

KONTRAKTİL PROTEİNLER İMMÜNOLOJİSİ

Sabri Güngör*

Anahtar Kelimeler: Kontraktil Proteinler

Key words: Contractile Proteins

ÖZET

Bu yazıda özellikle çeşitli otoimmün hastalıklarda olmak üzere birçok değişik hastalık gruplarında ortaya çıkan düz kas antikorlarının hangi tür kontraktil proteinlere karşı oluştukları ve bu antijenik proteinlerin yapıları ile düz kas antikorlarının immünofloresan yöntemle saptanma tekniği gözden geçirilmiştir.

SUMMARY

The Immunology of Contractile Proteins

In this article, smooth muscle antibodies which are produced against various contractile proteins in various diseases. The nature of these antigenic proteins and immunofluorescent antibody technic have been reviewed.

GİRİŞ

Son yıllarda birçok otoimmün hastalıkta ve otoimmün olmayan diğer bazı hastalık gruplarında kas liflerine ve komponentlerine karşı antikorlar oluştuğu gösterilmiştir. İlk kez 1965 te Holborow ve Johnson tarafından kronik aktif hepatitli hastaların serumlarında bu tip antikorlar saptanmış ve bunu izleyen yıllarda çeşitli araştırmacılar bu tip antikorların başka hastalık gruplarında da ortaya çıktığını göstermiştir (1,23).

Kas dokusu, bağ dokusu desteği ile bir arada tutulan binlerce fibrillerden oluşmuştur. 1-40 mm arasında değişen uzunluktaki bu fibrillerin kalınlıkları 10-100 mikrometre arasındadır. Her kas fibrili sarkoplazma denilen bir protoplazma kitlesinden ibaret olup, sarkolemma adı verilen ince bir zarla çevrilidir. Sarkolemma altında birkaç çekirdek bulunur. Sitoplazma, miyofibril denilen kasılabilir (contractile) uzun filamanlarla doludur. Her kas fibrilinde binlerce miyofibril bulunur. Her miyofibrilin içinde de belirli bir düzen içinde yerleşmiş çok sayıda kontraktil yapılar bulunur. Başlıca aktin ve miyozin denilen bu kontraktil proteinler ve bunların komponentleri kas kasılmasında esas rolü oynarlar. Bir miyofibrilin içinde yaklaşık 1500 kadar miyozin ve bunun iki katı kadar aktin filamenti bulunur.

* Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Prof. Dr.

Miyozin ve aktin filamentleri iki elin karşı karşıya gelen ve iç içe geçen parmakları gibi yerleşmiş buldukları için koyu ve açık şeritler halinde birbirini izleyen görünüm arzederler. Elektronmikroskopik kesitler incelendiğinde açık renkli görünen şeritler aktin yapısında olup, polarize ışığa karşı izotrop yapıdadır ve bu nedenle "I bandı" adını alır. Miyozin filamentini içeren koyu şeritler ise aynı zamanda aktin iplikçiklerinin uçlarını da taşır ve polarize ışığa karşı anizotrop karakter gösterdiğinden "A bandı" olarak isimlendirilir. Miyozin filamentlerinden yanlara doğru çıkıntılar (cross-bridges) uzanır. Bunlar miyozin filamentleri boyunca yan yüzlerde çıkıntı halinde bulunurlar, sadece miyozin filamentlerinin tam ortasındaki küçük bir bölümde görülmezler. İşte bu yan çıkıntılar ile aktin filamentleri arasında meydana gelen etkileşim sayesinde kasılma olur. Aktin filamentleri Z çizgileri veya membranı ile birbirlerine bağlanır. Z çizgileri aynı zamanda yan yana gelmiş bütün lifçikler de birbirine bağlar. Bu şekilde dizilişle aktin ve miyozin bölgeleri yan yana gelmiş olur. Sonuçta bir kas lifinde enine yerleşim açık ve koyu görünümlü şeritler oluşur. İskelet kasının ve kalp kasının çizgili görünümü, bu bir tek fibrildeki çizgili görünümün bütün bir kas lifinde de dikkati çekecek bir biçimde ortaya çıkmasına bağlıdır. Bir kas lifinde iki Z bandı arasındaki bölüme sarkomer denir. Düz kaslar, çizgili kaslara göre daha küçük liflerden (2.5x50-100 mikrometre) yapılmışlardır. İskelet kasındaki aktin, miyozin ve benzeri yapılar aynı şekilde düz kaslarda da vardır. Ancak düz kaslardaki aktin ve miyozin filamentleri iskelet kasındaki uzaysal dizilişi ve tekrarlanışı göstermezler. Düz kaslardaki filamentler çoğunlukla lifin uzun eksenine doğrultusunda kısmen de rastgele açılar yapacak durumda yerleşmişlerdir.

Sarkoplazmanın bileşimi olağan hücre içi yapılarından oluşur. Sarkoplazmik matris içinde bol miktarda Ca, K, Mg, ve PO 4 iyonları ve protein yapısında enzimler bulunur. Miyofibriller arasında ve onlara paralel durumda yerleşmiş mitokondriler bulunur. Bu yerleşimin önemi büyüktür. Zira kasılma sırasında gerekli enerji mitokondrilerden sağlanır. Ca iyonları tarafından aktive edilen ATP, ADP'ye çevrilir. Böylece açığa çıkan repolarizasyonla gevşeme olur. Sarkoplazma içinde zengin bir endoplazmik retikulum ağı bulunur. Bu ağın zenginliği kasın hızlı kasılması ile doğru orantılıdır.

Kas lifi içinde yani sarkoplazmada ayrıca "Transvers tübül sistem" veya "T borucukları" denilen bir şebeke daha vardır. Bu borucuklar kas lifinin bir ucundan öbürüne uzanır ve lifin dışına çıkarak ekstrasellüler sıvının hücre içinde devamını sağlar. Kas lifi zarında bir aksiyon potansiyeli yayıldığı zaman bu akımlar T borucukları sistemi yolu ile kas lifi içine iletilir ve bu akımlar kasın kasılmasına neden olur.

Kas kasılmasında temel rolleri açıklanmış olan kontraktıl proteinler başlıca şunlardır (3):

1. Aktin (microfilament): Bunun "Tropomyosine" ve "Troponin" diye iki alt grubu vardır.
2. Miyozin (microtubulus): Bunun da "Light meromyosine" ve "Heavy meromyosine" diye iki subüniti vardır.

3. Skeletin (intermediate filament)
4. Janin
5. Vimentin
6. Dekamin
7. Desmin

KONTRAKTİL PROTEİNLERİN MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ:

Miyozin filamenti: (20-25 nm) Miyozin filamentlerinin herbiri molekül ağırlığı 450.000 olan miyozin moleküllerinden yaklaşık 200 kadarının bir araya gelmesinden oluşmuştur. Oldukça iyi antijeniktir. Bir miyozin molekülünün iki bölümü vardır. a) Light meromyosine b) Heavy meromyosine.

Hafif meromiyozin bölümü iki peptid zincirinden ibaret olup, bunlar bir sarmal halindedirler. Ağır meromiyozin de iki parçadan oluşmuştur. Bunlardan birisi hafif meromiyozinde olduğu gibi bir çift sarmal, diğeri ise bu sarmalın ucuna eklenmiş olan bir baş kısmıdır. Ağır meromiyozin bölümleri cross-bridges'leri yani yan çıkıntıları oluşturur. Hafif meromiyozin ise miyozin filamentlerinin gövdesini teşkil eder (3,4,5).

Aktin filamenti: (6 nm.) Bu da kompleks bir yapıdadır ve üç ayrı kısmı vardır:

a) Aktin b) Tropomyosine d) Troponin

Aktin filamentinin omurgası çift şeritli F-aktin denilen bir protein molekülüdür. Bu çift şerit sarmal oluşturmuştur. Bu sarmalın herbir turunda ve bir şerit üzerinde yaklaşık 13 tane G-aktin molekülü yer alır. Ayrıca her G-aktin molekülüne ekli birer adet ADP molekülü vardır. Bu ADP molekülleri aktin filamentleri üzerindeki etkin noktalardır. Kasılmayı oluşturmak için miyozin filamentleri üzerindeki yan çıkıntılar, aktin filamentleri üzerindeki bu etkin noktalar ile irtibata geçerler (3,4,5).

Troponin-Tropomyosin kompleksi: Aktin filamentinin içerdiği diğer iki proteinden birisi, molekül ağırlığı 70.000 olan tropomiyozin moleküllerinin bir polimeridir. Bu F-aktin sarmalı arasındaki oluğa yerleşmiştir. Ayrıca her tropomiyozin molekülüne de diğer bir protein olan troponin molekülü eklenmiş bulunmaktadır. Troponin molekülünün Ca iyonlarına karşı büyük affinitesi vardır. Kalsiyum iyonlarının troponin ile birleşmesi kasılmayı başlatan bir tetik niteliğindedir (3).

Birçok hastalıkta bu düz adale kontraktil proteinlerine karşı antikolar oluşabilmektedir. (SMA: Smooth muscle antibody) (3,4,5)

- Kronik aktif hepatit (aktif dönemde % 60-70, remisyonlarda negatif)
- Primer biliyer siroz (% 45)
- Akut viral hepatit (% 80)
- İnfeksiyöz mononükleoz
- Mycoplasma pneumoniae enfeksiyonu
- Bazı malign tümör olguları
- Bazı sağlıklı kişiler (% 3-14).

Kuvvetli antijenik özellikteki bu kontraktıl proteinlerin nasıl olup ta konağa yabancı hale dönüşerek immün yanıtı neden oldukları kesin bir şekilde açıklanamamakla beraber olayda çeşitli etkenler suçlanmaktadır. Örneğin karaciğer hücresi membranında bulunan acto-miyosine benzeri protein viral enfeksiyonlar sırasında dejenerasyon olarak antijenik özellik kazanmakta ve dolayısıyla immün yanıtı yani antikor oluşumuna neden olmaktadır.

Düz kas antikoru içeren çoğu hasta serumları kas dışındaki doku kesitleri ile, örneğin hepatosit membranı, böbrek glomerülleri, tiroid epitel hücresi membranı, renal tübül kirpikli epitel, barsak lümeni epitelleri, safra yolları epitelleri, iyileşen yaralarda bulunan ve miyofibroblast denilen hücre sitoplazmaları ile reaksiyon verirler. Keza bu serumlar fibroblast kültür hücreleri ile de invitro reaksiyona girerler. Fibroblastların içerdiği sitoskeletal yapılardan mikrofilamentler intermediate filamentler ve mikrotubuluslardan en az birine karşı pozitif reaksiyon elde edilir.

İnsan trombositlerine karşı tavşanlardan elde edilen antiserum da düz adale ile reaksiyon vermektedir. Zira trombositlerin kontraktıl materyeli olan "thrombostenin", aktin içermektedir. Öte yandan lenfositlerin yüzeyindeki kontraktıl protein yapıları da düz kas antikoru oluşturacak antijenik aktivite göstermektedir (3,6).

Aktin, miyozin, tropomiyozin gibi kontraktıl proteinlerin saf olarak elde edilebilmesi, tavşanlarda bu kontraktıl elementlere karşı yüksek titrede antikor oluşturulabilmesi ve bu tavşan serumlarının insan serumları ile pozitif reaksiyon veren çeşitli doku kesitleri ile de benzeri reaksiyonu vermesi, bize düz kas antikorları ile reaksiyon veren hücre içi kontraktıl proteinlerin dokuların değişik hücrelerine dağılmış olduğunu anlamamıza sağlamıştır.

Çalışmalar rat böbrek, karaciğer ve mide kesitlerinin reaksiyonlarda güvenilir birer antijen olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bugün için düz kas antikoru saptanmasında en geniş şekilde kullanılmakta olan indirekt immünofloresan teknikte; antijen olarak fetal rat cilt ve akciğerlerinden hazırlanan fibroblast kültür hücreleri, ratlardan alınan karaciğer, böbrek ve mide kryostat kesitleri kullanılmaktadır (1,3,7,8).

Rat doku kesitleri veya fibroblast kültür hücreleri ile hazırlanan preparatlar, antikor arayacağımız hasta serumlarının önce 1/10 dilüsyonları ile oda ısısında ve rutubetli ortamda 30 dakika süre ile inkübasyona bırakılır. Daha sonra PBS birkaç kez değiştirilerek yıkanır. Fluoresein ile işaretli anti-human globulin ile yine oda ısısında ve nemli ortamda inkübe edilmek üzere kesitler üzerine dokuları kaplayacak şekilde birer damla damlatılır ve 30 dakika beklenir. Yine PBS ile ve magnetik çalkalayıcı yardımı ile aynı yıkama işlemi tekrarlanır. Lamların altı ve doku kesiti araları silinerek kurulanır, doku kesitlerinin kurumasına fırsat vermeden üzerlerine 1/9 luk PBS/glycerol karışımından damlatılır ve üzerleri lamelle kapatıldıktan sonra floresan mikroskopta, karanlık alanda, uygun bariyer ve uyarıcı filtreler kullanılarak incelenir.

1/10 dilüsyonla pozitif reaksiyon elde olunan serumların 1/40, 1/80, 1/160..... gibi ileri dilüsyonları yapılarak test tekrarlanır ve buna göre antikor titresi tesbit edilir.

Daha önce de sözü edildiği gibi düz kas antikorlarını geniş bir hastalık grubunda tesbit edebilmekteyiz. Ancak bu non-spesifikliğin yanında, değişik hastalıklarda bu antikorların farklı immünoglobulin sınıfından oldukları ve değişik subgrup kontraktil proteinlere karşı oluştukları saptanabilmektedir. Bu durumda anlamları çok daha önem kazanmaktadır. Örneğin kronik aktif hepatit düz kas antikorlarının aktine özgül yani anti-actin tabiatında ve daha çok IgG yapısında oldukları görülmektedir. Saptanan otoantikorun hangi tip düz kas antikoruna olduğu, hasta serumunun Vinblastin sulfatı (10 mcg/ml., 4 saat süre ile), Cytochalasin-B veya Colchicin (12 saat) gibi maddelerle işlemden sonra anlaşılabilir. Vinblastin ve Colchicin microtubulus'leri (myosine) inhibe ederken, Cytochalasin-B ile işlemden sonra serumda önceden saptanan düz kas antikoruna yine görülmeye devam ediyor ise, bu antikorun anti-myosine tabiatında olduğu anlaşılır (3,8,9,10).

KAYNAKLAR

1. HOLBOROW, E.J.: Smooth Muscle Autoantibodies in Viral Infections and Malignant Diseases. Proc. Roy. Soc. Med., Section of Clinical Immunology and Allergy. 65:481-484, 1972.
2. GABBIANI, G., BRASSERT, J.C., SCHNEEBERGER, J.C., KAPANCI, Y., TRENCHER, P., HOLBOROW, E.J.: Contractile Proteins in Human Cancer Cells, American Journal of Pathology, 83: 457-466, 1976.
3. HOLBOROW, E.J.: The Immunology of Contractile Proteins. Membrane Alterations as Basis of Liver Injury. Falk Symposium 22; Popper, H., Bianchi, L., WERNER, R.: MTP Press Ltd., 227-233, 1977.
4. ANDERSEN, P.: Indirect Immunofluorescent Studies of Smooth Muscle Antibodies. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C, 82: 577-584, 1974.
5. GABBIANI, G., RYAN, G.B., LAMELIN, J.P., VASSALI, P., MAJNO, G., BOUVIER, C.A., CRUCHAUD, A., LUSCHER, E.F.: Human Smooth Muscle Antibody, Its Identification as Antiactin Antibody and Study of its Binding to "Non-Muscular" cells. Amer. Journal of Pathol., 72: 3,473-483, 1973.
6. ANDERSEN, P., BEUTNER, E.H.: Defined Immunofluorescence Studies of Cytoplasmic antibodies. Int. Arch. Allergy, 43:780-790, 1972
7. ANDERSEN, P., SMALL, J.V., SOBIEZSEK: Studies on the specificity of Smooth Muscle Antibodies. Acto Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, 57-65, 1976.
8. FAGREUS-A., LIDMAN, K., NORBERG, R.: Indirect Immunofluorescence Staining of Contractile Proteins in Smear Cells by Smooth Muscle Antibodies; The Influence of Chelating Agents. Clin. Exp. Immunol., 20: 469-477, 1975.
9. TRENCHER, P., SNEYD, P., HOLBOROW, E.&.: Immunofluorescent Training of Smooth Muscle Contractile Protein Antigen in Tissue Other than Smooth Muscle. Clin. Exp. Immunol., 16: 125-136, 1974.
10. STEWARD, U.G., SCHRIEBER, J., MAHLMEISTER, C., WEBER, K.: Production of Specific Antibodies to Contractile Proteins and their use in Immunofluorescent Microscopy. Histochemistry. 46:229-236, 1976.