

TIP II IgGNİN ÖSTRADIOL RESEPTÖRÜ BAĞLIYABİLEN ALT SINIFININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION ABOUT SUBCLAS OF TYP II IgG WHICH IS ABLE TO BIND ESTRADIOL RECEPTOR

Ismail PEKER* – Holger SIEDE **

SUMMARY

Estradiol receptor forms a complex with typ IgG from some animals sera. We separated the subclasses of these IgG typ II by used anion exchange chromatography and incubated each fraction with östradiol receptor. We showed that the responsible subclasses for complex formation is IgG1 of IgG typ II.

Key words : estradiol receptor, immunoglobulin G

ÖZET

Östradiol reseptörün bazı hayvanların serum IgG leri ile kompleks oluşturduğu bilinmektedir. Biz. tip II diye adlandırılan bu IgG nin alt sınıflarını anyon değişim kromatografisi kullanarak ayırdık ve bunları ayrı ayrı östradiol reseptörü ile inkube ettiğimizi kompleks oluşturmadan sorumlu olan tarafın tip II IgG nin IgG1 alt sınıfı olduğunu gördük.

GİRİŞ

Hormon reseptörler kanser ve özellikle göğüs ve prostat kanserlerinin teşhis, tedavi ve takibinde önemli yer tutar (1,3). Östradiol reseptörünün biyolojik aktivitesini ve metabolizma içinde katıldığı reaksiyonları tam anlayabilmek için, onun diğer proteinlerle olan etkileşmelerini incelemek gerekir. Östradiol reseptörün saflaştırılması sırasında immunoglobulinlerin östradiol reseptöre bağlandıkları ve elde edilen üründe safsızlık olarak buldukları gözlenmiştir. (4, 5).

* Dr. İ. Pakize Tarzi Hormon ve Biokimya Laboratuvarı, Valikonağı Cad. No. 86 Nişantaşı / İSTANBUL

** Max - Planck Enstitüsü, Experimentelle Endokrinologi, Hanover / ALMANYA

Hekim, N ; domuz uterusundan elde ettiği östradiol reseptörün bazı keçi serumlarının IgGleri ile nonspesifik olarak bağlandığını göstermiştir (6). Bizim araştırmak istediğimiz konu östradiol reseptörü nonspesifik bağlayan IgG nin hangi alt gruba ait olduğunu araştırmaktır. Bunun için DEAE - Servacel 23 SS anyon değişim kromatografisi kullanarak IgG yi IgG1 ve IgG2 olarak ayırdık. Ayrılan fraksiyonları dializ edip, liyofize ettik ve kompleks oluşum oluşmadığını sakkaroz yoğunluk gradiyenti yaparak araştırdık.

MATERİAL VE METOT

Rayoaktif işaretli 17β -(6,7 - trityum) östradiol, spesifik aktivitesi 55 Curie / mmol, Amersham Buchler, aktif kömür ve diyaliz zarları Sigmadan, radyoaktif ölçümler için kullanılan sızıntılatör " Xylofluor" Bakeradan diğer kimyasallar Merckten satın alındı. Fotometrik ölçümler Gliford 2600 (Gillford Instrument LA , USA) ya da DU - 8 (Beckman Instruments , Inc., Fullerton , USA ile yapıldı.)

Yoğunluk Gradiyenti

IgG tip II nin östradiol reseptörü ile kompleks oluşturup oluşturmadığı lineer şeker (sakkaroz) gradiyenti ile araştırıldı. Bütün gradiyentler için SW-60 rotoru kullanıldı.

3.7 ml % 10 - % 45 gradiyent çözeltisi , 0.2 ml örnek , 50 000 devir / dak, 1°C , 20 saat, Beckmann L2 - 65B ultrasantrifüjü ile gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi sona erdikten sonra, gradiyent % 55 (g / g) şeker (sakkaroz) Na N_3 , % 10 (g / v) sitrik asit, 3 ml metilen mavisi çözeltisi ile eşit hacimlerde (150 μl) fraksiyonlandırıldı ve radyoaktiviteleri ölçüldü. Sakkaroz gradiyentini Lineeritesi her fraksiyonunun kırılma indeksi ölçülerek kontrol edildi.

PROTEİN ÖLÇÜLMESİ

Protein konsantrasyonu biuret metodunun modifiye edilmiş şekli olan GOA (7) metoduna göre ölçüldü.

Radyoaktivite ölçülmesi

Çinde 10 ml xylofluor bulunan polietilen şişelere ne fazla 150 μl olacak şekilde radyoaktif östradiolle işaretli nümuneler ilave edildi. Sızıntılayon spektrofotometresinde Tri, carb 3310 , 3320 , 3330 ile % 39.46 verimle sayıldı. Bütün sayımlar en az 5 dakika süreyle yapıldı.

Mikrozomların elde edilmesi

Mezbahadan alınan domuz uteruslarının bağ dokuları ve yumurtalıkları kesilerek ayrıldı, kıyım makinesinden çekilerek ufatıldı, bu doku, hacminin iki katı tamponla (0.25 mol / l sakkaroz 0.01 mol / l sodyumfosfat (Na_3PO_4), pH = 7.5 süspanse hale getirildi. Ultraturaxla 10 x 10 saniye ve 20 saniye aralaklarla homojen hale getirildi. Homojenat 1°C de ultrasantrifüjde (Tip 335 , 15000 devir 6 dak, 17500 g, 30 dak) santrifüj edildi, üstte kalan kısım 1°C , SW 40, 40 000 devir / dakika, yaklaşık 200 000 g , 180 dak, ikinci bir santrifüje tabii tutuldu. Üst kısım atıldı. Sedimert iki defa yukarıda bileşimi verilen tomponla yıkandı. Tüpler ters çevirilerek arta kalan sıvı akıtıldı ve tüpün iç cidarı kağıt mendil ile kurutuldu, daha sonra kullanılacağı zamana kadar - 20°C de saklandı.

Mikrozomal östradiol reseptörünün ekstraksiyonu, radyoaktif östradiolle işaretlenmesi ve IgG nin mikrozomal östradiol reseptörüyle kompleks oluşturup oluşturmadığı daha önceki çalışmalarımıza göre incelendi . (8).

IgG alt sınıflarının global olarak ayrılması

Bu işlem ya Kekwick (9) metoduna göre yada sefadeks G 150 SF kromatografisi ile yapıldı (10 , 11). Liyofize edilen serumlar 10 mM Na_3PO_4 , 5 mM NaN_3 , pH 7.5 tamponu ile çözüldü (3 g lyoffizat / 100 ml tampon ve çözünmeyen kısım santrifüj edilerek ayrıldı (Tip 35, 20 000 devir / dak, 20 dak, 20°C). Örneğin sefadeks G 150 SF ile ayrılması literatürde anlatılanlara göre yapıldı (5, 11, 12). 5 cm x 49 cm lik bir kolona 17.8 ml / saat hızla, 6.8 ml / fraksiyon olacak şekilde verildi ve 0.1 M sodyumasetat, 5 mM NaN_3 , pH 5.5, oda temperaturünde elüe edildi. 280 nm de fraksiyonların absorpsiyonları ölçüldü.

IgG nin alt sınıflarına ayrılması

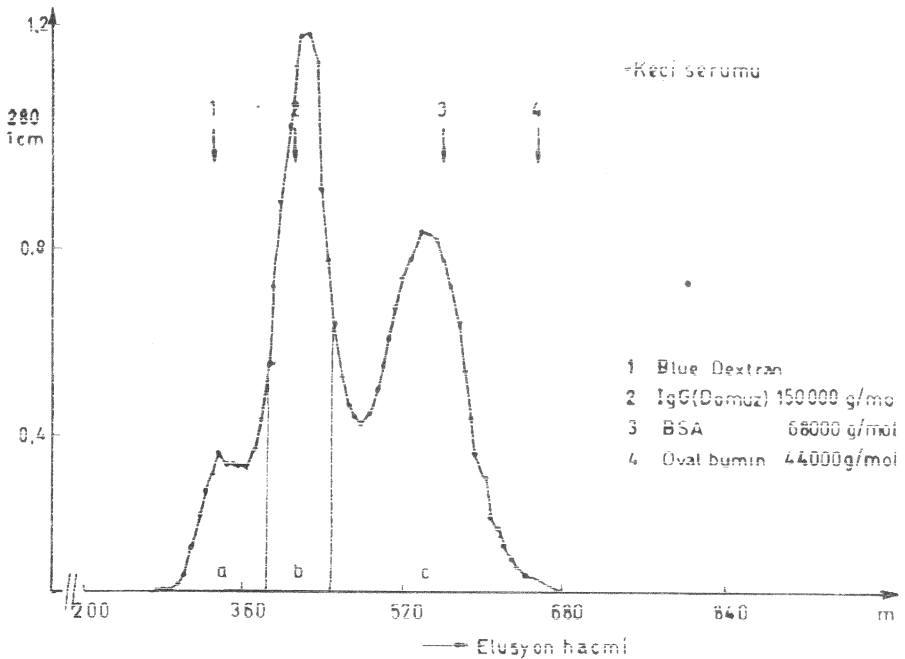
IgG alt sınıfları (keçide) anyon değişim kromatografisi ile ayrıldı (13 , 14). İyon değiştirici, selüloz esaslı olup kullanmadan önce 0.5 M NaOH ile sırayla yıkandı (her biri 5 ml /g kuru ağırlık, 5 dak cam bagetle karıştırıldı, 30 dakika bekletildi, üst kısım emilerek atıldı. 10mM Na_3PO_4 , 5 mM NaN_3 , pH 7.5 tamponu ile 3 defa yıkandı ve su trompu ile gazı alındı ve bir cam kolona uygulandıktan sonra literatüre göre (13,14) diskontunürlü olarak elüe edildi. 600 ml 10 mM Na_3PO_4 , 5 mM

NaN_3 , pH 7.5 (başlangıç tamponu), sonra 300 ml başlangıç tamponu + 0.2 M KCl ve en sonunda 300 ml başlangıç tamponu + 0.75 M KCl ile elue edildi. Akış hızı 18.3 ml / saat , fraksiyon hacımları 7.3 ml. Fraksiyonların 280 nm de Quarz küvette absorpsiyonları ölçüldü. IgG ihtiva eden fraksiyonlar Na_2SO_4 ile % 18 (g / v) ile çöktürüldü, çökelti mümkün mertebe küçük bir hacimde 10 mM Na_3PO_4 , 5 mM NaN_3 , pH 7.5 ile çözüldü ve aynı tampona karşı diyaliz edildi.

Immunelektroforez için örnekler Minicon concenatör B 15 (Amicon Corp., dan vers, USA) ile yaklaşık 100 defa konsantre hale getirildi.

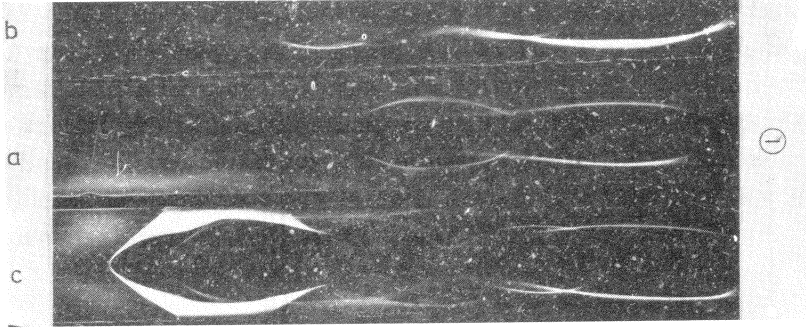
TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Keçi serumunun sefadesks G 150 SF kolonundan elue edilişi (Şekil - 1) de görülmektedir. Buradaki grafikten a, b, c pikleri immunelektroforezle kontrol edildiğinde a ve b fraksiyonlarında albumin bulunmadığı görülmektedir. Buna karşılık c fraksiyonunda albumin miktarı artmıştır (Şekil - 2).

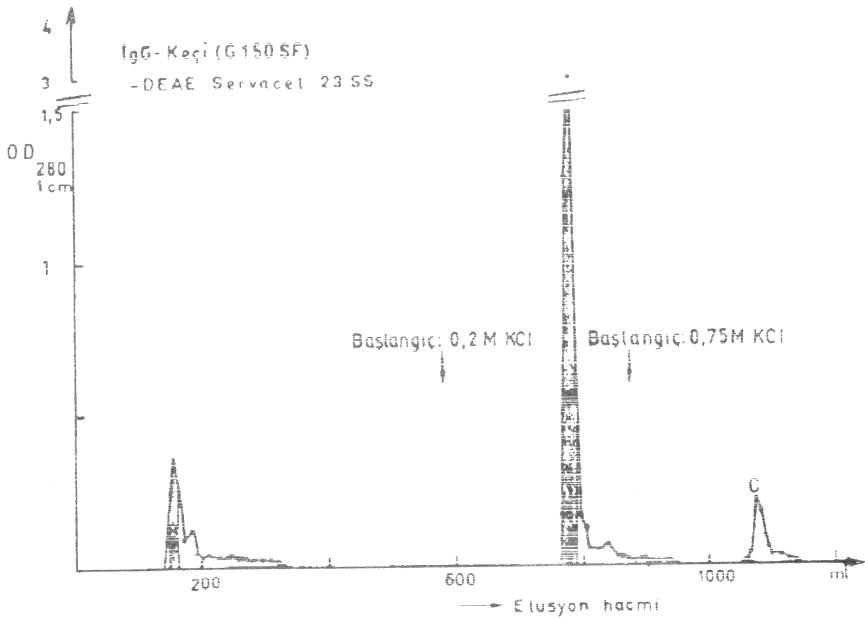


Şekil - 1 : Keçi serumunun sefadesks G 150 SF üzerinde ayrılması.

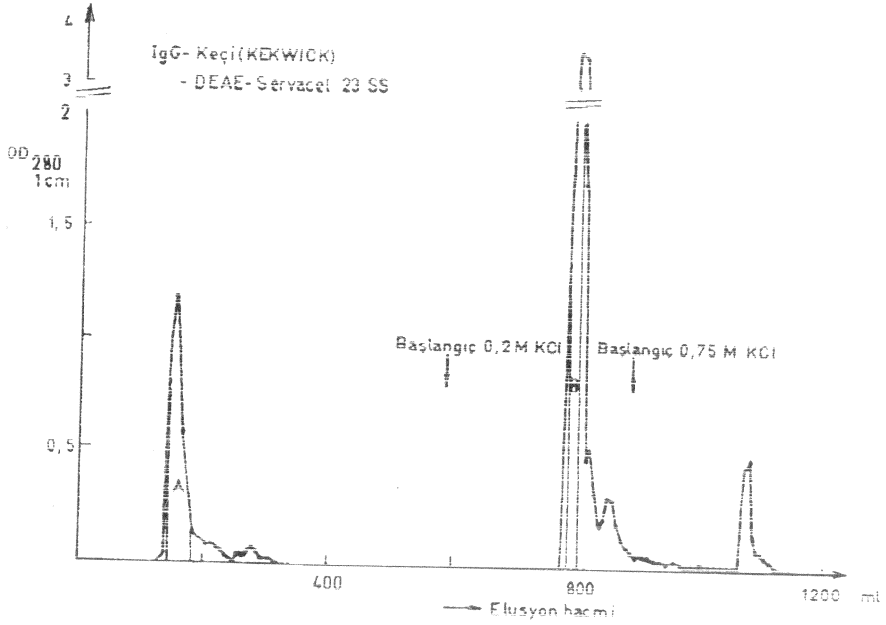
a, b, c Şekil 1 deki fraksiyonlar antiserum : antikeçi tavşan serumu Keçi IgG alt sınıfları anyondeğişim kromatografisi ile ayrıldı Şekil 3 (a, b, c).



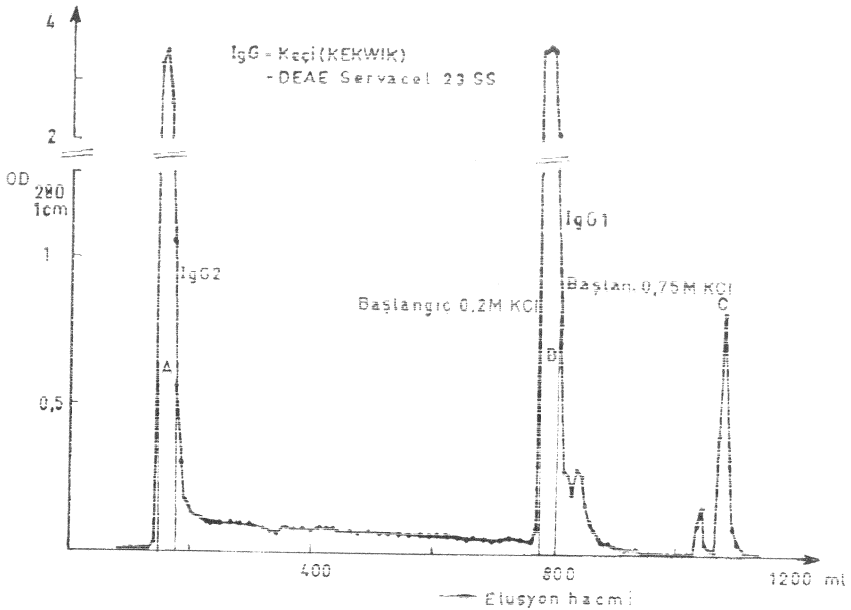
Şekil - 2 : Sefadex G 150 SF fraksiyonlarının immunelektroforezi .



Şekil - 3a : Sefadex G 150 SF ile ayrılan IgG nin (fraksiyon b) DEAE - Servacel 23 SS üzerinden elue edilmesi (1 nolu keçi).

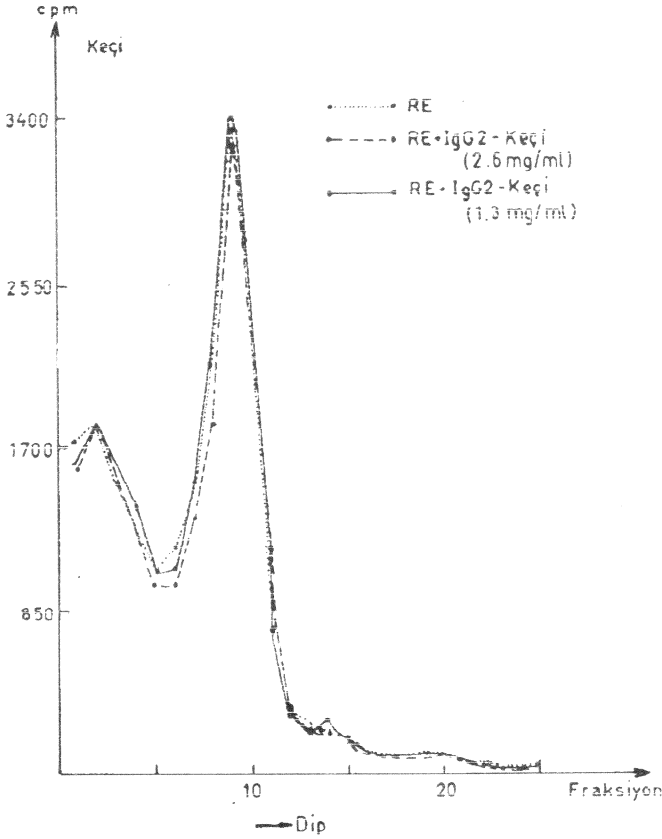


Şekil - 3b : Kekwic prepatının DEAE - Servacel 23 SS e uygulanması.



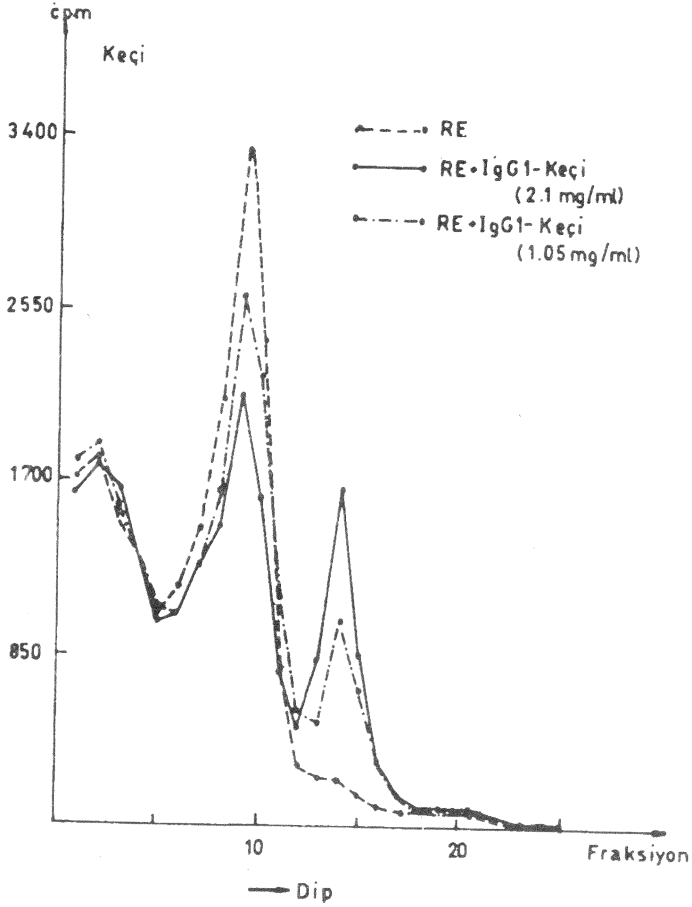
Şekil - 3c : Kekwick prepatının DEAE - Servacel 23 SS e uygulanması (keçi 2).

Literatürdeki bilgilere göre pik A IgG2 , pik B ise IgG1 i gösterir (13). Bunları immunelektroforeziyle birbirinden ayırmak pek mümkün değildir. IgG2/ IgG1 oranı denenen iki keçide büyük ölçüde değişmektedir. 1 nolu keçide bu oran 1 : 6.8 iken 2 nolu keçide 1 : 1.2 (g /g) dır. Ayrıca önce sefadexle IgG nin ayrılıp sonra anyon değişim kromatografisi uygulanması, Kekwick prepratının direkt olarak anyon değişim kromatografisine uygulanmasına göre bir üstünlüğü olmadığı Şekil 3a ve Şekil – 3b nin mukayesesinde anlaşılmaktadır. DEAE üzerinden ayrılan ilk pik IgG2 mikrozomal östradiol reseptörle herhangi bir kompleks oluşturmamaktadır (Şekil – 4).



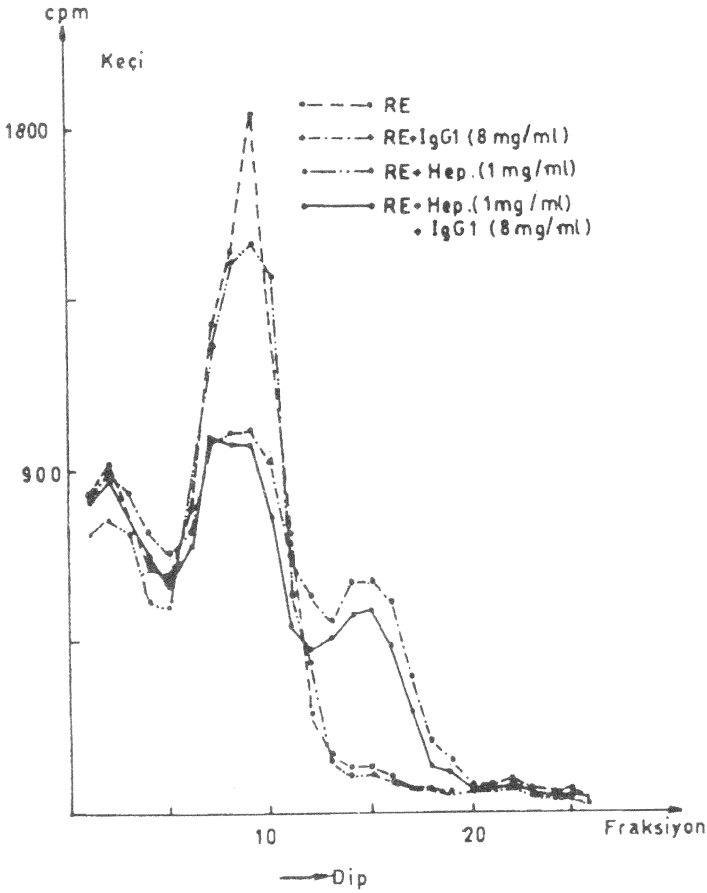
Şekil – 4 : IgG2 nin östradiol reseptörle inkube edildikten sonra yoğunluk gradiyent testi ile kontrolü.

Buna karşılık IgG1 ise tamamen farklı sonuç vermektedir (Şekil 5). Burada kompleks oluşumu IgG1 in konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.



Şekil - 5 : IgG1 in östradiol reseptörle kompleks oluşması.

Östradiol reseptörün heparin sefaroza bağlandığı bilindiğinden (15), heparinin IgG Tip II ye östradiol reseptörle kompleks oluşturmada bir etkisi olup olmadığı araştırıldı (Şekil - 6).



Şekil - 6 : Heparinin kompleks oluşumuna etkisi.

Şekilde görüldüğü gibi heparinin kompleks oluşumuna herhangi belirgin bir etkisi yoktur. Sonuç olarak östradiol reseptörle kompleks yapan IgG tip II nin bağlanmadan sorumlu fraksiyonunun IgG1 olduğunu görmüş olduk.

KAYNAKLAR

1. Yamaguchi, T., Arao, M., Fukase, M. : *Acta Endocrinol*, **127** (3), 267 (1992).
2. Calcif, G., Abarca - Quinones, J., Feuilhade, F., Beaune, J., Dubre, G., Orrico, M., Barnabas- Sohi, N., Kouyoumdjian, J. C. : *Breast Cancer Res Treat.*, **21** (1). 63 (1992).
3. Tinnikov, A. A., Bazhan, N. M., Yakovleva, T. V. : *Steroids*, **57** (4), 174 (1992).
4. Jungblut, P. W., Jensen, E. V. : *Endocrinology*, **78** abstract 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. Hekim, N., jungblut, P. W. : *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364** , 607 (1983).
7. GOA : *Scand. J. Clin. Lab - Invest.*, **5**, 218 (1953).
8. Peker, I., Siede, H. : *J. Pharmol* (1993) baskıda.
9. Kekwick, R. A. : *Biochem.*, **34**, 1248 (1940).
10. Baumstark, J. S. : *Arch. Biochem. Biophys.* , **125**, 837 (1968).
11. Tan, M. Epstein, W. V. : *Science*, 139, 53 (1963).
12. Van Eyk, H. G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 243(1966).
13. Gray, G. D., Mickelson, M. M., Crim, J. A.: *Immunochemistry*, **6** , 641 (1969).
14. Micusan, V. V., Borduas, A. G. : *Immunochemsitry*, **12** , 345 (1975).
15. Meyer, H. H. D. : Dissertation, Technische Universität, Hannover (1980).