specifično. Manjši ligandi (adrenalin) se vežejo znotraj transmembranske regije receptorja (Watson in Arkinstall, 1994), pri vezavi večjih ligandov (večji peptidi, glikoproteinski hormoni) pa sodeluje še N-terminalna zunajcelična regija receptorja (Reichert in sod., 1991). Ligandi lahko sprožijo celični odziv in jih v tem primeru imenujemo agonisti ali pa ne sprožijo celičnega odziva, a ovirajo vezavo agonista in jih v tem primeru imenujemo antagonist. V večini primerov se vezavna mesta agonistov in antagonistov razlikujejo (Fong in sod., 1993).

Večina receptorjev je glikoziliranih. Na N-terminalnem delu in zunajceličnih hidrofilnih zankah imajo enega ali več asparaginskih ostankov, ki so del N-glikozilacijskega zaporedja (Rands in sod., 1990). Glikozilacija je pomembna za pravilno razporeditev receptorjev v celici, ni pa pomembna za vezavo agonista (O'Dowd in sod., 1989).

Na C-terminalnem delu prve in v sredini druge znotrajcelične zanke sta vedno prisotna po dva povezana cisteinska aminokislinska ostanka. Pri rodopsinu sta cisteina povezana z disulfidno vezjo, ki je potrebna za pravilno zvijanje proteina v terciarno strukturo (Karnik in Khorana, 1990). Disulfidna vez je pomembna tudi pri interakciji med receptorjem in agonistom ali antagonistom (Dohlman in sod., 1990).

Nekateri receptorji tvorijo s C-terminalnim delom še četrto znotrajcelično zanko. Na tem delu sta eden ali dva cisteinska ostanka, od katerih je npr. pri rodopsinu in β -adrenergičnem receptorju eden zaestren s palmitinsko kislino preko tioestrskega mostu (O'Dowd in sod., 1989; Ovchinnikov in sod., 1988). Kovalentno vezana palmitinska kislina je zasidrana v fosfolipidni dvosloj, kar omogoči še četrto znotrajcelično zanko. Ta zanka ni značilna za vse 7-TMSR, ampak praviloma le za tiste, ki imajo dolg C-terminalni del. Če pri β -adrenergičnem receptorju zamenjamo cistein v tem delu z neko drugo aminokislino, onemogočimo vezavo receptorja s heterotrimernim G-proteinom vrste G_s (O'Dowd in sod., 1989).

2.3 SINTETIČNI PEPTIDI

Naravni peptidi nastajajo v bioloških sistemih. Tudi peptide, sintetizirane umetno s peptidnim sintetizerjem ali ročno, ki so po zgradbi enaki naravnim peptidom prištevamo med naravne. Število aminokislin v naravnih peptidih variira med 2-3 do nekaj 1000 (Leninger in sod., 1993). V organizmih so zelo pogosti in opravljajo različne naloge. Mnogi med njimi, npr. številni peptidni hormoni, so povezani s prenosom signalov. Poznamo pa tudi številne, ki ne sodelujejo pri signaliziranju, npr. glutation, ki v celicah preprečuje oksidacije, ali mastoparan, ki je komponenta osjega strupa.

Umetni peptidi so tisti, ki niso biološkega izvora in jih pripravljamo le sintetično. Največkrat posnemajo zgradbo naravnih peptidov. Od njih se lahko ločijo le v eni aminokislini. Takšna zamenjava ima navadno majhen vpliv na strukturo, lahko pa zelo spremeni biološko funkcijo

peptida. Primer je MAS 17, neaktivni analog mastoparana, ki ima na šestem mestu levcin zamenjan z lizinom (Vitale in sod., 1993).

Sintetične peptide najpogosteje pripravijo s tehniko sinteze na trdni fazi z uporabo florenil-metilokarboksilne kemije (Erickson in Merrifield, 1976). S to metodo lahko sintetizirajo oligopeptide do dolžine 40-50 aminokislinskih ostankov, za sintezo daljših peptidov pa ta metoda ni dobra zaradi manjšega izkoristka in naraščajoče količine nezaželenih primesi. Za daljše peptide uporabljajo tehniko zlepljanja manjših peptidov.

Sposobnost sinteze poljubnih peptidov nam odpira široke možnosti raziskovanja. Raziskujemo lahko njihove lastnosti po spremembi stranskih verig. Iščemo lahko peptide s posebnimi lastnostmi tako, da jim dodamo nestandardne stranske verige ali pa jih označimo z radioaktivnimi ligandi in študiramo procese v celici (kopičenje, razgradnjo, lokalizacijo, prehod čez membrane) (Voet in Voet, 1995). Največjo privlačnost pa ima verjetno pridobivanje novih farmakološko aktivnih peptidov z učinki, ki so v bioloških sistemih redki ali novi (Mayo, 2000).

Pri načrtovanju sinteze novih peptidov si pomagamo s knjižnicami sintetičnih peptidov. V knjižnici najdemo podatke o zgradbi peptidov in njihovih funkcijah, s pomočjo kombinatornih matematičnih sistemov lahko identificiramo nove peptide s predvideno funkcijo, na primer antigene, receptorske ligande (Johnsson in Ge, 1999) ali peptide, ki vstopajo v celice (CPP).

2.3.1 Peptidi, ki lahko vstopajo v celice (Cell-penetrating peptides, CPP)

Z odkritjem CPP se je odprlo novo območje raziskovanja. Ključni sta bili odkritji Tat regulatornega proteina (Green in Lowenstein, 1988), ki je kodiran v genomu virusa HIV, in penetratina (DNA vezavna domena homeoproteina antennapedie) (Joliot in sod., 1991), ki verjetno vstopata v celice v odsotnosti receptorjev (Langel, 2002 in 2006).

CPP so 10-30 aminokislin dolgi peptidi, ki lahko prehajajo skozi celično membrano s pomočjo različnih mehanizmov (Lindgren in sod., 2000; Pooga in sod., 1998; Derossi in sod., 1996) in omogočajo prehajanje večjih in polarnih molekul, ki so vezane na njih, skozi plazmalemo v celico. CPP so večinoma bazični amfifilni peptidi s večjim številom argininov in lizinov v zaporedju (Saar in sod., 2005). Pri fizioloških razmerah so pozitivno nabiti, saj je delež pozitivno nabitih aminokislin 17-100% (Zorko in Langel, 2005). Peptidi iz L-aminokislin se v organizmih zelo hitro razgradijo, zato pri sintezi CPP velikokrat uporabijo D-aminokislino, s čemer povečajo odpornost peptidov na proteolizo (Jiang, 2004).

Mehanizem prehajanja CPP v celice ostaja nepojasnen. Izoblikovala sta se dva modela. Prvi predlaga, da CPP destabilizira fosfolipidni dvosloj in sproži nastanek obrnjenih micelov. Miceli omogočijo vstop CPP in njegovega tovora v celico, ne da bi CPP in tovor kdaj zapustila vodno okolje. Drugi model predlaga vstop CPP s pomočjo endocitoze. Prvi model so predlagali, ko so študirali celični privzem Pen in Tat proteinov s pretočno citometrijo in fluorescenčno mikroskopijo in ugotovili, da je ta hiter, temperaturno in receptorsko neodvisen in neobčutljiv na blokatorje endocitoze (Vives in sod., 1997; Derossi in sod., 1996). Poznejše študije na živih celicah, kjer so s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo opazovali prehajanje fluorescenčno označenih peptidov, pa so pokazale na endocitotski privzem CPP (Fittipaldi in sod., 2003; Potocky in sod., 2003).

Pri iskanju oz. načrtovanju novih CPP iščemo zaporedja, ki imajo delno hidrofoben in delno hidrofilen značaj. Takšna zaporedja so pogosto deli transmembranskih proteinov, ki ležijo delno v membrani, delno pa izven nje. S primerjavami peptidnih zaporedij so ugotovili, da imajo znotrajcelične zanke sedem transmembranskih receptorjev, ki so sklopljeni z G-proteini, pogosto aminokislinska zaporedja, ki omogočajo vstopanje v celice. Te zanke so tudi mesta preko katerih receptorji komunicirajo z G-proteini, zato so peptidi, ki izvirajo iz njih pogosto sposobni aktivirati G-proteine na podoben način kot receptorji sami (Östlund in sod., 2005). Na osnovi znanja, pridobljenega s proučevanjem CPP so zaradi večje stabilnosti pričeli razvijati nepeptidne analoge CPP, od katerih so nekateri tudi uporabni kot učinkovine, ki

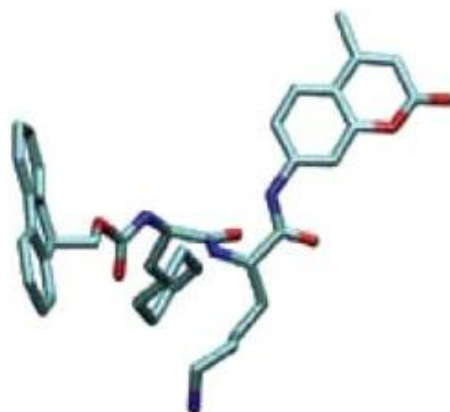
lahko vstopijo v celico in delujejo na notranje celične molekule in strukture. Takšna molekula je npr. galnon.

2.3.2 Galnon

Galnon so sintetizirali Saar in sod. (2002) s pomočjo kombinatorne peptidomimetične knjižnice. Je majhna molekula z molekulsko maso 677 kDa. Veže se na galaninske receptorje in tam deluje kot agonist, saj jih aktivira in preko G-proteinov inhibira adenilat-ciklazo (Saar in sod., 2002), deluje pa tudi z neposredno vezavo na G-proteine. Nepeptidni značaj daje spojini nekatere prednosti pred običajnimi peptidnimi ligandi, predvsem večjo stabilnost in možnost prehajanja krvno-možganske bariere. Zato je galnon potencialno zanimiv kot farmacevtska učinkovina.

2.3.2.1 Načrtovanje in sinteza galnona

Iskali so možne ligande galaninskih receptorjev. V ta namen so uporabili pristop s pomočjo kombinatorne kemije. Vodilna spojina je temeljila na tripeptidu Trp²-Asn⁵-Tyr⁹, saj ti aminokislinski ostanki predstavljajo pomembno farmakoforo galanina (Land in sod., 1991). Funkcionalne skupine začetne vodilne spojine so oponašale stranske verige teh treh aminokislinskih ostankov. Na podlagi vodilne spojine so dobili kombinatorno knjižnico, ki je vsebovala 265 spojin. Izmed teh so izbrali tisto, ki je najboljše izpodrivala galanin z galaninskih receptorjev. Identificirano spojino so imenovali galnon, Fmoc-cikloheksilalanin-Lys-amidometilkumarin (Fmoc-β-Cha-Lys-AMC) (slika 1 in slika 9). Sinteza poteka po protokolu, ki so ga pripravili Saar in sod. (2002). Galnon je danes dostopen tudi komercialno.



Slika 9: 3D struktura galnona narejena z molekulskim simulacijskim programom CHARM. (Vir: Florén in sod., 2005).

2.3.2.2 Biološki učinki galnona

Galnon po sistemskem vnosu v telo npr. podgane vpliva na številne fiziološke procese. Tako npr. deluje antiepileptično in vivo (Saar in sod., 2002), zmanjša simptome po odvzemu opiatov (Zachariou in sod., 2003), regulira apetit tako, da se zmanjša vnos hrane (Abramov in sod., 2004), inducira dolgotrajno potenciacijo v dentatnem girusu miši C57BL/6 (Badie-Mahdavi in sod., 2005), olajša bolečino po delni poškodbi shiatičnega živca (Wu in sod., 2003) in vpliva na sproščanje inzulina iz pankreasa (Quynh in sod., 2005). Za nekatere učinke so ugotovili, da so povezani z aktivacijo galaninskih receptorjev, medtem ko drugih ne morejo razložiti samo s tem mehanizmom.

Antiepileptično delovanje galnona: galnon vsebuje cikloheksilno skupino, ki je skupna tudi nekaterim antiepileptičnim zdravilom, na primer gabapentinu in kumarinsko skupino, ki je tudi pri zdravilu ezupron. Dajanje galnona podganam in mišim je pokazalo antiepileptični učinek. Ta učinek so preverili tudi v prisotnosti spojine M35, ki je antagonist galaninskih receptorjev in ugotovili, da se učinek galnona ob dodatku M35 izniči. Učinek galnona se izniči tudi v primeru, če se onemogoči izražanje galaninskih receptorjev. To pomeni, da mehanizem delovanja v tem primeru vključuje galaninske receptorje. Zanimivo je, da je učinek galnona

podoben učinku galanina, kljub različnim afinitetam vezave obeh spojin na receptorje (Saar in sod., 2002).

Delovanje galnona na odziv organizma po odvzemu opiatov: galanin zmanjša simptome po odvzemu opiatov. Učinek galnona so testirali na miših in ugotovili da se številni simptomi, kot so vzvratna hoja, žvečenje, driska, skakanje, tresenje šap in izguba telesne teže zmanjšajo za približno 25%.

Vpliv galnona na hranjenje: galanin pri podganah poveča vnos hrane (Crawley, 1999). Učinek galnona pa je ravno obraten, vnos hrane se zmanjša. Učinek je odvisen od doze. Pri koncentracijah galnona 2 mg/kg se vnos hrane zmanjša za polovico (Abramov in sod., 2004).

Vpliv galnona na bolečino: po poškodbi perifernega živca se v gangliju dorzalne korenine poveča sproščanje galanina (Hokfelt in sod., 1987). Galnon je pri podganah z delno poškodovanim shiatičnim živcem zmanjšal bolečino pri toplotnih dražljajih, ni pa pokazal nobenega učinka pri mehanskem ali hladnem dražljaju. Mehanizem delovanja je povezan z galaninskimi receptorji saj se učinek izniči ob dodatku spojine M35, ki je antagonist galaninskih receptorjev. Vendar pa učinka ne moremo razložiti le s tem mehanizmom, saj galanin vpliva tudi na zmanjšanje bolečine pri mehanskem in hladnem dražljaju (Wu in sod., 2003).

Vpliv galnona na sproščanje inzulina: proces sproščanja izulina uravnavajo številni dejavniki. Najpomembnejši med njimi je glukoza. Sproščanje inzulina je povezano z metabolizmom glukoze, ki vodi do povišanega razmerja med ATP/ADP, kar povzroči zaprtje K_{ATP}-kanalčkov in depolarizacijo membrane. Depolarizacija odpre Ca²⁺ kanalčke tipa L, kar povzroči dvig citosolne koncentracije prostega kalcija in tako omogoči eksocitozo inzulina. Galnon močno poveča sproščanje inzulina v normalnih Wistar in diabetičnih Goto-Kazizaki (GK) podganah. GK podgane imajo okvarjen metabolizem glukoze ter poškodovane K_{ATP}-kanalčke in Ca²⁺ kanalčke tipa L. Poleg tega imajo okvare tudi v eksocitotskem aparatu (Östenson, 2001). Mehanizem stimulacije sproščanja inzulina naj ne bi potekal preko galaninskih receptorjev, saj antagonist galaninskih receptorjev M35 ni preprečil sekrecije, ampak naj bi vključeval proteinski kinazi A in C, Ca²⁺ kanalčke tipa L, največji učinek pa naj bi galnon imel na eksocitotski celični sistem (Quynh in sod., 2004).

2.3.2.3 Vezava galnona na G-proteine

Raziskave so pokazale, da so nekateri biološki učinki galnona posledica aktivacije galaninskih receptorjev, nekaterih pa ne moremo razložiti le s tem mehanizmom. Eksperimentalno so tudi pokazali, da galnon lahko prehaja skozi fosfolipidni dvosloj. To mu omogoča neposreden dostop do G-proteinov. Z [³⁵S]GTP γ S vezavnimi ekperimenti so pokazali, da se galnon selektivno veže na G-proteine in deluje na njihovo aktivnost. Pri tem aktivira G_{oi} in inhibira G_{os} proteine, na ostale G-proteine pa ne vpliva (Florén in sod., 2005).

Pri molekularnem modeliranju vezave galnona so uporabili dva pristopa, kar je pripeljalo do dveh predlaganih vezavnih mest na podenotah α_{i1} in α_s (označeno kot mesto I in mesto II na sliki 2). Podenoti α_{i1} in α_s sta v heterotrimeru vezani na podenoto β in se po aktivaciji in disociaciji heterotrimernega G-proteina vežeta na adenilat-ciklazo.

Pri prvem pristopu so se osredotočili na lizinski aminokislinski ostanek, ki se nahaja v centralnem delu molekule galnona. Podenota β vsebuje le eno zanko, ki vsebuje lizin in se hkrati veže na podenoto α_{i1} (PDB 1GP2: Lys78B) (Wall in sod., 1995). Tudi adenilat-ciklaza vsebuje le eno zanko z lizinom, ki se hkrati veže na podenoto α_s (PDB 1CJK: Lys90B) (Tesmer in sod., 1999). Lizinski ostanek v galnonu in obeh zankah so uporabili za izhodiščno točko in galnon ročno modelirali na lizinsko zanko podenote β in adenilat- ciklaze. Tako so dobili mesto I (slika 2). V obeh primerih so s pomočjo molekularne dinamike ugotovili dobro komplementarnost, ki bi lahko omogočala nastanek kompleksa galnon : G α .

Pri drugem pristopu so določili 3D strukturo galnona in jo kvantno mehansko optimizirali. Potem so na podlagi strukturnih in kinetičnih podatkov kumarilno skupino galnona zasidrali v GTP vezavni žep podenote α . To je bilo izhodišče za nadaljnje dinamične simulacije, s katerimi so določili mesto II za potencialno vezavo galnona (slika 2) (Florén in sod., 2005).

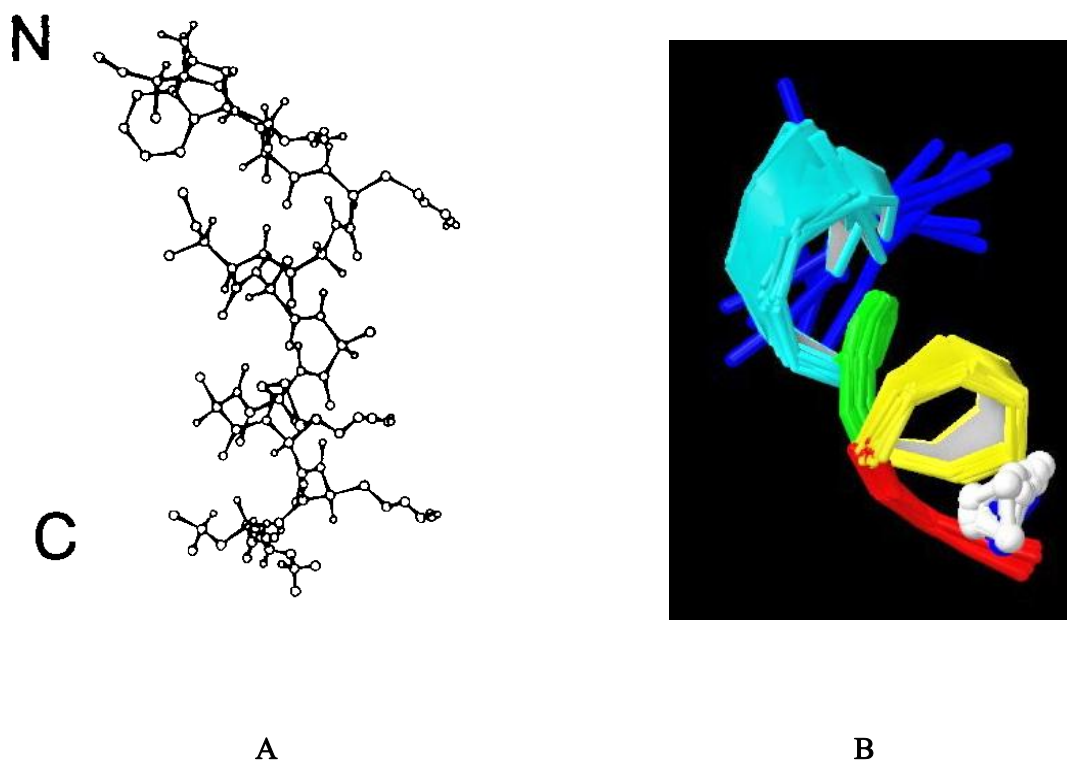
2.3.2.4 Konstruiranje peptida 1 in 2

V diplomskem delu smo poskušali preveriti predlagani mesti vezave (mesti I in II na sliki 2) galnona na podenoti α_{i1} in α_s . V ta namen smo skonstruirali dva peptida, ki oponašata lizinski zanki podenote β in adenilat-ciklaze. Pri G_{i1} -proteinih so določili možno mesto vezave galnona na podenoto α_{i1} tam, kjer se veže podenota β z zanko, ki vsebuje lizin (Florén in sod., 2005). Zanka obsega 12 aminokislinskih ostankov β verige, ki se nahajajo med 50 in 61 mestom na verigi. Aminokislinsko zaporedje zanke je: Thr-Leu-Arg-Gly-His-Leu-Ala-Lys-Ile-Tyr-Ala-Met (PDB 1GP2) (Wall in sod., 1995). To zanko smo uporabili za matrico in po njej skonstruirali peptid 1 kot linearni peptid dolg 10 aminokislinskih ostankov z zaporedjem Leu-Arg-Gly-His-Leu-Ala-Lys-Ile-Tyr-Ala. Pri G_s proteinih so določili možno mesto vezave galnona na podenoto α_s tam, kjer se veže adenilat-ciklaza z zanko, ki vsebuje lizin (Florén in sod., 2005). Zanka obsega 13 aminokislinskih ostankov, ki se nahajajo med 899 in 911 mestom na verigi. Aminokislinsko zaporedje te zanke je: Tyr-Thr-Glu-Ser-Asp-Val-Asn-Lys-Glu-Gly-Leu-Glu-Cys (PDB 1CJK) (Tesmer in sod., 1999). To zanko smo uporabili za matrico in po njej skonstruirali peptid 2 kot linearni peptid dolg 10 aminokislinskih ostankov z zaporedjem Glu-Ser-Asp-Val-Asn-Lys-Glu-Gly-Leu-Glu. V obeh primerih smo izhajali iz predpostavke, da se lizinski ostanek v galnonu veže na isto mesto kot lizinska ostanka v peptidih. Sintezo obeh peptidov (peptid 1 in peptid 2) smo nato naročili pri podjetju Calbiochem.

2.3.3 Mastoparan

Pri nekaterih naših eksperimentih smo kot kontrolno substanco oziroma kot notranji standard uporabili mastoparan, ker je njegova vezava in učinek na G-proteine G_i dobro poznan. Mastoparani so skupina sorodnih peptidov izoliranih iz osjega strupa. Močno stimulirajo sekrecijo v različnih sesalčjih celicah, med drugim tudi sekrecijo histamina iz mastocitov, serotonina iz trombocitov, kateholaminov iz kromafinskih celic in prolaktina iz hipofize (Higashijima in sod., 1988). Večino učinkov lahko blokiramo s toksinom pertusisa, ki ADP-

ribozilira G_i-proteine, jih s tem deaktivira in prepreči prenos signala v celico (Higashijima in sod., 1986; Gilman, 1987). Ta in podobna spoznanja so nakazala, da mastoparani delujejo ali na receptorje, ali neposredno na G-proteine. Nadaljnje študije so pokazale, da mastoparani obidejo receptorje, preidejo skozi celično membrano in aktivirajo G-proteine tako, da se vežejo nanje in oponašajo aktivirane receptorje. Na prehodu iz vodnega v lipidno fazo spremenijo konformacijo in iz neurejene strukture preidejo v obliko α -heliksa (Higashijima in sod., 1987; Higashijima in sod., 1984). Mastoparan-X (INWKGIAAMAKKLL-NH₂) zavzame α -helično amfilno konformacijo med aminokislinskima ostankoma 3 in 14 (Wakamatsu in sod., 1992). Veliko učinkoviteje aktivira G-proteine v prisotnosti fosfolipidov kot v vodnem okolju, kar pomeni, da je na membrane vezana α -helikalna konformacija tista, ki je biološko aktivna (Higashijima in sod., 1988; Higashijima in sod., 1990). Na membrano vezana konformacija mastoparana je podobna G-proteinskim vezavnim domenam na znotrajceličnih zankah receptorjev sklopljenih z G-proteini (Strader in sod., 1989; O'Dowd in sod., 1989; Ross, 1989). Mastoparan ima pozitiven naboj na eni strani α -heliksa podobno kot zanke z G-proteini sklopljenih receptorjev (slika 10) (Sukumar in Higashijima, 1992). Mastoparan-X (INWKGIAAMAKKLL-NH₂) zavzame podobno konformacijo ob vezavi na α_{i1} in α_o , kar namiguje na splošen mehanizem delovanja. Selektivnost vezave mastoparana na G-proteine ni tako velika kot pri receptorjih, kljub temu pa mastoparan kaže določeno stopnjo selektivnosti, saj aktivira predvsem G_i in G_o vrsti heterotrimernih G-proteinov, pri ostalih vrstah pa je učinek veliko manj izrazit. Mastoparan se veže na C-terminalni konec podenote α in posnema delovanje aktiviranih receptorjev na G-proteine. Pri višjih koncentracijah lahko naredi pore v membrani in povzroči lizo celice (Weingartner in sod., 1989; Higashijima in sod., 1990; Yayima in sod., 1997).



Slika 10: Sliki **A** in **B** prikazujeta konformacijo mastoparana-X, ko je vezan na podenoto α_{i1} . **A**: Narejeno s pomočjo protenske dvodimenzionalne TRNOE spektroskopije. (Vir: Sukumar in Higashijima, 1992). **B**: Narejeno s pomočjo heteronuklearne multidimenzionalne TRNOE spektroskopije. (Vir: Kusunoki in sod., 1998).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 CELIČNE KULTURE

Celice sf9 smo gojili na 75 cm² plastičnih posodah v 10 ml insektnega medija Grace z dodatkom 10% toplotno inaktiviranega fetalnega govejega seruma, 100 enot/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina, 0,25 µg/ml amfotericina B in 1 mM L-glutamina pri 28°C v atmosferi s 5% CO₂.

3.2 BAKULOVIRUSNI KUNSTRUKTI PODENOTE α_{i1} IN DIMERA $\beta_1\gamma_2$ G₁₁-PROTEINOV

Kot model za preučevanje aktivnosti G-proteinov smo uporabili celice ovarija metulja *Spodoptera frugiperda* (sf9), v katere smo s pomočjo bakulovirusov vnesli gen z zapisom za podenoto α_{i1} ter gen za dimer $\beta_1\gamma_2$ heterotrimernih G-proteinov in ju presežno eksprimirali.

3.3 RAZMNOŽEVANJE REKOMBINANTNIH VIRUSOV V CELICAH sf9

Bakulovirusne vektorje, ki nosijo zapis za sintezo podenote α_{i1} in podenote $\beta_1\gamma_2$ heterotrimernih G-proteinov smo razmnožili v celicah sf9. Konfluentne celice na 75 cm² plastičnih posodah smo resuspendirali v 10 ml gojišča. Suspenzijo celic smo razredčili in celice nacepili na novo plastično posodo tako, da smo dobili 60-70% konfluentnost. Počakali smo toliko časa, da so se celice pritrdile (15-30 minut). Odstranili smo gojišče in dodali 10 ml svežega gojišča. Dodali smo 100 µl visoko koncentriranih rekombinantnih virusov. Inkubirali smo pri 28°C 2-3 dni in kontrolirali znake infekcije pod svetlobnim mikroskopom (napihnjeno celic, celice okroglih oblik, počasnejša rast, večji delež mrtvih plavajočih celic). Po končani inkubaciji smo odvzeli gojišče v 15 ali 50 ml epruveto. Gojišče smo centrifugirali 10 minut pri 1000 × g. Supernatant z virusi smo shranili pri 4°C v temnem prostoru.

3.4 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH G_{i1}-PROTEINOV

Z bakulovirusnimi vektorji, ki nosijo zapis za sintezo podenote α_{i1} smo okužili celice sf9 skupaj z bakulovirusi, ki nosijo zapis za sintezo dimera $\beta_1\gamma_2$ heterotrimernih G-proteinov. Podobno kot pri razmnoževanju virusov smo konfluentne celice resuspendirali v starem gojišču, jih razredčili in nacepili na novo 75 cm² plastično posodo tako, da smo dobili 60-70% konfluentnost. Ko so se celice pritrdile, po 15-30 minutah, smo jih okužili z 1,86 ml koncentrata virusov z zapisom za podenoto α_{i1} in z 1,24 ml koncentrata virusov z zapisom za dimer $\beta_1\gamma_2$. Inkubirali smo jih 1 uro in nato dodali še 6,9 ml gojišča. Celice smo pustili rasti 65 ur in kontrolirali znake infekcije z virusi.

3.5 IZOLACIJA MEMBRAN CELIC sf9

Po končani inkubaciji smo celicam odstranili gojišče in jih dvakrat oprali v ledeno hladnem pufru TE (10,0 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA; pH = 7,5). Celice smo postrgali, jim dodali 5-kratni volumen ledeno hladnega pufra TE in jih homogenizirali v homogenizerju Polytron (BRAUN AG). Teflonski bat smo vrteli pri 800-1000 min⁻¹ s 30 pasažami. Dobljeni homogenat smo centrifugirali 20 minut pri 4000 × g in 4°C. Oborino smo zavrgli, supernatant pa smo ponovno centrifugirali 1 uro pri 40.000 × g in 4°C. Po končanem centrifugiranju smo membrane v oborini resuspendirali v minimalni količini ledeno hladnega pufra TE in izmerili koncentracijo proteinov po Bradfordu. Suspenzijo plazemskih membran smo razredčili do končne koncentracije 2 mg/ml, jih razdelili na 100 μ l deleže in jih zamrznili na -70°C. Vse izolacijske postopke smo izvajali na ledu.

3.6 IZOLACIJA KORTEKSA IZ PODGANJIH MOŽGANOV

Žrtvovano podgano smo dekapitirali. Možgane smo izolirali, jih prenesli na ohlajen podstavek in jim odstranili prednji reženj. Preostanek smo prečno narezali na tanke kolobarje in ločili korteks, ga dali v plastično posodico in zamrznili v tekočem dušiku za čas transporta.

3.7 IZOLACIJA MEMBRAN IZ KORTEKSA PODGANJIH MOŽGANOV

Korteks smo vzeli iz tekočega dušika, mu dodali 5-kratni volumen ledeno hladnega TE pufra. Nadaljna izolacija membran je potekala po zgoraj opisanem postopku izolacije membran celic sf9 (odstavek 3.5).

3.8 DOLOČANJE ZAČETNE HITROSTI VEZAVE [³⁵S]GTP γ S NA G-PROTEINE V MEMBRANAH CELIC sf9 IN MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV

Hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine smo določevali radiometrično po protokolu (McKenzie 1992) z manjšimi spremembami (Bavec in sod., 2003). Suspenzijo membran smo razredčili v pufri TE (10,0 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA; pH = 7,5) do končne delovne koncentracije 500 mg/ml. Reakcijski volumen je bil 100 μ l. Membranam smo dodali 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM ditionitrol (DTT), 1 μ M GDP in 0,5 nM [³⁵S]GTP γ S (približno 70.000 cpm). Vzorce smo inkubirali na vodni kopeli pri 12°C in različnih časovnih intervalih 1, 2, 3, 5, 10, 20 in 30 minut. Vezavo smo ustavili z razredčenjem inkubacijske zmesi in s hitrim filtriranjem skozi filtre premera 1,6 μ m (Sigma milipor F/GF tip 1) pod vakuumom in spirali s 3-krat po 5 ml ledeno hladnega pufra TE. Radioaktivne snovi na filterih smo ekstrahirali iz filtra v scintilacijski tekočini Emulsier-Safe preko noči in izmerili radioaktivnost s scintilacijskim števcem LKB 1214 Rackbeta. Enotočkovne meritve začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine v membranah smo izmerili po 3 minutni inkubaciji membran pri 12 °C z [³⁵S]GTP γ S v prisotnosti ali odsotnosti galnona in/ali mastoparana in/ali peptidov 1 in 2.

3.9 ANALIZA IZRAŽANJA REKOMBINANTNIH α_{i1} IN $\beta_{1\gamma_2}$ Z ELEKTROFOREZO PAGE-SDS, PRENOS NA NITROCELULOZNO MEMBRANO IN DETEKCIJA S PROTITELESI

Membrane z rekombinantnimi G_i proteini smo pripravili tako, da smo naredili kotransfekcijo celic sf9 z vektorji baculovirusi, ki nosijo genski zapis za podenoto α_{i1} , skupaj z baculovirusi, ki nosijo genski zapis za dimer $\beta_{1\gamma_2}$. Raven izražanja α_{i1} in $\beta_{1\gamma_2}$ smo kontrolirali z elektroforezo na poliakrilamidu in natrijevem dodecilsulfatu (elektroforeza SDS-PAGE) ter s prenosom proteinov na membrano in uporabo specifičnih protiteles proti podenoti α_{i1} in proti podenoti β . Na 11% gel za elektroforezo SDS-PAGE dolžine 16 cm smo nanесли vzorce, ki smo jih pripravili tako, da smo 50 μ g proteinov dopolnili do volumna 100 μ l s pufrom Laemmli (2-krat koncentriran; 0,125 M Tris-HCl, pH = 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 1,25 M β -merkaptotanol, 0,002% pironin). Vzorce smo pred nanosom na gel denaturirali s 5 minutnim kuhanjem v vreli vodi pri 100°C. Proteine smo v gelu za kopičenje (ang. Stacking gel) ločevali pri toku 30 mA, v gelu za ločitev (ang. Running gel) pa pri 45 mA. Tok je tekel 3-4 ure v pufu za elektroforezo (30 g Tris-HCl, 144 g glicin, 10 g SDS, 1 l H₂O; pH=8,3). Puffer za elektroforezo smo hladili z vodno črpalko pri 11°C. Po ločitvi smo proteine na gelu obarvali z barvilom Coomassie modro (50% metanol, 10% očetna kislina, 500 mg coomassie modro), gel pa nato razbarvali z raztopino za razbarvanje (10% očetna kislina, 30% metanol) ali pa smo po ločitvi proteine prenesli iz gela na nitrocelulozno membrano preko noči pri toku 400 mA v hlajenem pufu za prenos (33 g Tris-HCl, 14,4 g glicin, 1 g SDS, 1 l H₂O).

Po prenosu na membrano smo proteine obarvali z raztopino za barvanje (0,2% Ponceau S v 5% očetni kislini) in razbarvali ozadje s 3-kratnim spiranjem v 5% očetni kislini. Membrano smo inkubirali 1 uro v 5% nizkomaščobnem mleku (nizkomaščobno mleko v prahu Pomurske mlekarne) v pufu TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl; pH = 7,5). Po 1 uri smo zgornji puffer zamenjali s pufom TTBS (0,05% Tween 20 v TBS), v katerega smo dodali primarna poliklonska zajčja protitelesa IgG proti α_{i1} (I-20 Santa Cruz, 1:1000) ali proti β (T-20 Santa Cruz, 1:1000) tako, da smo jih razredčili 1000 krat in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Po

inkubaciji smo prebitna protitelesa spirali 3-krat po 10 minut s 5% nizkomaščobnim mlekom v pufru TTBS. Po spiranju smo membrani dodali sekundarna poliklonska protizajčja protitelesa IgG konjugirana s peroksidazo (Calbiochem, 1:1000) tako, da smo jih razredčili 1000 krat v 5% nizkomaščobnem mleku v pufru TTBS in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo prebitna protitelesa spirali 3-krat po 10 minut s 5% nizkomaščobnim mlekom v pufru TTBS. Na koncu smo membrano 1-krat sprali v pufru TBS.

Protitelesa smo iz nitrocelulozne membrane odstranili tako, da smo jo najprej oprali v pufru TBS, nato pa 30-45 minut inkubirali v spiralnem pufru (2% SDS, 100 μ M merkaptotanol, 2,5 mM Tris-HCl; pH = 6,8) pri temperaturi 50°C. Po inkubaciji smo membrano spirali 2-krat po 10 minut v pufru TTBS in 1-krat po 10 minut v pufru TBS. Sledila je 1 urna inkubacija v 5% nizkomaščobnem mleku v pufru TBS.

Za detekcijo proteinov na nitrocelulozni membrani smo uporabili ECL detekcijski sistem (Amersham Pharmacia Biotech, RPN 2106). Reagent smo zmešali v razmerju 1:1 in v njem inkubirali membrano 1 minuto pri sobni temperaturi. V temni sobi smo fotografski film (Kodak, x-omat AR) osvetlili različno dolgo (15 sekund do 15 minut) z nitrocelulozno membrano in ga razvili v razvijalcu (Ilford Universal PQ, 1:10), nato smo ga 4 minute fiksirali (Ilford rapid, 1:5), spirali z vodo 5 minut ter ga posušili na zraku. Po zgoraj opisanem postopku smo preverili prisotnost α_{i1} in β podenote v membranah celic sf9 in membranah iz korteksa podganjih možganov.

3.10 SINTEZA GALNONA IN PEPTIDOV

Galnon je bil sintetiziran v skladu s strategijo t-BOC ali Fmoc na trdem nosilcu (Langel in sod., 1992) po shemi, ki so jo opisali (Saar in sod., 2002) v laboratoriju prof. Langla, Univerza v Stockholmu, Švedska. Čistost produkta je bila analizirana s HPCL na analitični koloni Nucleosil 120-3 C18 RP-HPCL (0.4 \times 10 cm). Molekulska masa galnona je bila določena z masno spektrometrijo (MALDI-TOF Mass Spectrometer analysis, Applied Biosystems, Foster

City, CA); dobljena vrednost in teoretično izračunana vrednost sta bili identični. Peptida 1 in 2 (glej 2.3.2.4) so nam sintetizirali pri podjetju Calbiochem.

3.11 KINETIČNE ŠTUDIJE

Enofazna eksponentna vezavna krivulja

Merili smo časovni potek hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v membranah sf9 in podganjega korteksa. Krivulja skozi eksperimentalne točke je ustrezala enačbi za enofazno eksponentno vezavno krivuljo (enačba 1).

$$Y = Y_{\max} (1 - e^{-kt}) \quad \dots(1)$$

Legenda:

Y = količina vezanega [³⁵S]GTPγS

Y_{max} = maksimalna količina vezanega [³⁵S]GTPγS

k = hitrostna konstanta prvega reda

t = čas

Iz tako dobljenih krivulj smo določili največji čas še približno linearne odvisnosti hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine in ta čas (3 min) uporabili kot inkubacijski čas pri eksperimentih za konstrukcijo krivulje enofazne dozne odvisnosti.

Krivulja enofazne dozne odvisnosti ali "dose response" krivulja

Zasledovali smo začetno hitrost vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v membranah celic sf9 in membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije galnona, peptida 1 in peptida 2. Koncentracije ligandov so bile med 10⁻⁷ M in 10⁻⁴ M. Pri nekaterih poskusih smo radioaktivni [³⁵S]GTPγS izpodrivali z naraščajočo koncentracijo 'hladnega' [³²S]GTPγS.

Eksperimentalno dobljenim točkam smo z nelinearno regresijo prilagodili krivuljo enofazne dozne odvisnosti ("dose response curve"), (enačba 2).

$$Y = A + (B-A)/(1+10^{(\log EC_{50} - x)n_H}) \quad \dots(2)$$

Legenda:

Y = začetna hitrost vezave [³⁵S]GTPγS

X = log koncentracije liganda

EC₅₀ = koncentracija liganda, pri kateri je začetna hitrost vezave [³⁵S]GTPγS enaka polovici maksimalne (B)

A = spodnja meja vrednosti Y

B = zgornja meja vrednosti Y

n_H = Hillov koeficient

3.12 GRAFIČNI PRIKAZ IN OBDELAVA PODATKOV

Programski paket GraphPad Prism verzija 4.0 (GraphPad ZDA) smo uporabili za vse izračune, za prilagajanje krivulj eksperimentalnim podatkom po metodi nelinearne regresije, kot tudi za grafični prikaz rezultatov.

3.13 MATERIALI

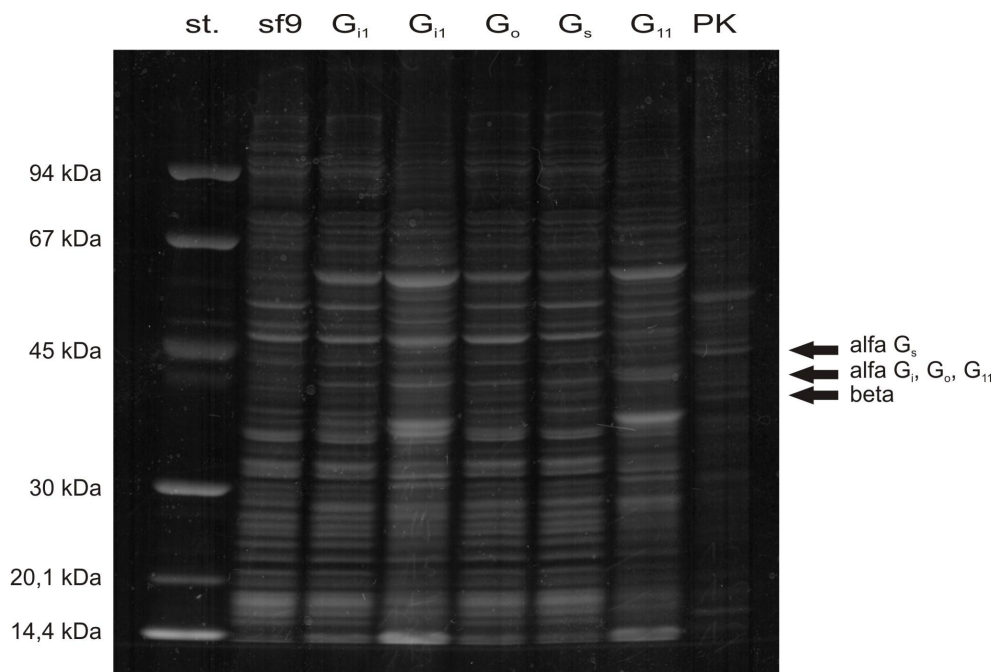
Uporabljene kemikalije so bile kvalitete p.a. Celične linije sf9 smo kupili pri podjetju ECACC (Anglja). Bakulovirusni vektorji, ki nosijo zapis za sintezo podenote α_{1i} in β_{1γ2} so bili dar prof. Tatsuye Hage (Univerza v Tokiu, Japonska). Podganji možgani, iz katerih smo izolirali membrane možganskega korteksa so bile dar doc. Gorazda Drevenška iz Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Insektni medij Grace in toplotno inaktivirani fetalni goveji serum smo kupili pri podjetju Gibco (Anglija). ECL detekcijski sistem, izotop [³⁵S]GTPγS in SDS proteinske standarde (LMW)

smo kupili pri podjetju Amersham Pharmacia Biotech (Anglija). Galnon je bil dar prof. Langla iz Univerze v Stockholmu. Peptidi so bili sintetizirani pri podjetju Calbiochem (Švica). Tris-HCl in metanol smo kupili pri podjetju Merck (Nemčija). Reagente za elektroforezo, SDS, akrilamid/bis-akrilamid, β -merkaptoetanol, HEPES, APS in goveji serumski albumin smo kupili pri podjetju Sigma Aldrich Co. (Nemčija). MgCl₂, NaCl in EDTA smo kupili pri podjetju Kemika (Hrvaška). Primarna poliklonska zajčja protitelesa IgG proti α_{i1} in proti β so bila kupljena pri podjetju Santa Cruz Biotechnology (ZDA). Sekundarna poliklonska protizajčja protitelesa IgG konjugirana s peroksidazo smo kupili podjetju Calbiochem (ZDA). Scintilacijsko tekočino Emulsier-Safe smo kupili pri podjetju Packard (Nizozemska). Nitrocelulozne membrane Protran smo kupili pri podjetju Schleicher and Schuell (Nemčija). Sistem za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu pa smo kupili pri podjetju BioRad (ZDA).

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA IZRAŽANJA G_i-PROTEINOV S POMOČJO SDS-PAGE ELEKTROFOREZE TER IMUNODETEKCIJE NA NITROCELULOZNI MEMBRANI

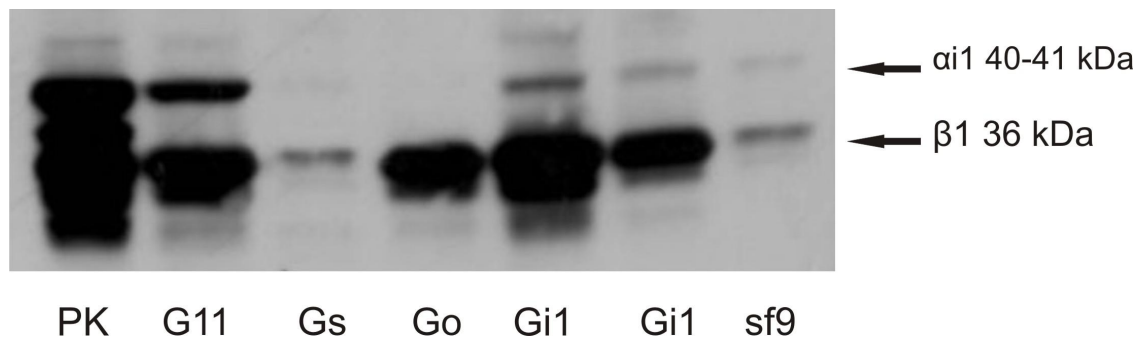
Po kotransfekciji celic sf9 z bakulovirusnimi vektorji, ki nosijo genski zapis za podenoto α_{i1} in dimer $\beta_1\gamma_2$, smo uspešnost kotransfekcije in izražanje G_{i1}-proteinov preverili s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze. Istočasno smo na enak način preverili še prisotnost G_{i1}-proteinov v membranah iz korteksa podganjih možganov. Po končani ločitvi proteinov na gelu smo le te obarvali s comassi modrim. Dobili smo rezultat prikazan na sliki 11.



Slika 11: Analiza izražanja α_{i1} in β_1 podenote rekombinantnih heterotrimernih G_{i1}-proteinov v membranah celic sf9 ter podenot heterotrimernih G_{i1}-proteinov v membranah iz korteksa podganjih možganov s SDS-PAGE elektroforezo. Stolpci od leve na desno so: standard (st), neobogatene membrane sf9 (sf9), z G α_{i1} in $\beta_1\gamma_2$ obogatene membrane sf9 (Gi1, dva stolpca), z G α_o in $\beta_1\gamma_2$ obogatene membrane sf9, z G α_s in $\beta_1\gamma_2$ obogatene membrane sf9, z G α_{i1} in $\beta_1\gamma_2$ obogatene membrane sf9 in membrane iz podganjega korteksa (PK).

Na podlagi teh rezultatov nismo dobili zadovoljivih odgovorov saj je bilo število pasov zelo veliko in zato nismo videli ali je prišlo do izražanja podenot ali ne. Puščice na sliki označujejo hipotetična mesta posameznih podenot.

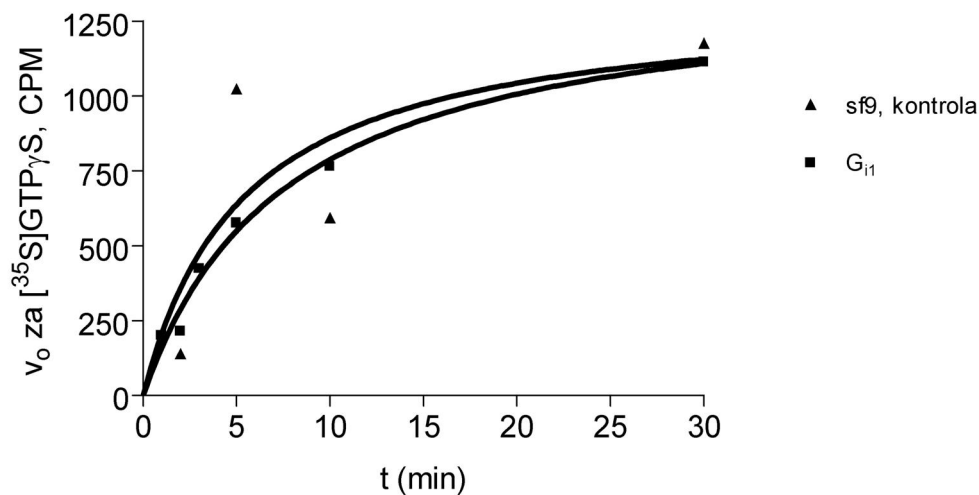
Natančneje smo določili pasove s pomočjo imunodetekcije na nitrocelulozni membrani. Po prenosu proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano smo s poliklonskimi zajčjimi protitelesi IgG označili podenoti α_{i1} (I-20 Santa Cruz) in β (T-20 Santa Cruz). S pomočjo te metode smo nedvoumno potrdili ali ovrgli prisotnost podenot α_{i1} in β v membranah celic sf9 in membranah iz korteksa podganjih možganov. Rezultati so prikazani na sliki 12.



Slika 12: Analiza izražanja α_{i1} in β_1 podenote rekombinantnih heterotrimernih G_{i1}-proteinov v membranah celic sf9 ter podenot heterotrimernih G_{i1}-proteinov v membranah iz korteksa podganjih možganov z metodo prenosa proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano in detekcijo s specifičnimi protitelesi. Stolpci od leve na desno so: membrane iz podganjega korteksa (PK), z G α_{i1} in $\beta_{1\gamma_2}$ obogatene membrane sf9, z G α_s in $\beta_{1\gamma_2}$ obogatene membrane sf9, z G α_o in $\beta_{1\gamma_2}$ obogatene membrane sf9, z G α_{i1} in $\beta_{1\gamma_2}$ obogatene membrane sf9, z G α_{i1} in $\beta_{1\gamma_2}$ obogatene membrane sf9 (Gi1, dva stolpca) in neobogatene membrane sf9 (sf9).

4.2 ČASOVNI POTEK VEZAVE $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ NA REKOMBINANTNE HETEROTRIMERNE G_{i1} -PROTEINE V MEMBRANAH CELIC sf9

Merili smo časovno odvisnost količine vezanega $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ v membranah celic sf9, obogatenih s podenoto α_{i1} in dimerom $\beta_1\gamma_2$. Za kontrolo smo vzeli membrane celic sf9, ki niso bile obogatene s podenoto α_{i1} in dimerom $\beta_1\gamma_2$. Krivulje skozi eksperimentalne točke najbolj ustrezajo enačbi za enofazno eksponentno vezavno funkcijo (enačba 1). Naklon krivulj je v začetnem delu približno enak. To pomeni, da je začetna hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ enaka pri kontrolnih in obogatenih membranah G_{i1} . To se sklada z rezultati prikazanimi na slikah 11 in 12.

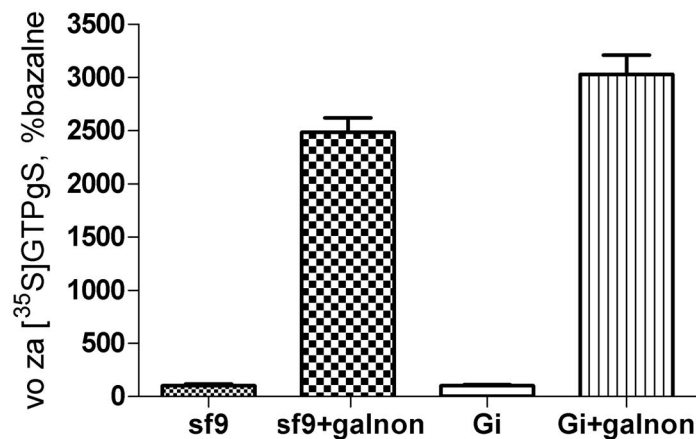


Slika 13: Časovni potek vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na rekombinantne heterotrimerne G_{i1} -proteine v membranah celic sf9. ▲ membrane neobogatenih celic sf9, kontrola, ■ membrane celic sf9 obogatene z G_{i1} proteini

4.3 ANALIZA AKTIVNOSTI REKOMBINANTNIH HETEROTRIMERNIH G_{i1} -PROTEINOV V MEMBRANAH CELI sf9 OB PRISOTNOSTI GALNONA

Aktivnost G-proteinov smo merili z metodo določanja začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine v prisotnosti 10^{-4}M koncentracije galnona in vrednosti izrazili v odstotkih bazalne

aktivnosti (začetna hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v odsotnosti galnona) (slika 14). Rezultati kažejo na zelo velik dvig aktivnosti G-proteinov pri neobogatenih (za 2500%) in obogatenih (za več kot 3000%) membranah. Razlika med stopnjo aktivacije G-proteinov iz neobogatenih ter obogatenih membran pa statistično ni značilna. Ta rezultat je tudi v skladu z rezultati prikazanimi na slikah 11, 12 in 13.

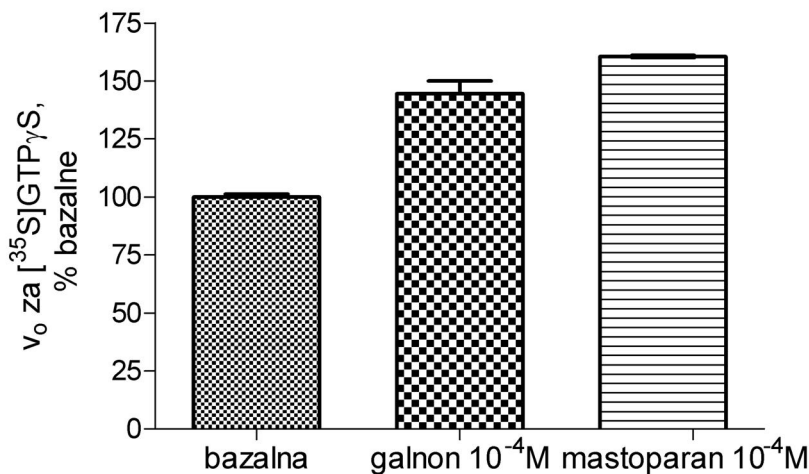


Slika 14: Začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v membranah celi sf9 v prisotnosti 10⁻⁴ M koncentracije galnona, izražene v odstotkih bazalne aktivnosti (brez galnona). Bazalna aktivnost je 100%. **Sf9** = neobogatene membrane celic sf9, kontrola. **Gi** = z rekombinantnimi heterotrimernimi G_{i1} proteini obogatene celice sf9.

4.4 ANALIZA AKTIVNOSTI HETEROTRIMERNIH G-PROTEINOV V MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV OB PRISOTNOSTI GALNONA TER MASTOPARANA

Aktivnost G-proteinov smo merili z metodo določanja začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v prisotnosti galnona ter mastoparana in jo izrazili v odstotkih bazalne aktivnosti (začetna hitrost vezave [³⁵S]GTPγS na G-proteine v odsotnosti galnona in mastoparana) (slika 15). Aktivnost membran se je v prisotnosti 10⁻⁴M galnona povečala na približno 150% bazalne aktivnosti. Mastoparan koncentracije 10⁻⁴M je aktiviral membrane na približno 160% bazalne

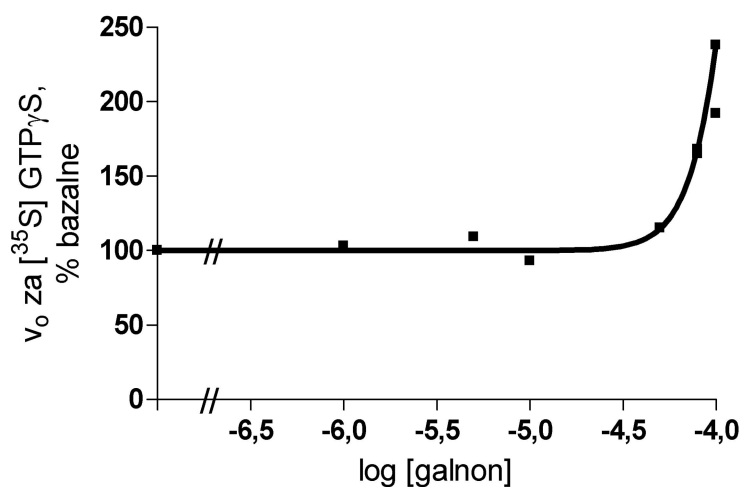
aktivnosti. Ti rezultati se lepo skladajo s podatki iz literature (Florén in sod., 2005; Zorko in sod., 1997).



Slika 15: Začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na heterotrimerni G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v prisotnosti 10^{-4}M koncentracije galnolona in mastoparana, izražene v odstotkih bazalne vrednosti. Bazalna vrednost je 100%.

4.5 ANALIZA AKTIVNOSTI HETEROTRIMERNIH G-PROTEINOV V MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE GALNOLONA

Aktivnost G-proteinov smo merili z metodo določanja začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine v prisotnosti različnih koncentracij galnolona in jo izrazili v odstotkih bazalne aktivnosti. Eksperimentalnim točkam smo prilagodili krivuljo enofazne dozne odvisnosti (dose response) (enačba 2). Koncentracije galnolona so se gibale v razponu od 10^{-7}M do 10^{-4}M . Krivulja aktivacije se začne dvigati približno pri 10^{-5}M koncentraciji galnolona. Od te koncentracije dalje je naklon krivulje zelo strm, kar kaže na kooperativno vezavo galnolona – Hillov koeficient je 5,3. Pri 10^{-4}M koncentraciji galnolona se aktivnost membran zviša za približno 200% (slika 16). Dobljeni rezultat se zelo dobro sklada s podatki iz literature (Florén in sod., 2005).



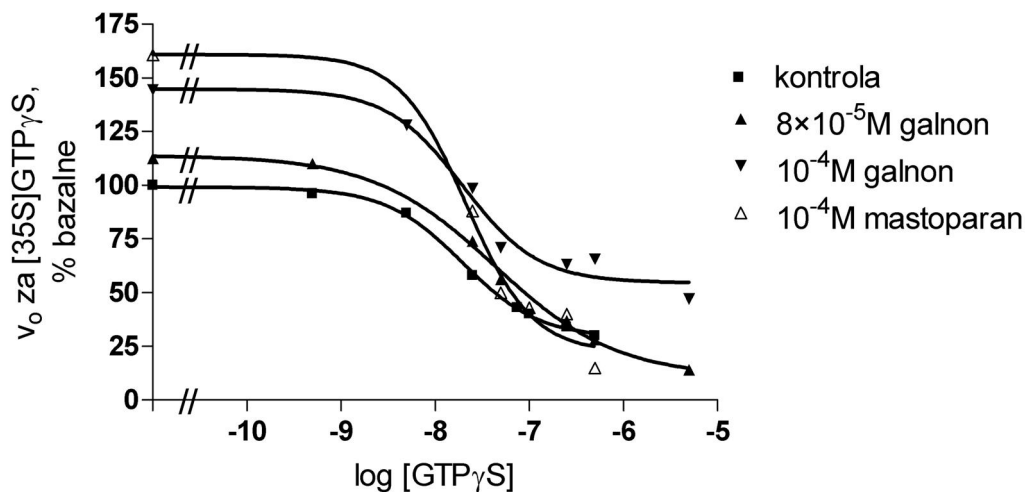
Slika 16: Začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP_γS na heterotrimernega G-proteina v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije galnona, izražene v odstotkih bazalne aktivnosti. Bazalna aktivnost je 100%.

4.6 ANALIZA MESTA VEZAVE GALNONA NA PODENOTO ALFA HETEROTRIMERNIH G-PROTEINOV V MEMBRANAH IZ KORTEKSOV PODGANJIH MOŽGANOV

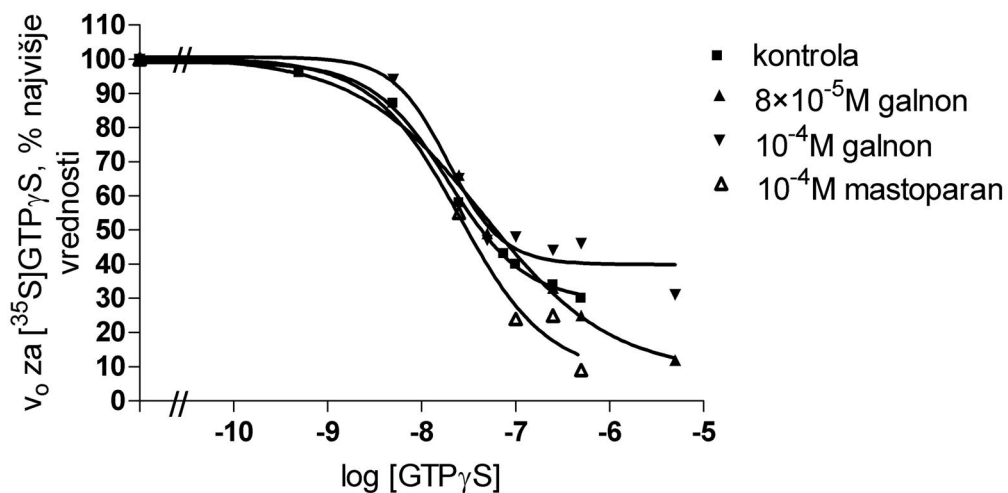
4.6.1 Izpodrivanje radioaktivnega [³⁵S]GTP_γS s "hladnim" [³²S]GTP_γS v membranah iz korteksov podganjih možganov v prisotnosti galnona in mastoparana

Določili smo krivulje izpodrivanja [³⁵S]GTP_γS z [³²S]GTP_γS ob prisotnosti različnih koncentracij galnona in mastoparana. Eksperimentalne točke smo dobili z merjenjem začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP_γS na G-proteine in jih predstavili na dva načina. Prvič smo jih izrazili v odstotkih bazalne aktivnosti, pri čemer smo vrednosti bazalne aktivnosti vzeli kot 100% (slika 17). Drugič pa smo pri vsaki krivulji največjo vrednost začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP_γS upoštevali kot 100% in ostale točke v krivuljah izrazili v ustreznih odstotkih. Na ta način smo skušali krivulje normirati, da bi jih lahko med seboj bolj nazorno primerjali (slika

18). Tako dobljenim točkam smo za vse eksperimentalne sete podatkov priredili krivuljo enofazne dozne odvisnosti (glej 3.11, enačbo 2)



Slika 17: Začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in ob prisotnosti različnih koncentracij galnona in mastoparana. Vrednosti so izražene v odstotkih bazalne aktivnosti. Bazalna aktivnost 100%.



Slika 18: Začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in ob prisotnosti različnih koncentracij galnona in mastoparana. Vrednosti so

izražene v odstotkih največje vrednosti in normirane na enako osnovo. Največjo vrednost začetne hitrosti vezave pri vsaki od krivulj (ko še ni bil dodan "hladni" GTP γ S) smo vzeli za 100%.

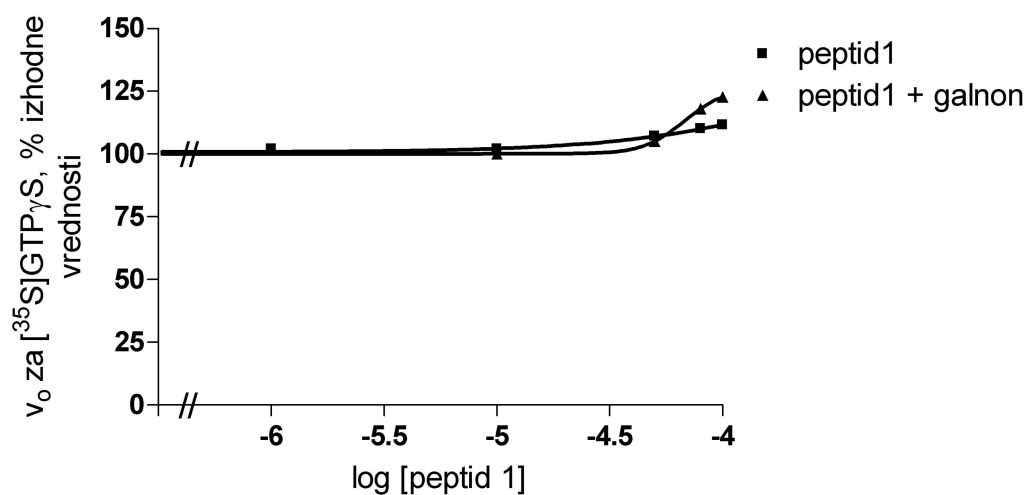
Iz slik 17 in 18 je razvidno, da "hladni" GTP γ S lahko popolnoma izpodrine radioaktivni [³⁵S]GTP γ S pri vezavi na G-proteine v vseh primerih, razen v prisotnosti večjih koncentracij galnona (10⁻⁴M).

4.6.2 Analiza aktivnosti heterotrimernih G-proteinov v membranah iz korteksov podganjih možganov ob prisotnosti peptida 1 ali 2

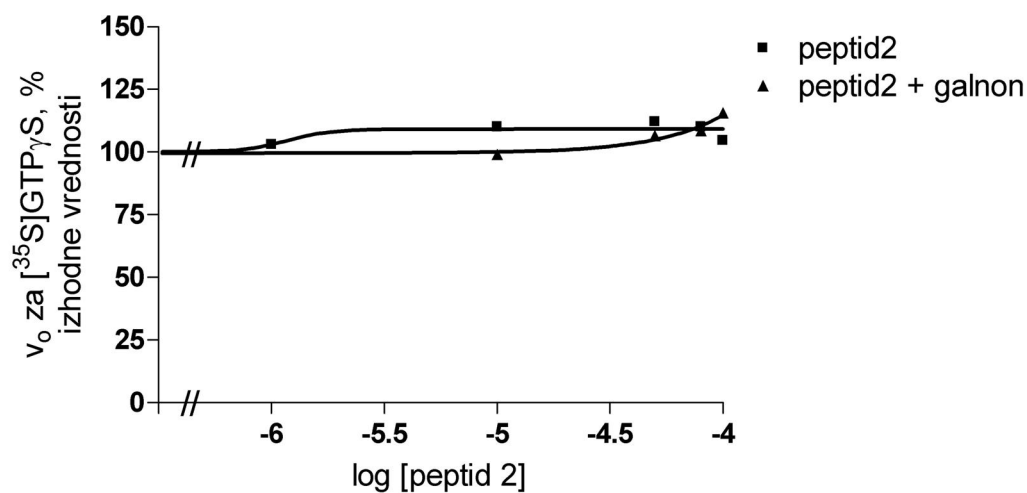
Aktivnost G-proteinov smo merili z metodo določanja začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine v odvisnosti od koncentracije peptida 1 ali 2 in prisotnosti 10⁻⁴M koncentracije galnona, ter jo izrazili v odstotkih bazalne aktivnosti (krivulja dozne odvisnosti peptida 1 ali 2 brez prisotnosti galnona). Eksperimentalnim točkam smo prilagodili krivuljo enofazne dozne odvisnosti (enačba 2). Koncentracije peptidov 1 in 2 so se gibale v razponu od 10⁻⁶M do 10⁻⁴M (slika 19 in 20).

Ob dodatku peptida 1 se je krivulja aktivnosti z naraščanjem koncentracije peptida proti 10⁻⁴M dvignila na 110%. Ob dodatku peptida 1 in galnona se je krivulja aktivnosti z naraščanjem koncentracije peptida dvignila na 117% (slika 19). To kaže, da peptid 1 ne vpliva na aktivnost G-proteinov, pa tudi ne izpodrine galnona z njegovega vezavnega mesta na G-proteinu, saj se učinek galnona ne zmanjša.

Ob dodatku peptida 2 se je krivulja aktivnosti z naraščanjem koncentracije peptida proti 10⁻⁴M dvignila na 107%. Ob dodatku peptida 2 in galnona se je krivulja aktivnosti z naraščanjem koncentracije peptida dvignila na 107% (slika 20). Tako kot v primeru peptida 1 tudi peptid 2 ni vplival na aktivnost G-proteinov in tudi ni izpodrinil galnona z njegovega vezavnega mesta.



Slika 19: Začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije peptida 1 v odsotnosti (■) in ob prisotnosti 10^{-4}M koncentracije galnona (▲). Začetno hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ pred dodatkom peptida 1 smo vzeli za 100%.



Slika 20: Začetne hitrosti vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ na G-proteine v membranah iz korteksa podganjih možganov v odvisnosti od koncentracije peptida 2 v odsotnosti (■) in ob prisotnosti 10^{-4}M koncentracije galnona (▲). Začetno hitrost vezave $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ pred dodatkom peptida 2 smo vzeli za 100%.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V nalogi smo želeli opredeliti mesta vezave galnona na podenoto α heterotrimernih G-proteinov tipa G_{i1} (glej uvod). Za raziskovanje smo potrebovali čim čistejši sistem s heterotrimernimi G_{i1}-proteini. Odločili smo se, da bomo v ta namen uporabili sf9 celice, ki jih bomo obogatili z G_{i1} proteini s pomočjo bakulovirusnih vektorjev, ki nosijo genski zapis za podenoto α_{i1} in dimer $\beta_1\gamma_2$. Prisotnost podenote α_{i1} in dimera $\beta_1\gamma_2$ v obogatenih membranah celic sf9 smo testirali s pomočjo specifičnih protiteles (glej odstavek 3.9 in 4.1). Iz rezultatov smo videli, da se je dobro izrazil dimer $\beta_1\gamma_2$. Podenota α_{i1} se je izrazila mnogo slabše, a vendar je bilo opaziti majhno razliko v primerjavi s kontrolnimi celicami sf9 (glej sliko 12). Funkcionalno aktivnost obogatenih membran sf9 smo testirali z določitvijo začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine v plazemskih membranah obogatenih celic sf9 in jo primerjali z začetno hitrostjo vezave v plazemskih membranah kontrolnih celic sf9 (glej sliko 13). Predvidevali smo, da bo začetna hitrost vezave večja pri obogatenih membranah v primerjavi s kontrolnimi. Predvidenega rezultata nismo dobili. Začetni hitrosti vezave sta bili približno enaki. Z našo metodo smo merili količino vezanega [³⁵S]GTP γ S. Ta se veže na podenoto α_{i1} le kadar je ta disociirana od dimera $\beta_1\gamma_2$. Če sta se v obogatenih celicah podenota α_{i1} in dimer $\beta_1\gamma_2$ izrazila v takem razmerju, da je večina α_{i1} podenot vezanih na dimer $\beta_1\gamma_2$ (v primeru prebitka dimera $\beta_1\gamma_2$ nad podenoto α_{i1} , kar bi se skladalo s sliko 12), potem bi lahko dobili takšen rezultat kot je na sliki 13. V nasprotnem primeru bi rezultat s slike 13 pomenil, da se podenota α_{i1} ni dovolj izrazila.

Da bi razrešili dilemo smo testirali aktivnost obogatenih membran z merjenjem začetne hitrosti vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine v prisotnosti galnona in jo primerjali z bazalno aktivnostjo. Iz prejšnjih študij je razvidno, da 10⁻⁴M koncentracija galnona aktivira G_{i1} proteine za približno 170% (Florén in sod. 2005). Naši rezultati (slika 14) so pokazali nepričakovano veliko aktivacijo obogatenih membran ob prisotnosti 10⁻⁴M galnona. Druga težava je bila, da smo dobili enak rezultat tudi pri kontrolnih (neobogatenih) membranah. Iz tega smo sklepali, da presežna ekspresija podenote α_{i1} ni bila uspešna, rezultat pa

pojasnjujemo predvsem z nespecifično vezavo [^{35}S]GTP γ S. Ker težav s presežno ekspresijo $G_{\alpha_{i1}}$ v celicah sf9 nismo uspeli rešiti, smo se odločili, da bomo poskuse nadaljevali na membranah iz korteksa podganjih možganov. S tem smo se zavestno odločili za delo na slabšem sistemu, saj te membrane poleg heterotrimernih G_{i1} proteinov vsebujejo še veliko ostalih vrst G-proteinov. Zavedali smo se, da bo interpretacija rezultatov na takem sistemu težja, vendar za delo z galnonom ne nemogoča. V prejšnjih študijah so namreč pokazali, da galnon vpliva le na aktivnost heterotrimernih proteinov tipa G_{i1} in G_s , pri čemer znatno aktivira G_{i1} in le malo inhibira G_s proteine (Florén in sod. 2005). Učinek na G_{i1} proteine je pri naših delovnih koncentracijah (1×10^{-5} - 1×10^{-4} M) mnogo večji, kot na G_s zato lahko predpostavimo, da ga preglasi. Vsa naša nadaljna sklepanja so temeljila na postavki, da delamo s sistemom, v katerem se bodo praktično pokazali le učinki ligandov na heterotrimernih proteinih tipa G_{i1} . Od tega načela smo odstopili le, ko smo delali s peptidom 2, kjer smo preiskovali morebitno mesto vezave galnona na G_s -proteine.

Izolirane membrane iz korteksa podganjih možganov smo morali najprej funkcionalno okarakterizirati. V ta namen smo uporabili ligand mastoparan. Mehanizem delovanja mastoparana na G_{i1} -proteine je bil preučen v prejšnjih raziskavah (glej odstavek 2.3.3). Mastoparan se veže na podenoto α_{i1} na njenem C-terminalnem delu (Weingartner in sod., 1989; Higashijima in sod., 1990; Yayima in sod., 1997). Mesto vezave je izven žepa v katerem se vežeta [^{35}S]GTP γ S in GTP γ S. Učinek mastoparana je torej alosteričen. Zato smo določili krivuljo izpodrivanja [^{35}S]GTP γ S z GTP γ S ob prisotnosti mastoparana (sliki 17 in 18). Iz krivulje smo videli, da mastoparan aktivira membrane skladno s pričakovanji in tako potrdili delovanje membran, obliko krivulje izpodrivanja pa smo uporabili v nadaljevanju, ko smo jo primerjali s krivuljami izpodrivanja ob prisotnosti galnona.

Preden smo začeli uporabljati galnon smo preverili ali deluje in aktivira membrane skladno s pričakovanji. Naredili smo analizo aktivnosti heterotrimernih G_{i1} -proteinov v prisotnosti različnih koncentracij galnona (slika 16). Krivulja nam je povedala ali galnon deluje in pri katerih koncentracijah. Galnon je membrane aktiviral predvidljivo. Oblika krivulje namiguje

na možnost kooperativne vezave, saj se ta dvigne zelo strmo (Hillov koeficient je 5,3) v koncentracijskem območju galnona med $5 \times 10^{-5} \text{M}$ in 10^{-4}M . To pa pomeni, da se galnon morda lahko veže na večih mestih na podenoto α_{i1} . Nato smo naredili krivulje izpodrivanja $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ s 'hladnim' $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ob prisotnosti dveh različnih koncentracij galnona (sliki 17 in 18).

Zdaj smo imeli tri krivulje izpodrivanja $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ z $\text{GTP}\gamma\text{S}$, eno ob prisotnosti mastoparana in dve ob prisotnosti galnona, vse tri pa smo nato primerjali s krivuljo izpodrivanja $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ z $\text{GTP}\gamma\text{S}$ brez dodanih ligandov. Zanimalo nas je, kam na podenoto α_{i1} se veže galnon. Obstajale so tri možnosti. Prva, da se veže točno na isto mesto kot se vežeta $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Druga, da se veže v žep, kamor se vežeta tudi $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in $\text{GTP}\gamma\text{S}$, vendar ne na isto mesto, ampak nekje blizu in tako ustvari novo površino znotraj žepa, kamor se lažje veže $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Tretja, da se veže nekje zunaj žepa, v katerega se vežeta $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in $\text{GTP}\gamma\text{S}$. Prvo možnost smo izključili že, ko smo testirali aktivnost G-proteinov v odvisnosti od koncentracije galnona. Če bi držala prva možnost, bi aktivnost G-proteinov z večanjem koncentracije galnona padala, česar pa naši rezultati niso potrdili (slika 16). $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in galnon bi tekmovala za isto mesto, zato bi galnon ob višjih koncentracijah bolj izpodrival $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in tako zmanjševal hitrost njegove vezave na G-proteine. Drugo in tretjo možnost smo preverili s primerjanjem krivulj izpodrivanja $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ z $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ob prisotnosti mastoparana oziroma galnona. Najprej smo naredili krivuljo izpodrivanja $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ z $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ob prisotnosti mastoparana, za katerega smo vedeli, da se veže na podenoto α_{i1} izven žepa ki veže $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in $\text{GTP}\gamma\text{S}$, in krivuljo izpodrivanja $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ z $\text{GTP}\gamma\text{S}$ brez prisotnosti ligandov. S primerjanjem teh dveh krivulj smo videli, da mastoparan dvigne krivuljo na višji nivo aktivnosti, oblike krivulje pa ne spremeni. Pomembno je predvsem, da tako v prisotnosti mastoparana, kakor tudi v njegovi odsotnosti, "hladni" $\text{GTP}\gamma\text{S}$ praktično popolnoma izpodrine radioaktivni $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Logika sklepanja za galnon je bila sledeča. Če se galnon veže na podenoto α_{i1} izven žepa, kamor se vežeta $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in $\text{GTP}\gamma\text{S}$, potem se krivulja izpodrivanja dvigne na višji nivo aktivnosti, oblika krivulje pa se ne spremeni, enako kot pri mastoparanu. Če se galnon veže v žep, kamor se vežeta tudi

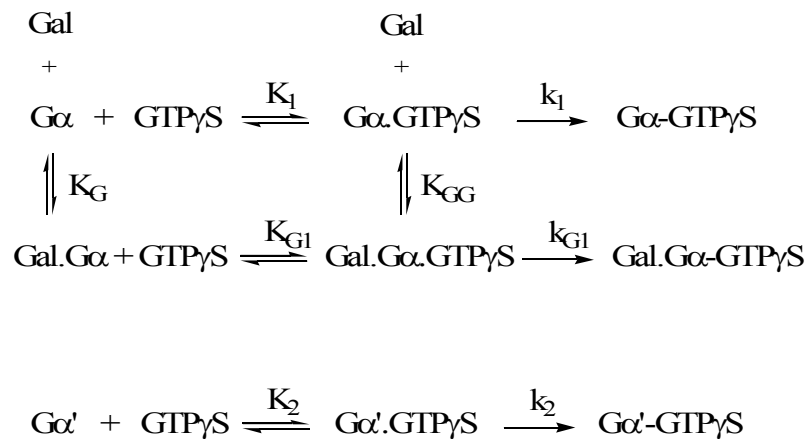
[³⁵S]GTP γ S in GTP γ S, potem se krivulja izpodrivanja dvigne na višji nivo aktivnosti in tudi oblika krivulje se spremeni. S slik 17 in 18 je razvidno, da se je krivulja dvignila na višji nivo aktivnosti skladno s koncentracijo galnona. Vendar pa se spremeni tudi oblika krivulje, saj pri višjih koncentracijah galnona "hladen" GTP γ S pri danih koncentracijah ni mogel povsem izpodriniti radioaktivnega [³⁵S]GTP γ S, oziroma jo je izpodrinjal pri višjih koncentracijah. Na osnovi teh rezultatov na kvalitativni ravni sklepamo, da se galnon neposredno vpleta v vezavo GTP γ S, pri tem pa se ne sme vezati na povsem isto mesto kot GTP γ S (tako hladen kot radioaktiven), saj se v tem primeru hitrost vezave [³⁵S]GTP γ S na G-proteine v prisotnosti galnona ne bi smela povečati (slika 16). Zato sklepamo, da se mesti za vezavo galnona in GTP γ S le delno prekrivata, kar povzroči, da galnon ovira pristop GTP γ S do njegovega vezavnega mesta, samo hitrost vezave GTP γ S pa poveča. Vezavo GTP γ S na G-protein lahko kljub njeni ireverzibilnosti razumemo kot dvostopenjski proces:



pri katerem se GTP γ S najprej veže reverzibilno v kompleks GTP γ S·G α , nato pa šele ireverzibilno v kompleks GTP γ S-G α ; K je ravnotežna konstanta za reverzibilno vezavo, k pa hitrostna konstanta za ireverzibilni prehod kompleksa GTP γ S·G α v GTP γ S-G α . V skladu s to shemo in našimi rezultati smo sklepali, da galnon vpliva tako na K (zmanjša afiniteto GTP γ S za G α), kot tudi na k (poveča hitrost ireverzibilne vezave).

Opisano hipotezo smo preverili s pomočjo prof. Jureta Stojana iz Medicinske fakultete v Ljubljani, ki je skonstruiral naši hipotezi ustrezen kinetični model in z računalniškim programom (glej spletno stran <http://www2.mf.uni-lj.si/~stojan/stojan.html>) z metodo nelinearne regresije prilagodil našim eksperimentalnim podatkom ustrezne krivulje, s čemer je določil vrednosti kinetičnih konstant za postavljeni model. Pri konstrukciji modela je upošteval dejstvo, da so v našem eksperimentalnem sistemu v membranah iz podganjih

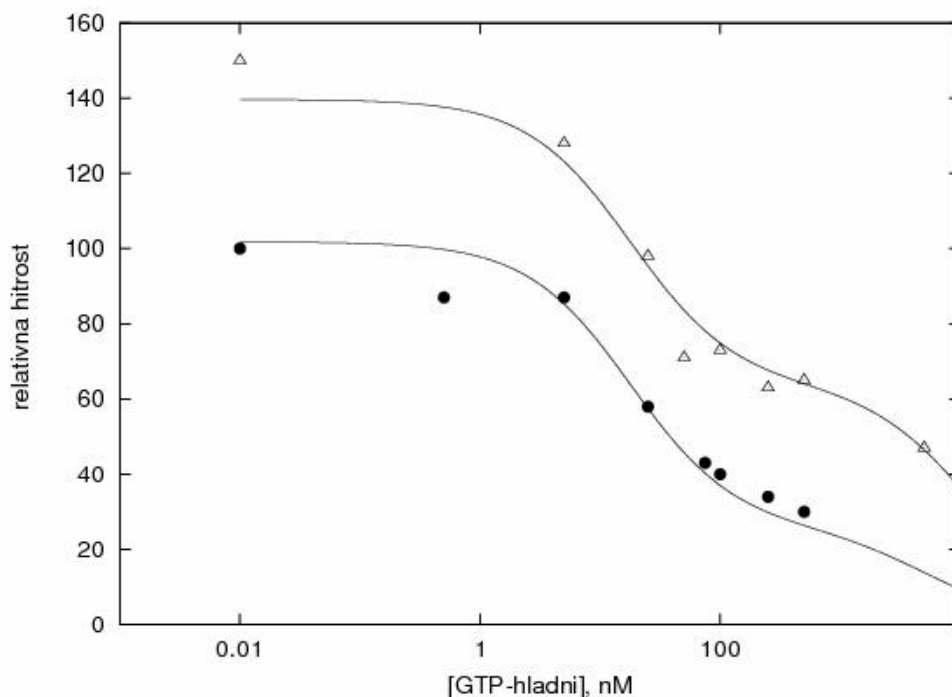
korteksov prisotni različni G-proteini - taki na katere galnon deluje in tudi taki na katere galnon ne deluje in se nanje verjetno sploh ne veže:



V tem modelu Gal pomeni galnon, G α podenoto α na katero se galnon lahko veže, Gal.G α reverzibilni kompleks med galnom in podenoto α , Gal.G α .GTP γ S na kompleks Gal.G α reverzibilno vezan GTP γ S, Gal.G α -GTP γ S na kompleks Gal.G α ireverzibilno vezan GTP γ S, G α' podenote α na katere se galnon ne veže, G α' .GTP γ S na G α' reverzibilno vezan GTP γ S in G α' -GTP γ S na G α' ireverzibilno vezan GTP γ S; vsi veliki K so ustrezne ravnotežne konstante, vsi mali k pa ustrezne hitrostne konstante. Ker podenota α ne more ločiti med 'vročim' in 'hladnim' GTP γ S, ta dva tudi v modelu nista ločena, v enačbi, ki predstavlja rešitev tega modela, pa je bilo seveda upoštevano vsakokratno razmerje med 'vročim' in 'hladnim' GTP γ S.

Računalniško prilagajanje modelu ustreznih krivulj na naše eksperimentalne točke je prof. Stojan naredil le za dve krivulji iz slike 17: za krivuljo brez dodanega galnona in za krivuljo v prisotnosti 1×10^{-4} M galnona (slika 21). Rezultat je pokazal, da je vrednost konstante K_{G1} ($7,3 \times 10^4$ M) za več kot dvakrat manjša kot vrednost konstante K_1 ($1,8 \times 10^5$ M), hkrati pa je vrednost konstante k_{G1} ($6,4 \times 10^4$ l/mol s) za skoraj šestkrat večja od vrednosti konstante k_1 ($1,1 \times 10^4$ l/mol s). To potrjuje našo hipotezo, da galnon zmanjša afiniteto za reverzibilno

vezavo GTP γ S na podenoto α , hkrati pa poveča hitrost pretvorbe reverzibilnega kompleksa Gal.G α .GTP γ S v ireverzibilni kompleks Gal.G α -GTP γ S. Najpreprosteša razlaga vseh teh rezultatov bi bila, da se galnon verjetno veže v neposredno bližino aktivnega mesta za vezavo GTP na podenoti G α_i in tam sterično ovira pristop GTP γ S do aktivnega mesta, pospešuje pa ireverzibilno fazo vezave GTP γ S. Načelno pa bi galnon lahko na opisani način vplival na vezavo GTP γ S na podenoto G α_i tudi s perifernega mesta, kar pa z našim pristopom nismo mogli bolj zanesljivo razjasniti.



Slika 21: Relativna začetna hitrost vezave [35 S]GTP γ S na G-proteine v membranah korteksa možganov podgan v odvisnosti od koncentracije hladnega GTP γ S v odsotnosti (●) in ob prisotnosti 10^{-4} M koncentracije galnona (Δ). Začetno hitrost vezave [35 S]GTP γ S pred dodatkom galnona in v odsotnosti hladnega GTP γ S smo vzeli za 100%.

Kot smo opisali že v uvodu, so s pomočjo molekulskega modeliranja identificirali še eno potencialno mesto vezave galnona na podenoto α_{i1} in α_s in to na površini podenot α zunaj

aktivnega centra v katerega se veže GTP. Pri G_{i1} -proteinih so določili možno mesto vezave galnona na podenoto α_{i1} tam, kjer se veže podenota β z zanko, ki vsebuje lizin (PDB 1GP2: Lys78B) (Wall in sod., 1995), (Florén in sod. 2005). To zanko smo uporabili za matrico in po njej skonstruirali peptid 1. Pri G_s -proteinih so določili možno mesto vezave galnona na podenoto α_s tam, kjer se veže adenilat-ciklaza z zanko, ki vsebuje lizin (PDB 1CJK: Lys906B) (Tesmer in sod., 1999), (Florén in sod. 2005). Tudi to zanko smo uporabili za matrico in po njej skonstruirali peptid 2. V obeh primerih je bilo predvideno, da se lizinski ostanek v galnonu veže na isto mesto kot lizinska ostanka v peptidih. To hipotezo smo najprej preverili na G_{i1} -proteinih s peptidom 1. Če bi se peptid 1 vezal na predvideno mesto, bi onemogočil vezavo podenote β na podenoto α_{i1} in jo tako aktiviral. Aktivacija bi bila sorazmerna s koncentracijo peptida 1. Predvidevanja se niso uresničila, saj peptid v našem koncentracijskem območju ni vplival na aktivacijo G_{i1} -proteinov (slika 19). Čeprav peptid 1 ni aktiviral G-proteinov, bi se še vedno lahko vezal na enako mesto kot galnon. To smo preverili s poskusom, kjer smo analizirali aktivacijo G-proteinov v odvisnosti od koncentracije peptida 1 in prisotnostjo galnona. Če bi se oba vezala na isto mesto, bi se krivulja premaknila. Iz rezultatov vidimo, da je krivulja aktivacije ostala enaka kot pri poskusu brez dodanega galnona (slika 19). S peptidom 2 smo naredili enake eksperimente kot s peptidom 1. Logika sklepanja je bila enaka kot pri peptidu 1. Rezultati so pokazali, da peptid 2 ne aktivira G_s -proteinov (slika 20) in da se krivulja aktivacije G-proteinov v odvisnosti od koncentracije peptida 2 ne spremeni ob dodatku galnona (slika 20). Rezultati tako nakazujejo, da se galnon verjetno ne veže na predvideni periferni mesti na podenotah α_{i1} in α_s , vendar je ta rezultat zelo nezanesljiv, saj nimamo dokaza, da se peptida 1 in 2 resnično vežeta na podenoto α heterotrimernih proteinov tipa G_{i1} in G_s .

Na podlagi rezultatov smo prišli do naslednjih sklepov:

- Galnon se ne veže na isto mesto kot GTP oz. $GTP\gamma S$.
- Vezava galnona na podenoto α_{i1} je kooperativna; iz tega sledi, da je na podenoti α_{i1} verjetno več vezavnih mest za galnon.

- Kljub temu, da se galnon ne veže na isto mesto kot GTP oz. $GTP\gamma S$ pa vse kaže, da se veže nekje v neposredni bližini tega mesta in se tudi vpleta v kompeticijo med radioaktivnim in "hladnim" $GTP\gamma S$. Pri tem zmanjša afiniteto za nastanek reverzibilnega kompleksa med $G_{\alpha i}$ in $GTP\gamma S$, pospešuje pa njegovo pretvorbo v ireverzibilni kompleks.
- Galnon se verjetno ne veže na isto mesto na podenoti α_{i1} , na katero se veže adenilat-ciklaza niti na isto mesto na podenoti α_s , na katero se veže podenota β ; ti dve ugotovitvi sta žal zelo nezanesljivi.

6 VIRI

ABRAMOV U., FLORÉN A., ECHEVARRA D. J., BREWER A., MANUZON H., ROBINSON J. K., BARTFAI T., VASAR E., LANGEL Ü. 2004. Regulation of feeding by galnon. *Neuropeptides*, 38: 55-61

ALBERT P. R., ROBILLARD L. 2002. G protein specificity: traffic direction required. *Cell signal*, 14: 407-418

AZPIAZU I., GAUTMAN N. 2001. G protein γ subunit interaction with a receptor regulates receptor-stimulated nucleotide exchange. *J Biol Chem*, 276: 41742-41747

BADIE-MAHDAVI H., BEHRENS M. M., REBEK J., BARTFAI T. 2005. Effect of galnon on induction of long-term potentiation in dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neuropeptides*, 39: 249-251

BAE H., ANDERSON K., FLOOD L. A., SKIBA N. P., HAMM H. E., GRABER S. G. 1997. Molecular determinants of selectivity in 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor-G protein interactions. *J Biol Chem*, 272: 32071-32077

BAHIJA D. S., WISE A., FANELLI F., LEE M., REES S., MILLIGAN G. 1998. Hydrophobicity of residue 351 of the G protein Gi1 alpha determines the extent of activation by the alpha 2A-adrenoreceptor. *Biochemistry*, 37: 11555-11562

BAVEC A., HÄLLBRINK M., LANGEL Ü., ZORKO M. 2003. Different role of intracellular loops of glucagon-like peptide-1 receptor in G-protein coupling. *Regul. Peptides* 111: 137-144

BLAHOS J., FISCHER T., BRABET I., STAUFFER D., ROVELLI G., BOCKAERT J., PIN J. 2001. A novel site on the G α -protein that recognizes heptahelical receptors. *J Biol Chem*, 276: 3262-3269

BLAHOS J., MARY S., PERROY J., COLLE C., BRABET I., BOCKAERT J., PIN J. P. 1998. Extreme C terminus of G protein α -subunits contains a site that discriminates between G_i-coupled metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem*, 273: 25765-25769

BOCKAERT J., PIN J. P. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18: 1723-1729

BOURNE H. R. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 134-142

CARTY D. J., PADRELL E., CODINA J., BIRNBAUMER L., HILDEBRANDT J. D., IYENGAR R. 1990. Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three G_i proteins. *J Biol Chem*, 265: 6268-6273

CASEY P. J. 1994. Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6: 219-225

CLAPHAM D. E., NEER E. J. 1997. G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37: 167-203

CLAPHAM D. E., NEER E. J. 1993. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*, 365: 403-406

COLEMAN D. E., BERGHUIS A. M., LEE E., LINDER M. E., GILMAN A. G., SPRANG S. R. 1994. Structures of active conformations of G_i alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, 1994, 265: 1405-1412

CONKLIN B. R., BOURNE H. R. 1993. Structural elements of G α subunits that interact with G γ receptors, and effectors. *Cell*, 73: 631-641

CONKLIN B. R., HERZMARK P., ISHIDA S., VOYNO-YASENETSKAYA T. A., SUN Y., FARFEL Z., BOURNE H. R. 1996. Carboxyl-terminal mutations of gq alpha and Gs alpha that alter the fidelity of receptor activation. *Am Soc Pharm Exper Therapeu*, 4: 885-890

COVIC L., GRESSER L. A., TALAVERA J., SWIFT S., KULIOPULOS A. 2002. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell - penetrating membrane-tethered peptides. *Biochemistry*, 2. 99: 643-648

CRAWLEY J. N. 1999. The role of galanin in feeding behavior. *Neuropeptides*, 33: 369-375

CRESPO P., XU N., SIMONDS W. F., GUTKIND J. S. 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 369: 418-420

DAAKA Y., LUTTRELL L. M., LEFKOWITZ R. J. 1997. Switching of the coupling of the beta 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390: 418-420

DENKER B. M., NEER E. J., SCHMIDT C. J. 1992. Mutagenesis of the amino terminus of the alpha subunit of the G protein G_o. In vitro characterization of alpha 0 beta gamma interactions. *J Biol Chem*, 267: 6272-6277

DEROSSI D., CALVET S., TREMBLEAU A., BRUNISSEN A., CHASSAING G., PROCHIANTZ A. 1996. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*, 271: 18188-18193

DIETRICH A., SCHER A., ILLENBERGER D., KLOOG Y., HENIS I. Y., GIERSCHIK P. 2003. Studies on G protein $\alpha\beta\gamma$ heterotrimer formation reveal a putative S-prenyl-binding site in the α subunit. *Biochem J*, 376, 449-456

DOHLMAN H. G., BOUVIER M., BENOVIÉ L. J., CARON G. M., LEFKOWITZ J. R. 1987. The multiple membrane spanning topography of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 29, 262: 14282-14288

DOHLMAN H. G., CARON M. G., DEBLASI A., FRIELLE T., LEFKOWITZ R. J. 1990. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry*, 29: 2335-2342

DOHLMAN H. G., THORNER J., CARON M. G., LEFKOWITZ R. J. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*, 60: 653-688

DRIN G., COTTIN S., BLANC E., REES R. A., TEMSAMANI J. 2003. Studies on the internalisation mechanism of cationic cell - penetrating peptides. *J Biol Chem*, 33, 278: 31192-31201

ERICKSON B. W., MERRIFIELD R. B. 1976. The proteins. Academic press, 2, 3: 255-527

FANTL W. J., JOHNSON D. E., WILLIAMS L. T. 1993. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 62: 453-481

FAURE M., VOYNO-YASENETSKAYA T. A., BOURNE H. R. 1994. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem*, 269: 7851-7854

FITTIPALDI A., FERRARI A., ZOPPE M., ARCANGELI C., PELLEGRINI V., BELTRAM F., GIACCA M. 2003. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem*, 278: 34141-34149

FLORÉN A., SOLLENBERG U., LUNDSTRÖM L., ZORKO M., STOJAN J., BUDIHNA M., WHEATLEY M., MARTIN P. N., KILK K., MAZARATI A., BARTFAI T., LINDGREN M., LANGEL Ü. 2005. Multiple interaction sites of galnon trigger its biological effects. *Neuropeptides*, 39: 547-558

FONG H. K., HURLEY J. B., HOPKINS R. S., MIAKE-LYE R., JOHNSON M. S., DOOLITTLE R. F., SIMON M. I. 1986. Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2162-2166

FONG T. M., CASCIERI M. A., YU H., BANSAL A., SWAIN C., STRADER C. D. 1993. Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokin-1 receptor and CP 96345. *Nature*, 362: 350-353

FUNG B. K., NASH C. R. 1983. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segment. II. Evidence for distinct binding sites and conformational changes revealed by limited proteolysis with trypsin. *J Biol Chem*, 258: 10503-10510

GARCIA-HIGUERA I., THOMAS C. T., YI F., NEER J. E. 1996. Intersubunit surfaces in G protein $\alpha\beta\gamma$ heterotrimers. *J Biol Chem*, 271: 528-535

GILMAN A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem*, 56: 615-649

GREEN M., LOWENSTEIN P. M. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55: 1179-1183

HAMM H. E., DERETIC D., ARENDT A., HARGRAVE P. A., KOENIG B., HOFMANN K. P. 1988. Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science*, 241: 832-835

HERMANS E. 2003. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein coupled receptors. *Pharmacol Therapeut*, 99: 24-44

HEYDEORN A., WARD J. R., JORGENSEN R., ROSENKILDE M. M., FRIMURER N. T., MILLIGAN G., KOSTENIS E. 2004. Identification of a novel site within G protein α subunits important for specificity of receptor-G protein interaction. *Mol Phar*, 2, 66: 250-259

HIGASHIJIMA T., BURNIER J., ROSS M. E. 1990. Regulation of G_i and G_o by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *J Biol Chem*, 265: 14176-14186

HIGASHIJIMA T., FERGUSON K. M., STERNWEIS P. C., SMIGEL M. D., GILMAN A. G. 1987. The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *J Biol Chem*, 262: 762-766

HIGASHIJIMA T., MIYAZAWA T. 1984. Conformation and action of physiologically active peptides as bound to phospholipid membrane. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 29: 29-41

HIGASHIJIMA T., UZU S., NAKAJIMA T., ROSS E. M. 1988. Mastoparan, a peptide from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem*, 263: 6491-6494

HIGASHIJIMA T., WAKAMATSU K., TAKEMITSU M., FUJINO M., NAKAJIMA T., MIYAZAWA T. 1983. Conformational change of mastoparan from wasps venom on binding with phospholipid membrane. FEBS Lett, 152: 227-230

HÖKFELT T., WIESENFELD-HALLIN Z., VILLAR M., MELANDER T. 1987. Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. Neurosci Lett, 83: 217-220

HORI Y., DEMURA M., IWADATE M., ULRICH S. A., NIIDOME T., AOYAGI H., ASAKURA T. 2001. Interaction of mastoparan with membranes studied by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ²H-NMR and ¹⁵N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. Eur J Biochem, 268, 302-309

HUROWITZ H. E., MELNYK M. J., CHEN Y., KOUROS-MEHR H., SIMON I. M., SHIZUYA H. 2000. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein α , β , and γ subunit genes. DNA Research, 7, 111-120

HYMAN E. S., NESTLER J. E. 1996. Initiation and adaptation: a paradigm to understand psychotropic drug action. Am J Psychiatry, 153: 151-162

JIANG T., OLSON E. S., NGUYEN T. Q., ROY M., JENNINGS P. A., TSIEN R. Y. 2004. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell penetrating peptides. Proc Natl Acad Sci USA, 101, 17867-17872

JOHANSSON K., GE L. 1999. Phage display of combinatorial peptide and protein libraries and their applications in biology and chemistry. Curr Top Microbiol Immunol, 234: 87-105

JOLIOT J. H., TRILLER A., VOLOVITCH M., PERNELLEC C., PROCHIANTZ A. 1991. Alpha-2,8-polisialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. New Biology, 3: 1121-1134

KARNIK S. S., KHORANA H. G. 1990. Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187. J Biol Chem, 265: 17520-17524

KATADA T., KUSAKABE K., OINUMA M., UI M. 1987. A novel mechanism for the inhibition of adenylate cyclase via inhibitory GTP-binding proteins. Calmodulin-dependent inhibition of the cyclase catalyst by the beta gamma-subunits of GTP-binding proteins. J Biol Chem, 262: 11897-11900

KOBILKA B. K., KOBILKA T. S., DANIEL K., REGAN J. W., CARON M. G., LEFKOWITZ R. J. 1988. Chimeric alpha 2-, beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. Science, 240: 1310-1316

KOSTENIS E., GOMEZA J., LERCHE C., WESS J. 1997. Genetic analysis of receptor-Galphaq coupling selectivity. *J Biol Chem*, 272: 23675-23681

KREFT M., GASMAN S., CHASSEROT-GOLAZ S., KUSTER V., RUPNIK M., SIKDAR K. S., BADER F. M., ZOREC R. 1999. The heterotrimeric Gi₃ protein acts in slow but not in fast exocytosis of rat melanotrophs. *J Cell Science*, 112: 4143-4150

KUSUNOKI H., WAKAMATSU K., SATO K., MIYAZAWA T., KOHNO T. 1998. G protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with ¹³C and ¹⁵N. *Biochemistry*, 37: 4782-4790

LAMBRIGHT D. G., NOEL J. P., HAMM H. E., SIGLER P. B. 1994. Structural determinants for activation of the alpha- subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*, 369: 621-628

LAMBRIGHT D. G., SONDEK J., BOHM A., SKIBA N. P., HAMM H. E., SIGLER P. B. 1996. The 2.0 Å crystal structure of heterotrimeric G protein. *Nature*, 379: 311-319

LAND T., LANGEL Ü. 1991. Linear and cyclic N-terminal galanin fragments and analogs as ligands at the hypothalamic galanin receptor. *Int J Pept Protein Res*, 38: 267-272

LANGEL Ü. (editor) 2002. Cell-penetrating peptides. London CRC Press LLC. 406 str.

LANGEL Ü. (editor) 2006. Cell-penetrating peptides. London CRC Press LLC. 600 str.

LENINGER A. L., NELSON D. L., COX M. M. 1993. 87, 124, Worth Publishers, New York

LINDER M. E., EWALD D. A., MILLER R. J., GILMAN A. G. 1990. Purification and characterization of G_o alpha and three types of G_i alpha after expression in Escherichia coli. *J Biol Chem*, 265: 8243-8251

LINDGREN E. M., HÄLLBRINK M. M., ELMQUIST M. A., LANGEL Ü. 2004. Passage of cell – penetrating peptides across human epithelial cell layer in vitro. *Biochem J*, 377: 69-76

LIRI T., BELL S. M., BARANSKI T. J., FUJITA T., BOURNE H. R. 1999. A G_{sα} mutant designed to inhibit receptor signaling through G_s. *Cell Biology*, 96: 499-504

LOEW A., HO Y. K., BLUNDELL T., BAX B. 1998. Phosducin induces a structural change in transducin beta gamma. *Structure*, 6: 1007-1019

LOGOTHETIS D. E., KURACHI Y., GALPER J., NEER E. J., CLAPHAM D. E. 1987. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*, 325: 321-326

LUPAS A. N., LUPAS J. M., STOCK J. B. 1992. Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled coil? FEBS Letters, 314: 105-108

MATSUDA T., TAKAO T., SHIMONISHI Y., MURATA M., ASANO T., YOSHIZAVA T., FUKADA Y. 1994. Characterization of interactions between transducin $\alpha/\beta\gamma$ -subunits and lipid membranes. J Biol Chem, 269: 30358-30363

MAYO K. H., 2000. Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it. Tibtech, 18: 212-217

MENDE U., SCHMIDT C. J., YI F., SPRING D. J., NEER E. J. 1995. The G protein gamma subunit. Requirements for dimerization with beta subunits. J Biol Chem, 270: 15892-15898

MULLER S., LOHSE M. J. 1995. The role of G-protein beta gamma subunits in signal transduction. Biochem Soc Trans, 23: 141-148

NEER E. J. 1994. G proteins: critical control points for transmembrane signals. Protein Sci, 3: 3-14

NEER E. J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell, 80: 249-257

NEKHOTIAEVA N., ELMQUIST A., RAJARAO K. G., HÄLLBRINK M., LANGEL Ü., GOOD L. 2003. Cell entry and antimicrobial properties of eucariotic cell-penetrating peptides. FASEB J, 17: U549-U563

NOEL J. P., HAMM H. E., SILER P. B. 1993. The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. Nature, 366: 654-663

O'DOWD B. F., LEFKOWITZ R. J., CARON M. G. 1989. Structure of the adrenergic and related receptors. Annu Rev Neurosci, 12: 67-83

OFFERMANS S. 2003. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. Prog Biophys Mol Biol, 83: 101-130

ÖSTENSON C. G. 2001. The Goto-Kazizaki rat. A.F.F. Sima, E. Shafrir (Eds.), Animal Models of Diabetes, A primer, Harwood Acad Publ London, p.p. 197-211

OVCHINNIKOV Y. A., ABDULAEV N. G., BOGACHUK A. S. 1988. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. FEBS Letters, 230: 1-5

POOGA M., HÄLLBRINK M., ZORKO M., LANGEL Ü. 1998. Cell penetration by transportan. FASEB J, 12: 67-77

POTOCKY T. B., MENON A. K., GELLMAN S. H. 2003. Cytoplasmic and nuclear delivery of TAT-derived peptide and a β -peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*, 278: 50188-50194

QUYNH T. T. N., ISLAM M. S., FLORÉN A., BARTFAI T., LANGEL Ü., ÖSTENSON C. 2005. Effects of galnon, a non-peptide galanin receptor agonist, on insulin release from rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Research Com*, 328: 213-220

RANDS E., CANDELORE M. R., CHEUNG A. H., HILL W. S., STRADER C. D., DIXON R. A. 1990. Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J Biol Chem*, 265: 10759-10764

REICHERT L. E. JR., DATTATREYAMURTY B., GRASSO P., SANTA-COLOMA T. A. 1991. Structure-function relationships of the glycoprotein hormones and their receptors. *Trends in Pharmacol Sci*, 12: 199-203

ROSS E. M. 1989. Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron*, 3: 141-152

ROSS F. M., FILIPOVSKA A., SMITH J. A. R., GAIT J. M., MURPHY P. M. 2004. Cell penetrating peptides do not cross mitochondrial membranes even when conjugated to a lipophilic cation: evidence against direct passage through phospholipid bilayers. *Biochem J*, 383, 457-468

SAAR K., LINDGREN M., HANSEN M., ERÍKSDÓTTIR E., JIANG Y., ROSENTHAL-AIZMAN K., SASSIAN M., LANGEL Ü. 2005. Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. *Anal Biochem*, 30: 1-11

SAAR K., MAZARATI A. M., MAHLAPUU R., HALLNEMO G., SOOMETS U., KILK K., HELLBERG S., POOGA M., TOLF B. R., SHI T. S., HOKFELT T., WASTERLAIN C., BARTFAI T., LANGEL Ü. 2002. Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 7136-7141

SAVARESE T. M., FRASER C. M. 1992. In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J*, 283: 1-19

SCHWINDINGER W. F., ROBISHAW J. D. 2001. Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ dimers in growth and differentiation. *Oncogene*, 20, 13: 1653-1660

SIMON M. I., STRATHMANN M. P., GAUTAM N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252: 802-808

SOLLENBERG U., BARTFAI T., LANGEL Ü. 2005. Galnon- a low-molecular weight ligand of the galanin receptors. *Neuropeptides*, 39: 161-163

SONDEK J., BOHM A., LAMBRIGHT D. G., HAMM H. E., SIGLER P. B. 1996. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature*, 379: 369-374

SPENGLER D., WAEBER C., PANTALONI C., HOLSBOER F., BOCKAERT J., SEEBURG P. H., JOURNOT L. 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*, 365: 170-175

STRADER C. D., FONG T. M., TOTA M. R., UNDERWOOD D., DIXON R. A. 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, 63: 101-132

STRADER C. D., SIGAL I. S., DIXON R. A. 1989. Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J*, 3: 1825-1832

SUKUMAR M., HIGASHIJIMA T. 1992. G protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide. *J Biol Chem*, 30, 267: 21421-21424

TAKIDA S., WEDEGAERTNER B. P. 2003. Heterotrimer formation, together with isoprenylation, is required for plasma membrane targeting of Gβγ. *J Biol Chem*, 278: 17284-17290

TANAKA T., KAHNO T., KINOSHITA S., MUKAI H., ITOH H., OHYA M., MYAZAWA T., HIGASHIJIMA T., WAKAMATSU K. 1998. α helix content of G protein α subunit is decreased upon activation by receptor mimetics. *J Biol Chem*, 273: 3247-3252

TESMER J. J. G., SUNAHARA R. K., JOHNSON R. A., GOSSELIN G., GILMAN A. G., SPRANG S. R. 1999. Two metal ion catalysis in adenylyl cyclase revealed by its complex with ATP analogs, Mg²⁺, Mn²⁺, and Zn²⁺. *Science*, 285: 756-760

THOMAS T. C., SCHMIDT C. J., NEER E. J. 1993. G-protein alpha 0 subunit: mutation of conserved cysteines identifies a subunit contact surface and alters GDP affinity. *PNAS USA*, 90: 10295-10298

UMEMORI H., INOUE T., KUME S., SEKIYAMA N., NAGAO M., ITOH H., NAKANISHI S., MIKOSHIBA K., YAMAMOTO T. 1997. Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the alpha subunit. *Science*, 276: 1878-1881

VITALE N., MUKAI H., ROUT B., THIERSE D., AUNIS D., BADER M. F. 1993. Exocytosis in chromatin cells. Possible involvement of the heterotrimeric GTP-binding protein G(0). *J Biol Chem*, 268: 14715-14723

VIVES E., BRODIN P., LEBLEU B. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272: 16010-16017

VOET D., VOET J. G. 1995. *Biochemistry*. 2nd edition. New York, John Wiley & Sons, inc.: 1361 str.

VOYNO-YASENETSKAYA T., CONKLIN B. R., GILBERT R. L., HOOLEY R., BOURNE H. R., BARBER D. L. 1994. G alpha 13 stimulates Na-H exchange. *J Biol Chem*, 269: 4721-4724

WAKAMATSU K., OKADA A., MIYAZAWA T., OHYA M., HIGASHIJIMA T. 1992. Membrane-bound conformation of mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. *Biochemistry*, 31: 5654-5660

WALL M. A., COLEMAN D. E., LEE E., INIGUEZ-LLUHI J. A., POSNER B. A., GILMAN A. G., SPRANG S. R. 1995. The structure of G protein heterotrimer G_i alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*, 83: 1047-1058

WALL M. A., POSNER B. A., SPRANG S. R. 1998. Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure*, 6: 1169-1183

WANG H., LIPFERT L., MALBON C. C., BAHOUTH S. 1989. Site-directed anti-peptide antibodies define the topography of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 264: 14424-14431

WANG S., HE C., HASHEMI T., BAYNE M. 1997. Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. *J Biol Chem*, 272: 31949-31952

WATSON S., ARKINSTALL S. 1994. *The G protein linked receptor*. Academic Press

WEDEGAERTNER P. B., WILSON P. T., BOURNE H. R. 1995. Lipid modifications of trimeric G-proteins. *J Biol Chem*, 270: 503-506

WEINGARTNER R., RANSNÄS L., MUELLER H., SKLAR A. L., BOKOCH M. G. 1990. Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the α subunit of G_i. *J Biol Chem*, 265: 11044-11049

WESS J. 1997. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J*, 11: 346-354

WESS J. 1998. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther*, 80, 3: 231-264

WILKIE T. M., WHITE M. A. 2000. G proteins large and small guanine nucleotide binding proteins. V: Principles of molecular regulation. P. M. Conn, A. R. Means (ur.). New Jersey, Human Press Inc.: 27-39

WU W., HAO J., LUNDSTRÖM L., WIESENFELD-HALLIN Z., LANGEL Ü., BARTFAI T., XU X. 2003. Systemic galanin, a low-molecular weight galanin receptor agonist, reduces heat hyperalgesia in rats with nerve injury. *Eur J Pharm*, 482: 133-137

YAJIMA Y., UCHINO K., ITO H., KAWASHIMA S. 1997. Mastoparan-stimulated prolactin secretion in rat pituitary GH3 cells involves activation of Gq/11 proteins. *Endocrinology*, 138: 1949-1958

ZACHARIOU V., BRUNZELL D. H. 2003. The neuropeptide galanin modulates behavioral and neurochemical signs of opiate withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 9028-9033

ZORKO M., LANGEL Ü. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 57: 529-545

ZORKO M., POOGA M., SAAR K., REZAEI K., LANGEL Ü. 1998. Differential regulation of GTPase activity by mastoparan and galparan. *Arch Biochem Biophys*, 2, 349: 321-328

ZAHVALA

Najlepša hvala vsem, ki so kakorkoli prispevali k nastanku diplomske naloge. Še posebej se zahvaljujem spodaj navedenim. V prvi vrsti mojemu mentorju prof. dr. Matjažu Zorku za nesebično pomoč, koristne nasvete in veliko dragocenega časa. Prof. dr. Juretu Stojanu za izdelavo kinetičnega modela našega sistema. Doc. dr. Aljoši Bavcu in Alenki Ličar za pomoč pri pripravi in analizi obogatenih membran s⁹ in prof. dr. Ülu Langlu z univerze v Stockholmu za galnon. Nenazadnje gre posebna zahvala staršem, ki so me neomajno podpirali tekom študija, saj brez njih te diplomske naloge ne bi bilo.