

IMMUNOGLOBULINLERİN ESTRODIOL RESEPTÖRE NON SPESİFİK BAĞLANMASI VE BUNUN CİNSLER İÇİNDEKİ SIKLIĞI

THE NONSPECIFIC BINDING OF IMMUNOGLOBULIN TO ESTRODIOL RECEPTOR AND ITS POSSIBILITY IN DIFFERENT SPECIES

Ismail PEKER* – Holger SIEDE**

SUMMARY

We separated immunoglobulin from goats by Kekwick method and incubated with radioactive estradiol labeled estradiol receptor (ER). We investigated whether immunoglobulin formed a complex with ER or not with sucros gradient centrifugation. We investigated how often type II IgG (IgG which bind estradiol receptor nonspecific) exists in different species.

Key words : nonspecific binding, estradiol receptor, immunoglobulin

ÖZET

Keçi serumundan immunglobinleri kekwick metodu ile ayırdık. Bunları radyoaktif östradiolle işaretli estradiol reseptörle inkube ettik. immunglobinlerin östradiol reseptörle kompleks oluşturup oluşturmadığını şeker gradiyenti ile araştırdık. Dana, tavşan, domuz, keçi ve koyunda hangi sıklıkla tip II IgG (östrodiol reseptöre non spesifik bağlanan IgG) nin bulunduğunu araştırdık.

GİRİŞ

Hormon reseptörler kanser ve özellikle göğüs ve prostat kanserlerinin teşhis, tedavi ve takibinde önemlidir (1- 3). Östradiol reseptörün biyolojik aktivitesini ve metabolizma içinde katıldığı reaksiyonları tam anlayabilmek için onun diğer proteinlerle olan etkileşmelerinin bilinmesi gereklidir. Östradiol reseptörün saflaştırılması sırasında immunglobulinlerin estradiol reseptöre bağ-

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

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

landıkları ve elde edilen üründe saflık bozucu olarak buldukları göz-
lendi (4- 5). Protein ve hormon reseptörlerin ayrılıp saflaştırılmasında
ve karakterize edilmesinde antikorların önemi gittikçe artmaktadır (6 -
14). Dr. Hekim N, domuz uterusundan elde edilen estradiol reseptöre
karşı keçide poliklonal antikor elde etmek için yaptığı çalışmalarda im-
munize edilmemiş keçilerin globulinleri ilede östradiol reseptörün nons-
pesif olarak bağlandığını görmüştür (15 - 16). Buradaki bağlanma uya-
rılma sonucu olmadığı için antijen bağlayan fragmentte IgG nin tavuk
progesteron reseptörü ile kompleks oluşturduğu O'Malley ve arkadaşları
tarafından bildirilmiştir (17). Yaptıkları 17 deneyde IgG progesteron re-
septör kompleksi 0.15 M KCl çözeltisinde stabil kalmakta ve tuz kon-
santrasyonu 0.3 M KCl 'e çıkarıldığında ancak 1 / 3 'ü stabili kal-
maktadır. Max Planck Enstitüsünde N. Hekimin yaptığı çalışmalara
göre iki tip IgG preparatı tanımlanmıştır. IgG tip I, düşük iyonik kuv-
vette östradiol reseptörle çok zayıf bir kompleks oluşturmakta ve bu
kompleks yüksek iyonik kuvvette (0.3 M KCl) kaybolmaktadır. Buna kar-
şılık IgG tip II, yüksek iyonik kuvvette de estradiol reseptör / IgG komp-
leksini oluşturmaktadır. Bizim görmek istediğimiz, daha önce tip II diye
adlandırılan ve östradiol reseptörle yüksek iyonik kuvvetli ortamda bile
non spesifik olarak bağlanabilen IgG'nin hayvan türlerinde yaklaşık
hangi oranlarda bulunduğunu araştırmaktır.

MATERİAL VE METOT

Radyoaktif işaretlenmiş 17 - β - (6,7-³H) östradiol, spesifik ak-
tivitesi 55 Ci/mmol, Amersham buçler, aktif kömür ve diyaliz zarları
Sigma'dan , radyoaktif ölçümler için kullanılan sızıntılatör "Xylofluor"
Baker'dan, diğer kimyasallar Merck'ten satın alındı. Fotometrik öl-
çümler Gilford 2600 (Gilford Instruments LA , USA) veya DU -8 (Beck-
man Instuments, Inc. Fullerton, USA) ile yapıldı.

Yoğunluk gradiyenti

IgG tip II'nin Östradiol reseptörle kompleks oluşturup oluş-
turmadığı lineer şeker gradiyenti ile araştırıldı. Bütün gradiyentler için
SW - 60 rotoru kullandı. 3.7 ml gradiyent çözeltisi, 0.2 ml örnek, 50 000
devir / dak, 1°C, 20 saat, Beckmann L 2-65 B ultrasantrifüjü ile ger-
çekleştirildi. Santrifüj işleminden sonra, gradiyent 55% (g/g) şeker (sak-
karoz), 0.1 % (g/v) NaN₃, 10% (g/v) sitrik asit, 3 ml metilen mavisi çö-
zeltisi ile eşit hacimlerde (150 μ l) fraksiyonlandırıldı ve radyoaktiviteleri
ölçüldü. Sakkaroz gradiyentinin lineritesi her fraksiyonun kırılma in-
deksi ölçülerek kontrol edildi.

Protein Tayini

Protein konsantrasyonu Biüret metodunun modifiye edilmiş şekli olan GOA(18) metoduna göre ölçüldü.

Radioaktivite ölçülmesi

İçinde 10 ml Xylofluor bulunan pelitelen şişelere en fazla 150 µl olacak şekilde radyoaktif östradiolle işaretli numuneler ilave edildi. Sizing spektrofotometresinde Tri - carb 3310 , 3320, 3330 % 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. Kıyma makinesinde çekilerek ufaltıldı. Bu dokunun hacmi iki katı tamponla (0.25 M Sakkaroz, 0.01 M Sodyum fosfat, pH : 7.5) süspanse edildi.

Ultraturax'la 10 x 10 s ve 20 s aralarla homojen hale getirildi. Homojenat 1 °C'de ultrasantrifüjde (Tip 35, 1500 rpm, 17500 g, 30 dak) santrifüj edildi. Üstte kalan kısım 1°C, SW 40, 40000 devir / dak) santirfüje tabi tutuldu. Sedimentten iki defa yukarıda kalan sıvı akıtıldı ve içleri klinexle kurutuldu. Bu sediment mikrozom olarak -20°C'de kullanılacağı zamana kadar saklandı.

Mikrozomal östradiol reseptörün ekstarksyonu

Mikrozom sedimentlerinin herbiri 1.5 ml, 0.01 M Sodyum fosfat (NaP), 0.05 M DTT (Ditiotritol), 0.005M NaN₃ ile karıştırıldı. 0°C'de bir gece su banyosunda döndürüldü. Mikrozomal partiküller santirfüjle SW 60, 1°C, 50 000 rpm, 60 dak, santrifüj edilerek ayrıldı. Üstte kalan kısım 0.01 M NaP, 0.01 M DTT, 5 mM NaN₃, pH : 7.5 tamponuna karşı diyaliz edildi. IgG / mikrozomal östrodiol reseptör 900 µl açık kahve renkli mikrozom ekstaktı, 100 µl, 2.10⁻⁷ M trityumla işaretli estrodiol çözeltisi (tampon I içinde) karıştırıldı ve Eppendorf reaksiyn tüplerinde 2 saat 0 - 4 °C 'de döndürülerek inkübe edildi. Sonra 100 µl 1.25 % (g/v) elenmiş odun kömürü, 0.5 % (g/v) dekstarn T 70 (Tampon I içinde) ilave edildi. 10 dakika döndürülerek inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek üstte kalan kısım ayrıldı. Tampon I çözeltisi içindeki 3 M KCl çözeltisi son konsantrasyonu 0.3 M KCl olacak şekilde ayarlandı.

İmmunglobulin G'nin östradiol reseptöre karşı aktivitesini şöyle denedik : 150 µl radyoaktif östradiolle işaretli mikrozomal ekstakt (Tampon I + 0.3 M KCl, protein konsantrasyonu 4.5 - 5 mg / ml) + (150 µl IgG) karışımı eppendorf tüpünde 1.5 saat çevrilerek 4 °C 'de inkübe edildi. Bundan 200 µl yoğunluk gradiyentine katıldı ve 50 µl si radyoaktif verimi anlamak için direkt ölçüldü. İmmunglobulinlerin fraksiyonlandırılması, Kekwick metoduna göre yapıldı.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

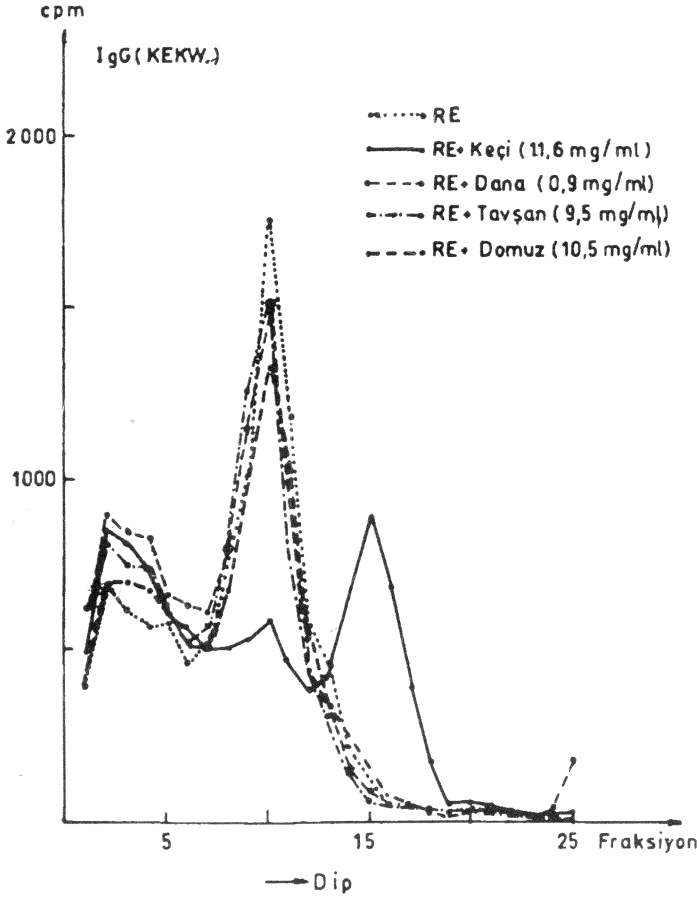
Yoğunluk santrifüj gradiyentine göre radyoaktivite profili grafiklerde görülmektedir (Grafik 1,2,3,4,5). Yoğunluk gradiyenti 10 - 45% (g/g) sakkaroz, 10 mM NaP, 5 mM NaN₃, 10 mM DTT, 0.3 M KCl içinde değişik türler için yapılmıştır. Numunenin konduğu yerde aktif kömürle alınmayan bir miktar serbest östradiol kalmaktadır. Bu 1-5 fraksiyonları arasındadır. 9 ve 10 cu fraksiyonlarda pik en büyük değerini almaktadır ve burada sedimantasyon sabiti 4-4.5 S (Swedberg) dir. % 10 - 45 'lik şeker gradiyentinde monomer reseptörün şekli yaklaşık 3.5 S ve dimer şekli yaklaşık 4.5 S dir. Östradiolün IgG'ye reseptör olmaksızın bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilmiştir (Grafik 5).

Bir Kompleksin Oluşması : Trityumla işaretli estradiolreseptör / IgG kompleksinin oluşması reseptör pikini azaltır, sedimantasyon doğrultusunu değiştirir (19). Bu değişim konsantrasyona bağımlı olarak (Grafik 6) da görülmektedir. IgG konsantrasyonu 5.8 mg/ml iken ER piki azalmakta buna karşılık ER ve IgG nin oluşturduğu ve Grafik 6 da 12 ila 18 ci fraksiyonlar arasında yeni bir pik oluşturmaktadır, işte bu pik RE - IgG kompleksinin pikidir. IgG konsantrasyonu 5.8 mg / ml den 11.8 mg / ml ye çıkarıldığında birinci pik dahada azalmakta ikinci pik ise artmaktadır, buda bize ortamda serbest reseptör azalırken kompleks oluşumunun arttığını gösterir. Grafik 2 de 19/ 20 nci fraksiyonlarda görülen küçük pik muhtemelen mikrozomal ekstaksiyon sırasında tam ayrılmayan mikrozomal parçalara tutunmuş östradioldür. Denenen hayvanlarda bulunan tip I ve tip II IgG sayıları Tablo I ' de görülmektedir.

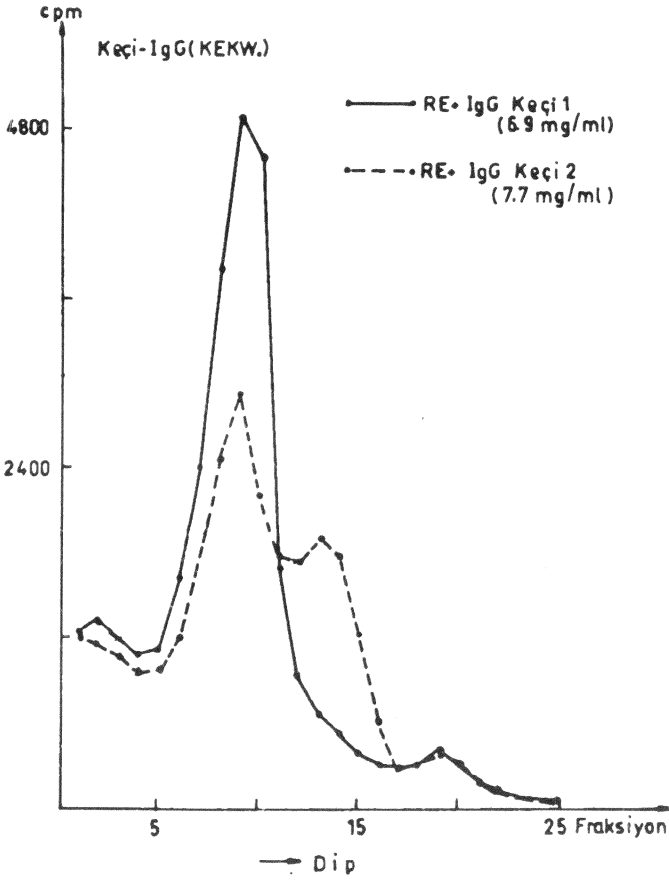
Tablo - I : Denenen hayvanlarda tip I ve tip II IgG bulunma sıklığı

CİNS	SAYI	IgG TİP II	IgG TİP I
Dana	1	-	1
Tavşan	2	-	2
Domuz	8	-	8
Keçi	11	5	6
Koyun	10	6	4

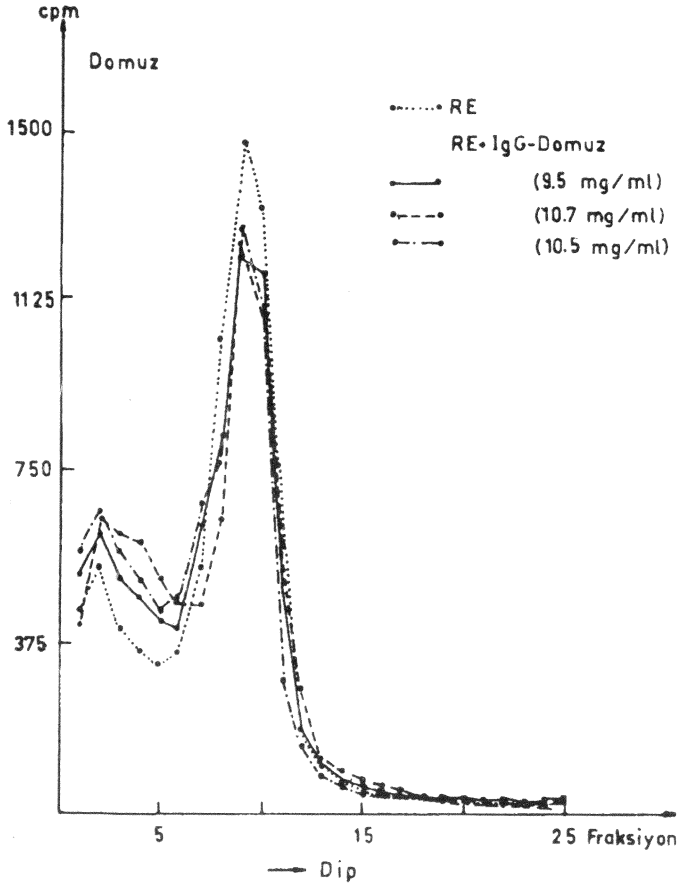
Tip II IgG nin değişik hayvan türlerinde aranması (Grafik 1) de görülmektedir. Burada yalnız keçi ve koyun IgG leri östradiol reseptörle kompleks oluşturmakta dana, tavşan ve domuz reseptörle kompleks oluşturmadığından reseptörün pikini değiştirmemektedir. Değişik keçiler denendiğinde (Grafik 2) keçi 1 reseptör pikini değiştirmezken (tip I) keçi 2 yeni bir oluşturmaktadır (tip 2). Buda bize her keçinin tip 2 IgG ye sahip olmadığını gösteriyor. Aynı işlem değişik domuzlarda denendiğinde (Grafik 3) ve değişik koyunlarda denendiğinde (Grafik 4) de görülmektedir. Radyoaktif östradiolün IgG ile östradiol reseptörün varlığında ve yokluğunda etkileşmesi (Grafik 5) ve IgG konsantrasyonunun IgG - östradiol reseptör kompleks oluşumunda etkili olduğu (Grafik 6) da görülmektedir.



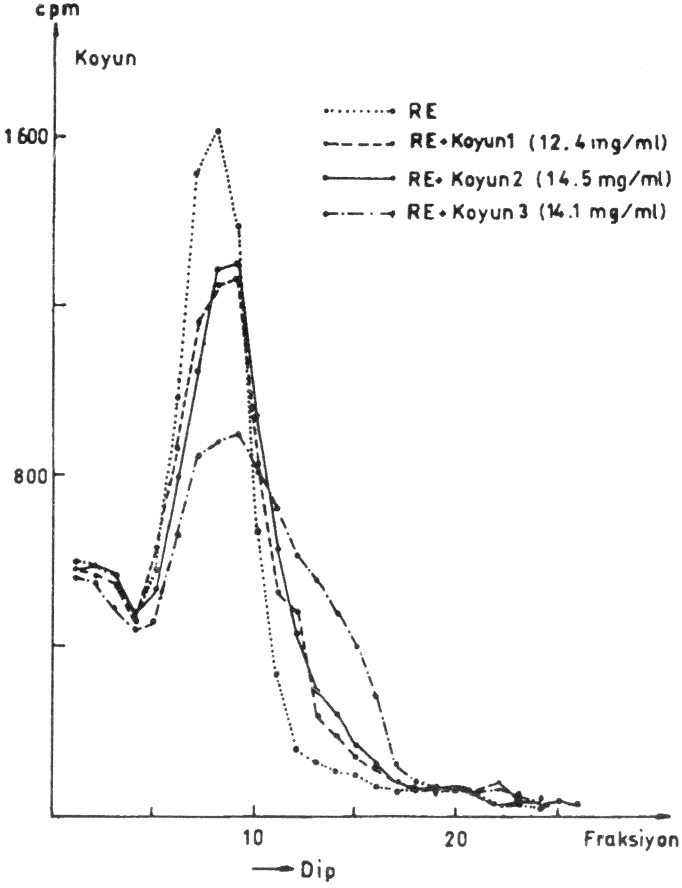
Grafik - 1 : Farklı cinslerde tip II IgG nin aranması, % 10- 25 lineer sakaroz gradiyenti, (0.01 M NaP, 0.01 M DTT, 0.005 M NaN₃, 0.3 M KCl, pH = 7, SW 60,50 000 devir / dakika, 20 saat, 1°C)



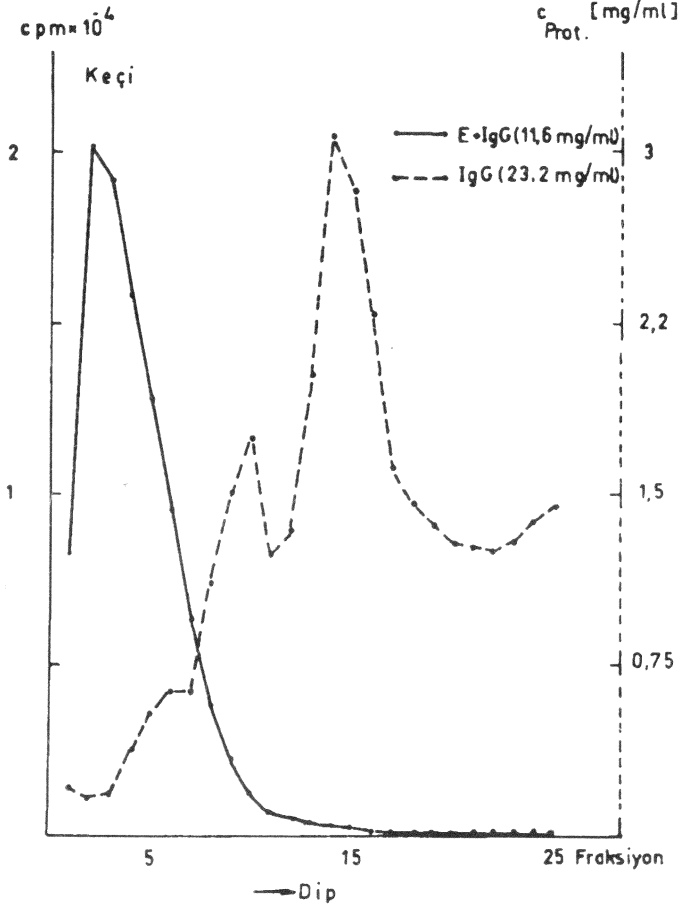
Grafik - 2 : Değişik keçilerde denendiğinde IgG östradiol reseptör etkileşmelerinin sakkaroz gradiyent santrifügasyonu ile denemesi. Keçi 1 in IgG si östradiol reseptörle tek bir pik verirken, keçi 2 IgG si 2 ayrı pik vermektedir. Sağ taraftaki ikinci pik RE - IgG kompleksinin pikidir.



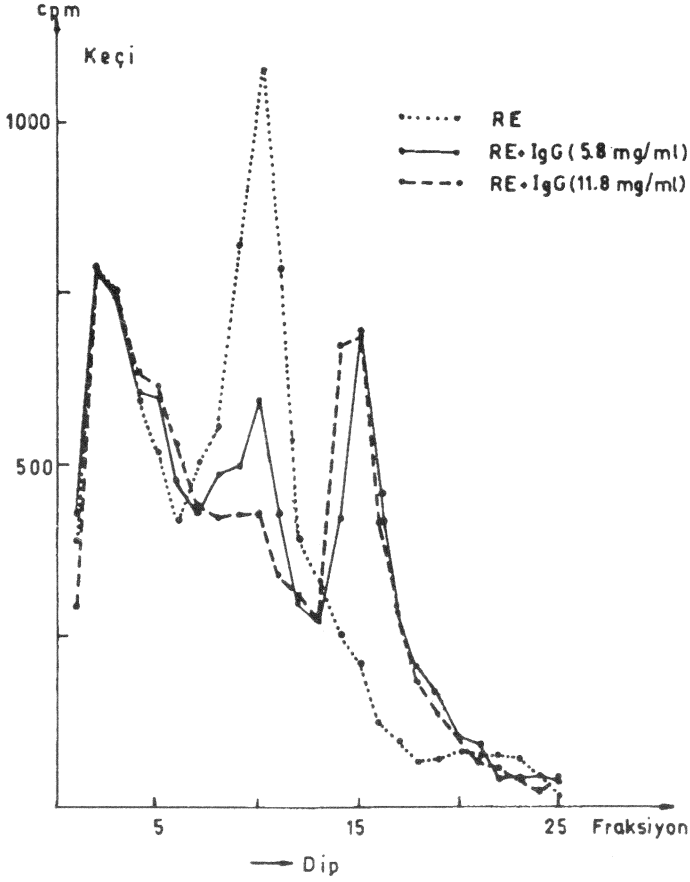
Grafik - 3 : Değişik domuzlarda denendiğinde IgG östadiol reseptor etkileşmeleri. Domuzların hiçbirinde tip II IgG bulunmamaktadır. Pik tek olup, kompleks oluşmasını gösterecek ikinci bir pik görülmektedir.



Grafik - 4 : Değişik koyunlarda denendiğinde IgG östradiol reseptor etkileşmeleri. Sakkaroz gradiyent santrifügasyonunda 3. koyunda tip II IgG bulunmaktadır.



Grafik - 5 : Radioaktif östadiolün IgG ile östradiol reseptörün varlığında ve yokluğunda etkileşmesi. IgG yalnız başına sakkaroz gradiyent sentrifugasyonu yapıldığında farklı fraksiyonlarda ölçülen protein konsantrasyonundan 15 - 16 cı fraksiyonlarda protein piki vermektedir. Radioaktif östradiolün IgG ile sakkaroz gradiyent sentrifugasyonunda ise ilk fraksiyonlarda yani tüpün üst kısmında radioaktivite piki görülmektedir. Buda östradiolün IgG ile reseptör olmaksızın herhangi birkompleks oluşturmadığını göstermektedir.



Grafik - 6 : IgG konsantrasyonunun IgG - östadiol reseptör kompleks oluşumuna etkisi.

SONUÇ

Denediğimiz hayvanlarda tip IgG yi yalnız keçi ve koyunlarda bulduk. Tip II IgG yi ilk bulan Hekim N, bunu yalnız keçilerde bulmuştu (15). Ayrıca keçi ve koyunların ancak bir kısmında tip II IgG vardı (Tablo I). Tip II IgG nin metabolik olaylarda bir anlamının olup olmadığı ve neden bazı hayvanlarda bulunup diğerlerinde bulunmadığı bu çalışmanın kapsamında değildir.

Bu çalışma Max - Planck Enstitüsü bursuyla Almanya'nın Hanover şehrinde bulunan Max - Planck Enstitüsü experimentelle endokrinologie laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu çalışmanın yapılmasında yaptığı yardımlardan dolayı Prof. Dr. Jungblut'a teşekkürü bir borç bilirim.

KAYNAKLAR

- 1.Yamaguchi, T., Arao, M., Fukase, M. : *Acta Endocrinol.*, **127** (3), 267 - 70 (1992)
- 2.Calaf, 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 - 75 (1992).
- 3.Tinnkov, A. A., Bazhan, N. M., Yakovleva, T. V. : *Steroids*, **57** (4), 174 - 7 (1992).
- 4.Jungblut, P. W., Jensen, E. V. : *Endocrinology*, **78** (1966); abstarct 30.
- 5.Jungblut, P. W., et all (edit) : *Karlson*, p. 55 - 86, Springer Verlag, 1967.
- 6.Fellows, R. E., Eisenbarth, G. S. : *Monoclonal Antibodies in Endocrine - Research*. Raven Press, 1981.
- 7.Moncharmont., B., Su, J. L., Parikh, L. : *Biochemistry*, **21**, 6916 (1982).
- 8.Szendro, Sierralta, W. D., jungblut, P. W, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 345, 1599 - 1610. (1983).
- 9.Sutcliffe, J. G., Shinnick, Th. M., Green, N., Lerner, R. A. : *Science* **219**, 660 (1983).
10. Fox, L. L., et all : *FEBS letters*, **63** (1), 71 (1976).
11. Coffey, A. I., KING, R. J. B. : *J. Steroid Biochem.*, **14**, 1229 (1981).
- 12.Okret, S., et all : *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 205 (1981).
- 13.Greene, G. L., et all : *Proc. Natl. Acad. SCI.*, **74** (9), 3681 (1977).
14. Greene, G. L., Fitch, F. W., Jensen, E. V. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77** (1), 157 (1980).
15. Hekim, N., Jungblut, P. W. : *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 607- 611 (1983).
16. Szendro, P. I., Hekim, N., Meyer, H. H. D., Jungblut, P. W. : *Acta endocrinologica*, **99**, **Suppl. 246**, 48 (1982).
17. Weigel, L., Pousette, A., Schrader, W. T., O'Malley, B.W. : *Biochemistry*, **20**, 6798 (1981).
18. GOA, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 218 (1953).
19. *Biochemistry*. Mathews - van Holde, 157, 1990.

(Received April 10, 1993)