

ÖSTRADIOL RESEPTÖRE NONSPESİFİK BAĞLANAN TİP II IgG - IgG1 ALT SINIFINDAKİ IgG MOLEKÜLÜNÜN BAĞLANMADAN SORUMLU BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI

THE INVESTIGATION ABOUT THE BINDING RESPONSIBLE SITE OF THE SUBCLASSES TYP II IgG - IgG1 WHICH BIND NONSPESİFİC ESTRODIOL RECEPTOR

Ismail PEKER* , Holger SIEDE**

ÖZET

Tip II IgG nin alt sınıfı olan IgG1 fragmentlerine ayrıldı. IgG molekülünün öst-radiol reseptörünün bağlandığı yer araştırıldı. IgG1 pepsin ve papinle inkube edildi, IgG fragmentleri Sephadex, iyon değıştirici ve anfinite kromatografileri ile ayrıldı. Ayrılan frag-mentler işaretli östradiol reseptörüyle inkube edildi. Östradiol reseptör -IgG kompleks olu-şumu sakkaroz yoğunluk gradiyent santrifugasyonu ile kontrol edildi. IgG nin Fc tarafının östradiol reseptörünü bağladığı gösterildi.

Key words : Immunoglobulin, estradiol receptor, IgG subclasses

SUMMARY

IgG1 subclass of type II IgG which binded estradiol receptor was seperated its frag-ments. The binding site of Ig 6 molecul to estradiol receptor has been investigeted. First IgG1 was incubated with pepsin or with papain. The fragments of IgG were seperated by Sephadex and ion exchange affinity chromatogragphics. The seperated fragments were incubated with radiolabeled estradiol receptor. The formation of Ig 6 - estradiol receptor complex had been shojn by sucrote gradient centrifugation. This shows that Fc site of IgG binds to estradiol receptor.

GİRİŞ

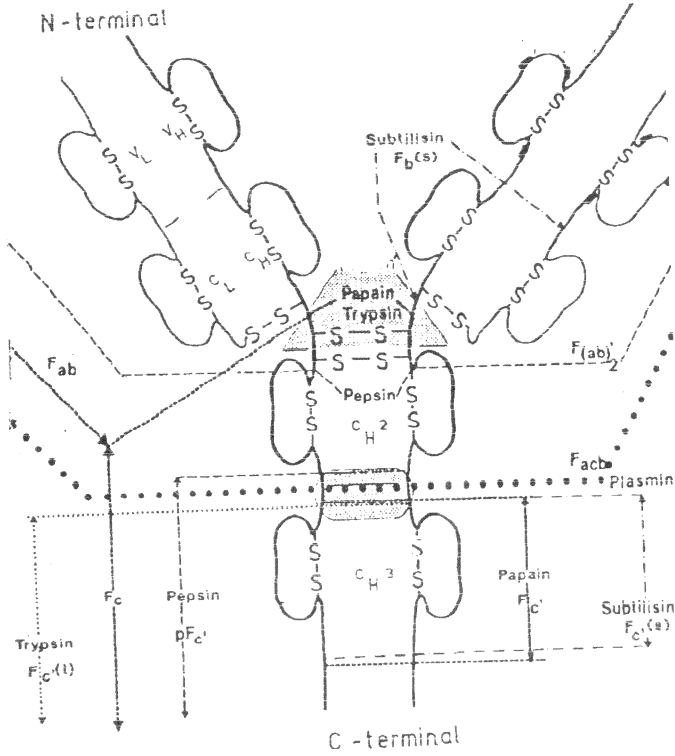
Steroid reseptörler kanser teşhisi ve tedavisinde önemlidir (1,2,3). Steroid reseptörleri içinde, üzerinde en çok çalışılanlardan biri de öst-radiol reseptörüdür. Östradiol reseptörünün metabolik olaylarda nasıl bir yol izlediği araştırılırken diğer proteinlerle olan etkileşmelerinin de önemli olduğu görülmüştür.

* Dr. Pakize İ. Tarzi Biokimya ve Hormon Laboratuarı Valikonağı Cad. No. 86, 80200 Ni-şantaşı / İstanbul

** Max ve Planck Institut Experimentelle Endokrinologie Hanover, Almanya

Daha önceki çalışmalardan edindiğimiz bilgilere göre bazı hayvanların serum IgG leri östradiol reseptörleriyle nonspesifik bağlanmaktadır (4,5). Bu bağlanmayı gösteren IgG ye tip II, bağlanma göstermeyen IgG ye ise tip I adı verilmiştir. bundan sonraki aşamada östradiol reseptörüne nonspesifik bağlanan tip II IgG nin (keçi serumunda) alt sınıflarından IgG1 ve IgG2 nin östradiol reseptörüyle kompleks oluşturmaları araştırılmış ve bu bağlanmadan IgG1 alt sınıfının sorumlu olduğu bulunmuştur (6).

Nonspesifik bağlanmada hayvanı immunize etme gayesiyle herhangi bir antijen verilmediğinden, bağlanmadan immunoglobulinin Fab tarafı sorumlu tutulamaz. Böyle bir bağlanma olsa bile, bu bağlanma Fab tarafındaki değişken bölgedeki amino asit dizilişinden değil protein - protein etkileşmesindedir. Biz bu maksatla önce hangi hayvanlarda IgG tip II bulunduğunu araştırdık (7). Tip II IgG bulunan serumlardan Kekwick metodu veya Sephadex kolon kromatografisiyle IgG yi ayırdık ve tip II IgG yi DEAE Servacell SS 23 anyon değiştirici kromatografisi ile IgG1 ve IgG2 alt sınıflarına ayırdık. Bağlanmadan IgG1 in sorumlu olduğunu bulduk (6). IgG molekülünün yapısı (Şekil - 1) ve değişik enzimlerle inkubasyonu sonucu oluşan fragmentler (Tablo - 1) de görülmektedir.



Şekil - 1 : Bir IgG molekülünün yapısı, proteazların etki noktaları ve fragmentler.

Tablo - 1 : IgG nin pepsin ve papainle inkubasyonundan oluşan fragmentler ve özellikleri.

| Enzim | Fragment | Molekül ağırlığı MW (kda) | Bölge | Biyolojik fonksiyonu. |
|--------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------|
| Papain | Fab | 50 (3.5 S) | VH, CH1, VL, CL | antijen bağlama |
| | Fc | 50 (3.5 S) | CH2, CH3)2 | kompleman aktivasyonu. |
| | Fc' | 21 | (CH3)2 | kompleman aktivasyonu. |
| Pepsin | F(ab) ₂ | 100 | (CH1, VH, CL, VL)2 | antijen bağlama |
| | Fab' | 50 | CH1, VH, CL, VL | antijen bağlama |

Ayırdığımız IgG1 den papain ve pepsin kullanarak Fab ve Fc gibi fragmentler elde ettik. Bu fragmentleri değişik kromatografik yöntemlerle ayırdık. Fragmentleri östradiol reseptörle inkube ederek hangi fragmentin kompleks oluşturduğunu araştırdık.

MATERYAL VE METOD

Radyoaktif işaretli 17 B (6,7-³ H) östradiol (spesifik aktivite : 55 Ci/ mmol), Amersham Buchler den, aktif kömür ve diyaliz zarları Sigmadan, radyoaktif ölçümler için kullanılan sintilatör "xylofluor" Bakerdan, diğer kimyasal maddeler Merck'den satın alındı. Fotometrik ölçümler Gilford 2600, (USA) veya DU-8 (Beckman, USA) spektrofotometreleriyle yapıldı. Yoğunluk Gradiyenti, protein tayini, radyoaktivite ölçülmesi, mikrozomlardan östradiol reseptörün ekstraksiyonu ve işaretlenmesi, IgG nin alt sınıflarına ayrılması işlemleri daha önce detaylarıyla anlattığımız işlemlere göre yapıldı (6,7).

Immunoglobulinlerin fraksiyonlarına ayrılması

Papain ile fragmentlerine ayırma (Fab, Fc)

Papain ile IgG1 in fragmentlerine ayrılması Porter (8) e göre yapıldı. 0.1 M sodyum fosfat (NaP) 0.01 M sistin, 2 mM EDTA, pH 7 tamponu içinde çözülmüş olan 15 - 20 mg / ml konsantrasyonundaki IgG, 0.05 M sodyumasetat (NaAc), 0.01 % timol, pH 4.5, 28 mg / ml, (22 unit / mg) protein olacak şekilde hazırlanmış papain süspansiyonu ile karıştırıldı. IgG / papain oranı 100 / 1 olacak şekilde ayarlandı. Bu karışım 37°C de 16 saat inkube edildi. Inkubasyon sonunda iyot asetik asit (1 M iyotasetik asit, 0.1 M NaP, pH 7) ile son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde ilave edildi (9,10,11). 30 dakika oda sıcaklığında inkube edildikten sonra 0.1 M NaAc, 5 mM NaN₃, pH 5.5 çözeltisine karşı diyaliz edildi. Diyaliz sırasında çöken protein SW 60 rotoru ile 20 °C de 20 000 devir / dak ile 20 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Papain ile ayrılan fragmentler Sephadex G 150 SF ile Tan ve Van Eyk'e göre ayrıldı (12,13). 5 cm x 49 cm boyutlarında kolon kullanılarak 17.8 ml / saat, 6.8 ml / fraksiyon olacak şekilde 0.1 M NaAc, 5 mM NaN₃, pH 5.5 çözeltisi ile oda sıcaklığında elue edildi. 280 nm dalga boyunda 1 cm lik küvette fraksiyonların absorpsiyonları ölçüldü (Şekil 2,3). Fab ve Fc ihtiva eden karışım distile suya karşı diyaliz edildi. Geriye kalan kısım hacmi en az olacak şekilde 0.1 M NaP, 5 mM NaN₃ pH 8 tamponu ile süspansiyon haline getirildi.

Immunoglobulinlerin Protein - A Sepharose (SPA) ile fragmentlerine ayrılması

Bu ayırma Escribanol'e (14) göre 1.45 g protein - A Sepharose bir gece 100 ml 0.1 M NaP, 5 mM NaN₃, pH 8 (tampon I) içinde şişirildi. Üst kısım emildi ve jel 20 ml tampon içine süspansiyon yapıldı ve 1 cm x 5 cm boyutlarında bir cam kolona dolduruldu. Kolon kullanılmadan önce 50 ml tampon I, 50 ml 0.1 M sodyumsitrat, 5 mM NaN₃, pH 6 (tampon II) ve 10 ml 0.5 M glisin, 5 mM NaN₃, pH 2.8 (tampon 3) kolondan 1.8 ml / saat olacak şekilde geçirildi. Sonra tampon I kolondan geçilerek kolon dengelendi. Örnek kolona tatbik edildikten sonra 20 ml tampon I, 20 ml tampon II, 10 ml tampon III ile elue edildi (1.8 ml / saat, 1.8 ml / fraksiyon, oda temperaturünde toplanan fraksiyonlar 280 nm de, 1 cm lik akışkan sistemli quarts küvet kullanılarak), (Şekil 4) çizildi.

İçinde protein bulunan fraksiyonlar distile suya karşı diyaliz edildi, liyofilize edildi, en az bir hacimde 10 mM NaP, 5 mM NaN₃, pH 7.5 çözeltisi içine alındı ve diyaliz edildi.

Immunoglobulinlerin iyon değiştirici kolon kromatografisi ile IgG fragmentlerine ayrılması

Fab ve Fc yi birbirinden ayırmak için iyon değiştirici kromatografisi de kullanıldı (15, 16, 17). 100 ml ticari iyon değiştirici süspansiyonu alındı. Sulu kısım emildi, geri kalan kısım 1 litre distile su içinde süspansiyon yapıldı. Taneciklerin çokmesinden sonra üstteki kısım aspire edildi, 2 defa distile suyla yıkandı. İstenilen tamponla dengeye getirildi, gazı alındı ve bir kolona doldurularak kolon hacminin 3 katı tamponla dengelendi. Fraktogel TSK DEAE 650 (M) iyon değiştirici yukarıda anlatıldığı şekilde kolona yüklendikten sonra 360 ml başlangıç tamponu ile (0.075 M NaP, 5 mM NaN₃, pH 8) ve 360 ml 0.2 M NaP, 5 mM NaN₃, pH 8 ile elue edildi (16), (Şekil 5). Kromatografi ile ilgili diğer parametreler : Kolon boyutu 2.5 cm x 12 cm, akış hızı 19.4 ml /saat, fraksiyon hacmi 4.9 ml/ fraksiyon ve inkubasyon sıcaklığını ise oda temperaturü olarak verebiliriz.

Immunoglobulinlerin pepsin ile IgG fragmentlerine ayrılması

Pepsinle IgG nin bölünmesi ve ayrılması Nisonoff (18) metoduna göre yapıldı. 0.07 M NaAc, 0.05 M NaCl, pH 4.5 içindeki konsantrasyonu

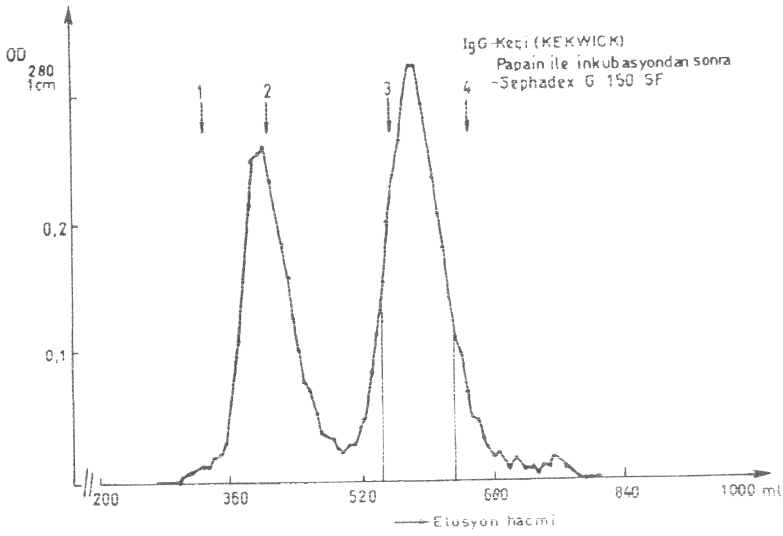
20-30 mg/ml olan IgG çözeltisi, 10 mg / ml konsantrasyondaki pepsin ile IgG / pepsin oranı 100 / 3 olacak şekilde inkube edildi. 37°C de 16 saatlik inkubasyondan sonra çözelti 1 M NaOH ile pH 8 e ayarlandı ve 0.1 M NaP, 5mM NaN₃, pH 8 tamponuna karşı diyaliz edildi. Snora Sephadex G 200 SF kolonuna oda temperaturünde uygulandı, daha sonra tampon değiştirilerek parçalanmamış IgG1 ve her iki alt sınıfın Fc leri ayrıldı.

Marker Proteinleri

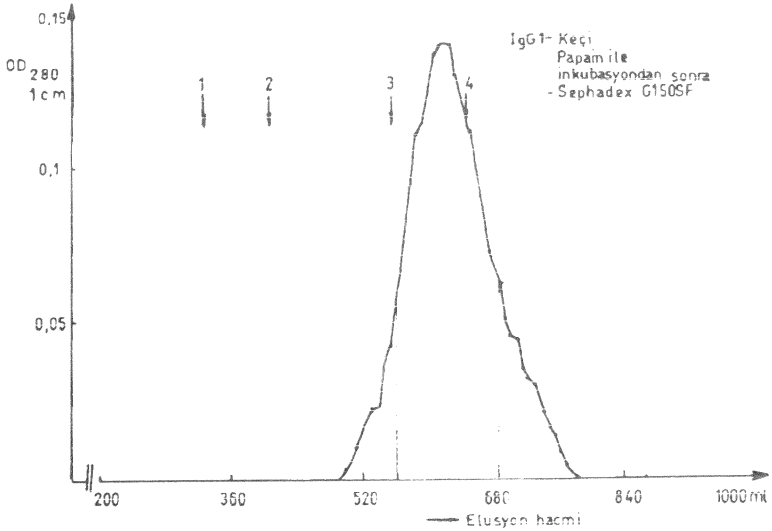
Sephadex gel kromatografisinde boş hacmi belirlemek için Blue dekstran (1), IgG nin çıkış yerini belirlemek için domuz IgG si (2), albuminin yeri için Bovin Serum Albumin (3), papain veya pepsinle oluşan fragmentlerin yerini belirlemek için ovalbumin (4) kullanıldı. Bunlar sephadex kullanılarak yapılan elusyon grafiklerinin üzerinde rakamlarla gösterilmiştir. Kullanılan marker proteinlerin molekül ağırlıkları aşağıdaki gibidir : Domuz IgG Sİ 150 000 g/ mol, Bovin Serum Albumin 68 000 g/mol, ovalbumin 44 000 g / mol dür.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Papainle IgG lerin parçalanması sonucu oluşan fragmentlerin Sephadex G 150 SF kolon kromatografisi ile ayrılması (Şekil 2,3) de Protein A Sepharose affinite kromatografisi ile ayrılması (Şekil 4) de, iyon değiştirici kromatografisi ile ayrılması (şekil 5) de görülmektedir. Şekil 6 ve Şekil 7 de pepsinle yapılan IgG fragmentlerinin ayrılması görülmektedir. Önceden Sephadexten geçirilerek ayrılan IgG1 in pepsinle inkubasyonu sonucu ayrılacak parçalardan biri F (ab') dür ve bunun beklenen mol ağırlığı 50 000 g/mol civarındadır. (Şekil 6) ve (Şekil 7) deki piklerin molekül ağırlık bölgeleri buna uymaktadır. Fragmentlerin östradiol reseptörle inkubasyonları incelendiğinde, östradiol reseptörün Fab ile inkubasyonu (Şekil 8), Fc ile inkubasyonu (Şekil 9), F(ab') 2 ile inkubasyonu (Şekil 10) da görülmektedir. Bu şekillerden anlaşılacağı gibi östradiol reseptörü bağlayan IgG molekülünün Fc tarafıdır diyebiliriz.

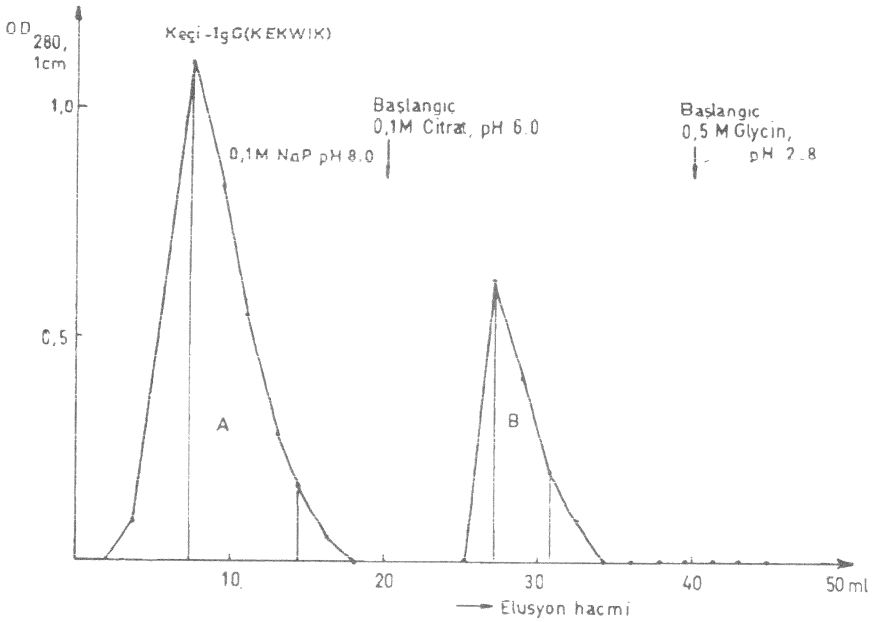


Şekil - 2 : Kekwick metodu ile ayrılan keçi IgG lerinin papainle parçalanması sonucu oluşan fragmentlerinin Sephadex G - 150 kolon kromatografisi ile ayrılması.



Şekil - 3 : Keçi IgG1 inin Papainle inkubasyonundan sonra oluşan fragmentlerin Sephadex G - 150 ile ayrılması

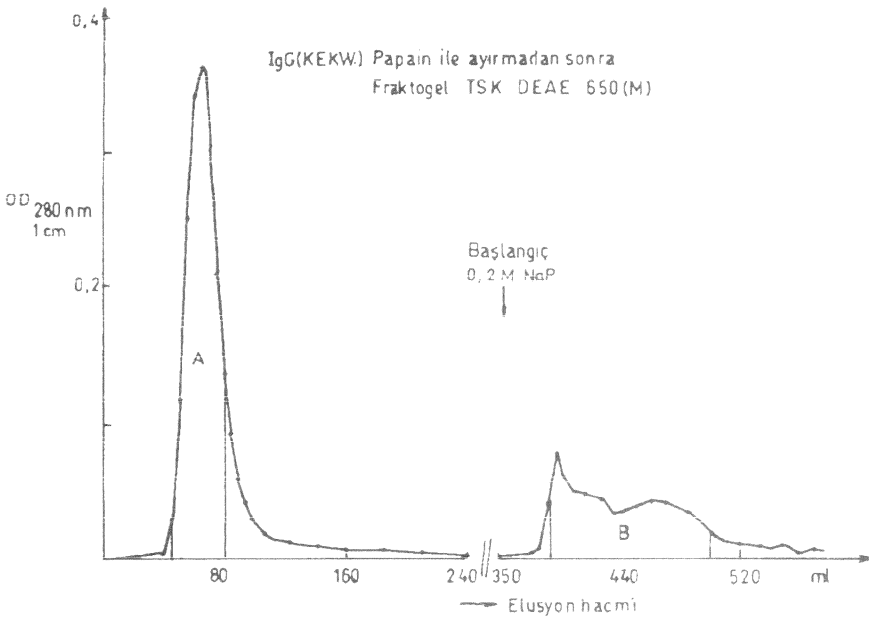
Şekil 2 de görüldüğü gibi 360 ml den başlayarak 520 ml ye kadar olan pik papainin etki etmediği IgG dir. İkinci pik 520 ml ile 680 ml arası olan kısım ayar proteinlere göre molekül ağırlığı 44 000 - 68 000 g / mol olan fraksiyonları içermektedir. Bu da Fab ve Fc den beklenen bir durumdur. IgG1 alt sınıfının papainle parçalanması β - merkпто etanol ilave edildiğinde tam gerçekleşmektedir. Şekil 2, Şekil 3 ile karşılaştırıldığında reaksiyon şartlarında IgG2 nin papainle ya çok az veya hiç parçalanmadığı görülmektedir.



Şekil - 4 : Papainle oluşan fragmentlerin Protein A Sepharose ile kolon kromatografisi ile ayrılması. A : Fab fragmenti, B: Fc fragmenti

IgG2 nin IgG1 in aksine papaine karşı direnci Mıcusan (16) tarafından bildirilmiştir. Sephadexle ayırma molekül ağırlıklarına göre olduğundan ve Fc ile Fab nin mol ağırlıkları birbirlerine yakın olduğundan biz bu şekilde ancak papainle parçalanmayan kısmı etkilenmeden kalan IgG den ayırabiliriz. Fab ve Fc ihtiva eden Sephadex G 150 SF eluatı protein - A Sepharose ye uygulandığında iki pik vermektedir Şekil 4.

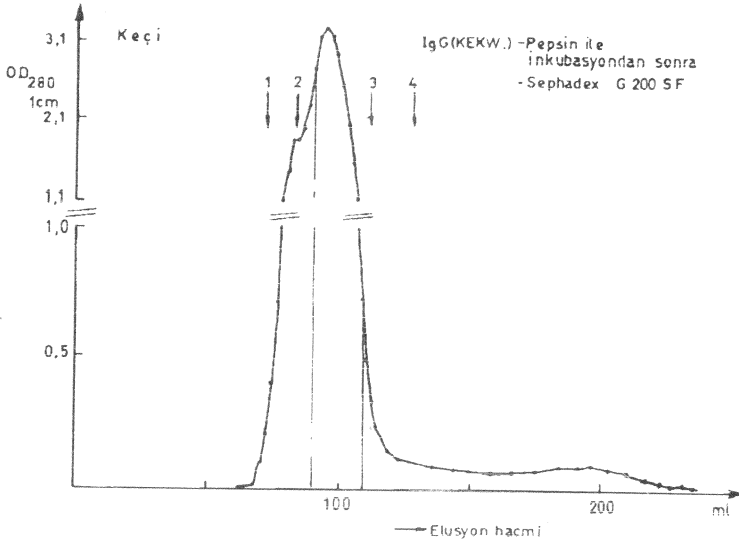
Pik A (Fab) başlangıç tamponu ile elue edilebilmekte, pik B (Fc) ise daha sonra pH ve tampon değişikliğiyle elue edilebilmektedir. Bunlar literatürde verilen değerlerle ve immunelektroforeziyle kontrol edilerek piklerin Fab ve Fc oldukları görüldü. Papainle inkube edilen IgG1 ayrıca Mıcusana göre (16) kesikli olarak anyon değıştirici kromatografisiyle fraksiyonlandırıldı. Başlangıç tamponu ile parçalanamayan IgG2 ve her iki alt sınıfın Fab fragmentleri ayrıldı, sonra tampon değıştirilerek parçalanmamış IgG1 ve her iki alt sınıfın Fc leri ayrıldı (Şekil 5).



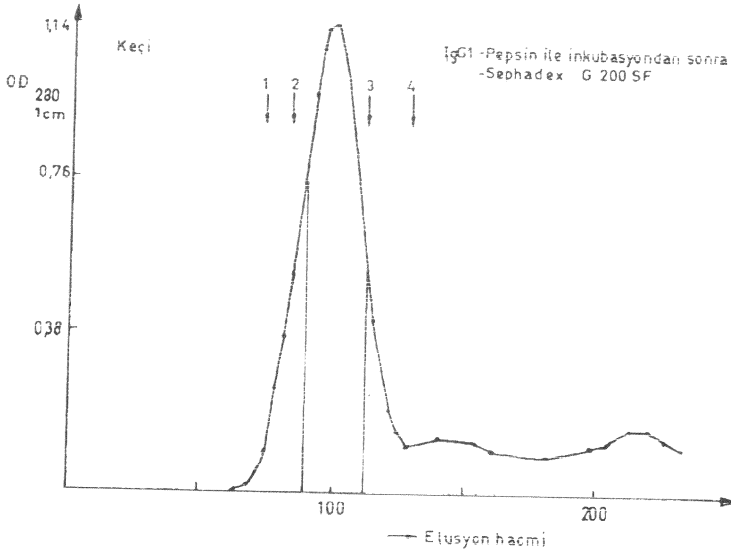
Şekil - 5 : Keçi IgG sinin papainle inkubasyonu sonucu oluşan fragmentlerin anyon değıştirici kromatografisi (Fraktogel TSK DEAE 650) ile ayrılması.

Pepsinle oluşan IgG hidrolizinin kromatografiyle ayrılması

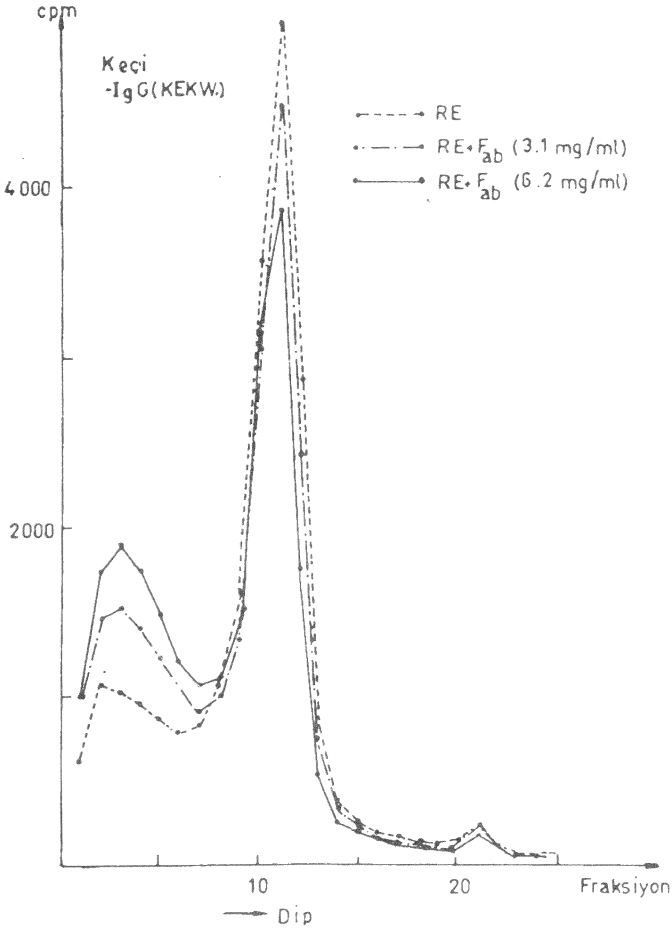
Kekwickle ayrılan IgG nin (Şekil 6) ve Sephadexle ayrılan IgG nin (Şekil 7) de pepsinle fragmentlerinin ayrılması görülmektedir. Önceden Sephadexten geçirilerek ayrılan IgG1 in tripsinle IgG den ayrılacak parçardan biri F (ab') 2 dir ve bunun beklenen mol ağırlığı 120 000 - 70 000 g/mol aralığındadır. Şekil 6 ve Şekil 7 deki piklerin moleköl ağırlık bölgeleri buna uymaktadır.



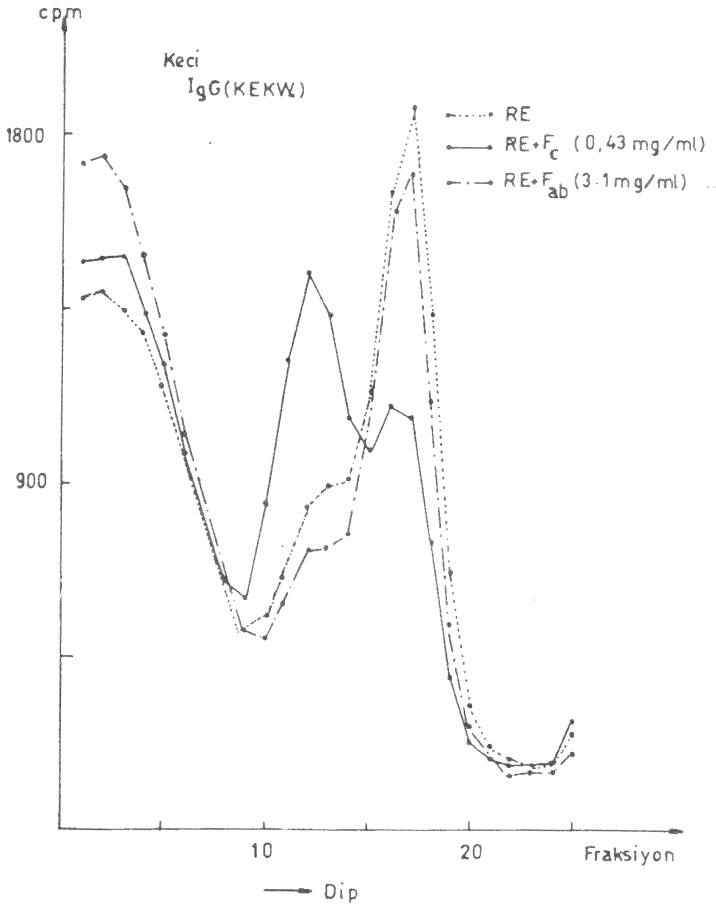
Şekil - 6 : Pepsinle inkubasyon sonucu oluşan IgG (Kekwick) fragmentlerinin Sephadex G 200 SF ile ayrılması.



Şekil - 7 : Daha önce serumdan Sephadexle ayrılan IgG nin pepsinle inkubasyonundan oluşan fragmentlerin Sephadex G 200 SF kolon kromatografisiyle ayrılması.

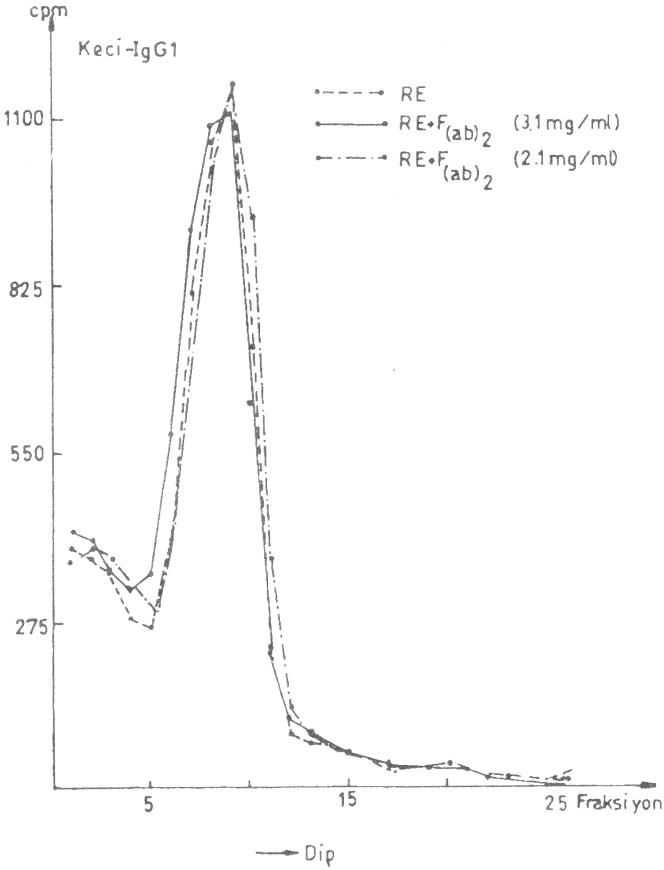


Şekil - 8 : Fab fragmentlerinin östradiol reseptörle inkubasyon sonucu fragmentlerin östradiol reseptörü ile kompleks oluşturmadığının sakkaroz gradiyent santrifugasyonu ile gösterilmesi (pikin tepe noktasında sağa veya sola kayma yok).



Şekil - 9 : IgG fragmentlerinin (Fc, Fab) östradiol reseptörle kompleks oluşturduğunun sakkaroz gradiyent sentrifugasyonu ile gösterilmesi.

Östradiol reseptörün Fab ile inkubasyonu Şekil 8, Fc ile inkubasyonu Şekil 9, F(ab)₂ ile inkubasyonu Şekil 10 da görülmektedir.



Şekil - 10 : Östradiol reseptörün (Fab)₂ ile inkubasyonundan herhangi bir kompleks oluşmadığının sakkaroz gradiyent santrifüjü ile gösterilmesi.

Şekil 9 dan da anlaşılacağı gibi östradiol reseptör yalnız Fc ile bir kompleks oluşturmakta ve bu oluşan kompleks şeker gradiyent santrifüjündeki önceki östradiol reseptör pikinin yerinde değil, oluşan kompleksin sedimentasyon katsayısına bağlı olarak farklı yerde görülmektedir. Diğer fragmentelerde bu özellik görülmemektedir. Tip II IgG nin östradiol reseptörüyle birleşen IgG1 alt sınıfı, proteaz enzimlerle parçalanıp, oluşan fragmentler değişik kromatografik metodlarla ayrılıp östradiol reseptörle inkube edildiğinde görülüyor ki IgG1 molekülünün

bağlanmadan sorumlu tarafı Fc dir. Bunun metabolik olaylarda bir anlamının olup olmadığı ve niçin Fc tarafının östradiol reseptörü bağlayıpta Fab tarafınına bağlamadığı bu araştırmanın her ne kadar amacı ve konusu değilsede Fc tarafındaki oligo sakkaridlerin bu bağlanmada rol oynadığını zannediyoruz.

REFERENCES

1. Yamaguchi, T., Arao, M., Fukase, M. : *Acta Endocrinol.*, **127** (3), 267 -70 (1992).
2. Calef, G., Abarca - Quinones, J., Feuillade, F., Beaune, J., Dubre, G., Orrico, M., Barnabassohi, N., Kouyoumdjian, J. C. : *Breast Cancer Res. Treat.*, **21** (1), 63 - 75 (1992).
3. Tinnikov, A. A., Bazhan, N. M., Yakovleva, T. V. : *Steroids.*, **57** (4), 174 - 7 (1992).
4. Jungblut, P. W., Jensen, E. V. : *Endocrinol.*, **78**, Abstratct 30 (1966).
5. Jungblut, P. W., Hützel, I., Desombre, E. R., Jensen, E. V. : *Wirkungsmechanismen der Hormone* (ed) Karlson, P., 55 - 86. Springer Verlag, 1967.
6. Peker, I., Siede, H. : *J. Pharm. Univ. Mar.* (baskıda)
7. Perek, I., Siede, H. : *J. Pharm. Univ. Mar.* (baskıda).
8. Porter, R. R. : *Biochem. J.*, **73**, 119 (1959).
9. Grey, H. N., Kunkel, H. G. : *Biochemistry*, **6**, 2326 (1967).
10. Utsimi, S. : *Biochem. J.*, **112**, 343 (1969).
11. Prahl, J. W., Porter, R. R. : *Biochem. J.*, **107**, 753 (1968).
12. Tan, M., Epstein, W. W. : *Science*, **139**, 53 (1963).
13. Van Eyk, H. G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 243 (1966)
14. Escribano, M. J., Haddada, H., Vaux Saint Cyr : *J. Immunol. Meth.*, **52**, 63 (1982).
15. Siraganian, R. P., Fox, P. C., Berenstein, E. H., *Meth. Enzymol.*, **93**, 17 (ed.) van Vunakis, H., Academic Press, 1983.
16. Micusan, V. V., Borduas, A. G. : *Immunochemistry*, **12**, 345 (1975).
17. Notkins. A. L., Mage, M., Ashe, W. K., Mahar, S. : *J. Immunol.* **100**, 314 (1968).

Bu çalışma Hannoverdeki Max Planck enstitüsünde Max Planck bursuyla gerçekleştirilmiştir.