

CONCANAVALİN A'nın TRİTON X-114 İKİ FAZLI SİSTEMİYLE AYRILMIŞ DOMUZ KARACİĞER MEMBRANLARINDAN ELDE EDİLEN İKİ FARKLI İNSÜLİN RESEPTÖR POPÜLASYONU ÜZERİNDEKİ TESİRLERİ x

Dr. H.T. SESSİZxx

ÖZET

Domuz karaciğer membran ekstraktları Triton X-114 deterjanında solubilize edilerek kullanılan insülin reseptör proteinlerinin, A 14-J¹²⁵-İnsülin (MC) izleyiciliğinde natif insülini normal bağlamaları ve bu bağlanmalara muhtelif konsantrasyonlarda Concanavalin A (Con A) lektininin etkileri araştırıldı.

Con A 1 mg/ml. konsantrasyonda % 93'e varan bir inhibisyona sebep oldu. Normal insülin bağlanmasında K_D 10^{-10} nM'lik seviyeden ($3,6 \times 10^{-10}$) 10^{-9} nM'lik seviyeye ($1,1 \times 10^{-9}$) Con A'nın 10 µg/ml. lik konsantrasyonunda reseptörün insüline karşı ilgisinin azaldığını belgeledi.

TX-114 deterjan vasıtasıyla iki fazlı sistemde (Supernatan+pellet) ayrılabilen insülin reseptörlerine Con A'nın inhibisyon etkileri farklı şekilde görüldü. Şöyleki supernatan fazda kalan reseptörler hemen tamamen insülinin normal bağlanmasını sağlayabilirken, Triton fazı yani pellet = sedimentte nisbeten pek bağlama olmadı.

Dolayısıyla insülin reseptörlerinin iki ayrı popülasyon teşkil edebileceği kanaatine varıldı.

Gerek total membran ekstraktı, gerek supernatan fazda ve gerekse sedimentte Con A'nın inhibitör etkileri olmakla beraber en fazla bu inhibisyon sedimentte (Tx-114 fazında) görüldü. Bu da reseptörlerin iki ayrı popülasyon da toplandığını izlenimini vermektedir. Zira Con A' inhibisyonu ile reseptörlerin bağlanma eğrilerindeki yüksek affiniteli ve düşük kapasiteli ilk inen kısmı, düşük affiniteli ve yüksek kapasiteli hale gelmektedir. Bu fark da Tx-114 fazında en fazla olması dolayısıyla düşük affiniteli reseptör popülasyonu sedimentte toplanabilmiş olmalıdır.

(x) Bu çalışma, Biyokimya Departmanı, Diabet Araştırma Enstitüsü Auf'm Hennekamp 65 4-Düsseldorf-FRG'de yapılmıştır.

(xx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Öğr. Üyesi (Doç. Dr.)

Süpernatanda yüksek bağlanabilme affinitesi gösteren insülin reseptör popülasyonu nisbeten daha pürifiye edilmiş olarak radio-reseptör insülin tayin metodlarına da kaynak teşkil edebilir.

Experimental teferruatlar bulgular kısmında mevcuttur.

GİRİŞ:

Concanavalin A (Con A) insüline benzer aktiviteye sahiptir ve insülin reseptörleri vasıtasıyla bu etkiler gösterilmiştir (1,2,3). Intakt hücre ve de solubilize insülin reseptörleri Con A ile muamele edilince insülin bağlanma aktivitesinde de bir azalmayla, insan eritrositlerinde ise yüksek affiniteli insülin reseptör popülasyonunun eksilmesiyle sonuçlanır (4). Farelerin solubilize yağ hücreleri insülin reseptörlerine, insülin ve Con A'nın müştereken bağlandığı görülür (5).

İnsülinin intakt hücrelere bağlanmasının inhibe edilmesi, lektinlerle insülin reseptörleri arasındaki direkt reaksiyona bağlı olduğu kabul edilmektedir.

Deterjanda solubilize edilmiş insülin reseptörlerinin Con A ile muamelesi, insülin bağlama kapasitesinde bir azalmayla sonuçlanır. Karbohidrat ihtiva eden bileşiklerde olması gereken hususiyetlerin farklı bir şekilde bu lektinlerde olduğu fakat fonksiyonel olarak insülin reseptörlerine bağlandığında ortaya çıktığı farzedilmektedir. Con A insülin ve insülin reseptörlerine biri diğerini inhibe etmeden müşterek bağlanır.

İnsülinin reseptörlerine kompetitif olarak bağlanması, Scatchard'a göre grafiklendiğinde (4,7) tipik olarak kurvelineardır. Mamafih domuz karaciğer membranları üzerindeki insülin reseptörlerinin iki popülasyonlu olduğunu farketmek de mümkündür.

Laboratuvarımızda yakında yapılmış deneylerde, Triton x-114 iki fazlı sistemiyle ayrılmış insülin reseptörlerinin insülin için farklı affinite ve bağlama kapasiteli iki ayrı popülasyona sahip olduğunu gösterebildik (6 Hazırlanmakta).

Concanavalin A'nın bir lektin olarak sepesifik konsantrasyonlarıyla, insülin aktivitelerinde bazı gösterilere sahip olacaktır; şöyleki bu insülin reseptör popülasyonlarından birini inhibe ederken diğer popülasyona tesirsiz olabilir (4).

Scatchard eğrilerinin ince kısmındaki reseptör popülasyonu yüksek affinite ile birlikte alçak kapasiteye sahip iken, diğer kısmı düşük affinite ve yüksek kapasiteye sahiptir (4). Lektinlerin insüline benzer tesirleri için sorumlu mekanizma hâlâ tam bilinmemektedir. Con A ve insülinin, bağlanma bölgelerinin yapısal benzerliğinde bir payı olması gerektiği düşünülmektedir (4,3).

Lektinlerin bu aktiviteleri, insülinin aksiyonlarından ayrı olarak reseptör kalıntılarıyla de ortaya çıkar. Lektinle ve insülinlerin tesirleri arasındaki herhangi bir geniş ve mukayeseli çalışmaya pek az rastlanır. Ayrıca reseptörün daha ileri

pürifikasyonu için başlangıç materyeli olarak triton ekstraktları kullanılır. İnsülin konsantrasyonlarını tayin için radioreseptör testinde de bir triton ekstraktları bir kaynak olarak kullanılabilir (7).

Dolayısıyla, şimdiki çalışmanın amacı bu iki insülin reseptör popülasyonunun Con A ile nasıl interaksyon gösterdiği idi. İnsülin reseptör molekülünün karbonhidrat kalıntılarıyla Con A interaksyon göstermesi faraziyesinden giderek bu deneylerle iki popülasyon arasında bu fonksiyonel farklılıkların molekülün karbonhidrat mı yoksa protein kalınlarıyla mı ilgili olduğu gösterilebilir.

MATERYALLER

Domuz monokomponent (MC)- insülin ve Mono- 125J- (Tyr-A14)- insülin De-novo, Danimarka firmasından seçildi. Sığır serum albumini (Cohn Fraksiyonu V), Triton x-114 ve Con A Serva Feinbiochemica, Heidelberg firmasındandı. Enzymobead'ler BioRad, Münih, ve Na 125 I. New England Nuclear, Boston. Mass'den idi. Bütün diğer kemikaller analitik saflıktaydı.

YÖNTEMLER

Domuz karaciğer membranları önceden bildirildiği gibi % 1 Triton x-114 ile ekstrakte edilerek hızlandı (7). MC- insülinin iyodinasyonu 150-200 uci/ug spesifik aktivitede tarif edildiği gibi yapıldı (7).

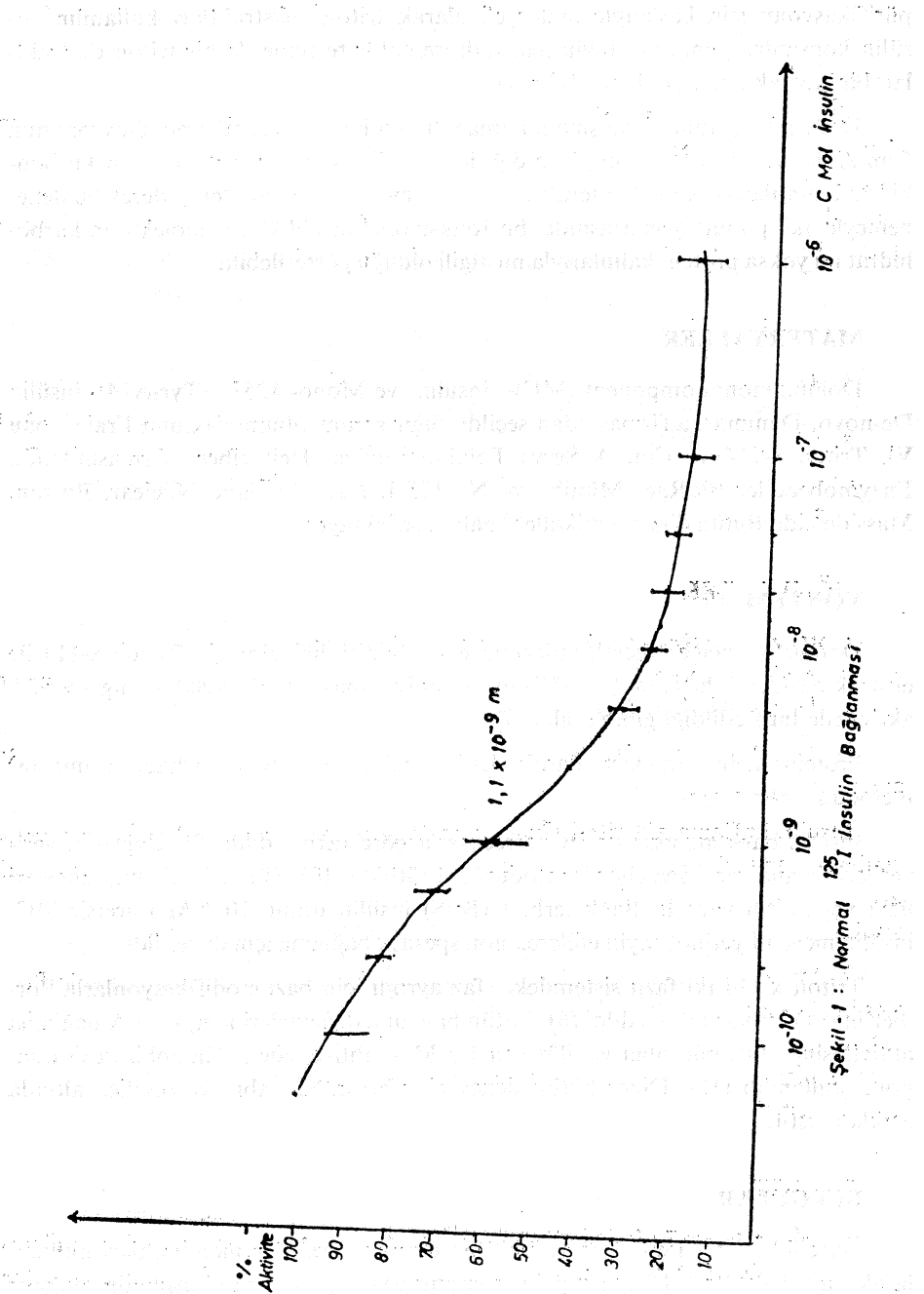
Protein tayini standart olarak LAB- trol ile Lowry ve arkadaşlarının (8) metoduna göre uygulandı.

İnsülin bağlama aktivitesi Cuatrecasas'a göre tayin edildi (9). Bağlama verilerinin analizleri Scatchard metoduyla yürütüldü (10). Bütün bağlama deneyleri üçlü veya altılı yapıldı. Bağlı/serbest (B:/S) insülin oranı, 10^{-6} M işaretsiz MC-insülin mevcudiyetinde tayin edilerek non spesifik bağlama için düzeltildi.

Triton x-114 iki fazlı sistemdeki faz ayrımı için bazı modifikasyonlarla Bordier'in (11) şeması takip edildi (6). Bütün bağlama denemeleri için, Con A bağlama aktivitesinde lüzumlu olan ve ilâveten 1 mM^{+2} ihtiva eden Gambhir'in G tamponu kullanıldı (13). Diğer bütün deneysel teferruatlar tablo ve şekiller altında açıklanmıştır.

BULGULAR

Öncelikle % 1 Tx-114 de solubilize domuz karaciğer membranları kullanılarak 10^{-10} ile 10^{-6} M arasındaki konsantrasyonlardaki natif insülinin reseptör proteinlerine normal bağlanması takip edildi. J¹²⁵-İnsülin aktivitelerinden % olarak ordinata geçirildiğinde insülin molaritelerine karşı kurvelinear bir eğri elde edildi (Şekil-1).



Şekil - 1 : Normal 125 I insülin Bağlanması

İnkübasyonlar, 15°C ta 16 saat süre ile uygulanmıştır. Her 300 ul reaksiyon karışımındaki membran ekstrakt proteininin konsantrasyonu (% 1 Tx-114 ekst-rakt) 25 ug. idi. Bağlama tamponu G:10 mM Mg Cl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM Hepes 50 mM Tris, 2mM EDTA, 10 mM Dekstroz, 1 mM mMnSO₄, 50 mM NaCl 5 mM KCl ve % 1 sığır albumini (BSA) ile pH= 7.8'e ayarlı kullanıldı; BSA taze olarak ilâve edildi. Reseptör proteinin dilüsyonu için (1 mg/1 ml. ye) A tamponu kullanıldı. A tamponunda (BSP) hariç yerine deterjan konsantrasyonunun idamesi için % 0,5 Tx-114 kullanıldı. Nihai Tx-114 konsantrasyonu inkübasyon karışımın-da % 0,08 ve reseptör konsantrasyonu 50 ug/0,3 ml. idi. Vakum filtrasyonu için Millipore filtreleri (EHWP, 1 um delikli) kullanıldı.

Spesifik bağlama, 1×10^{-6} M konsantrasyonda kullanılan sığır monokompo-nent insüline ait spesifik olmuyan bağlama çıkartılarak hesaplandı.

Bağlı J¹²⁵- İnsülünün presipitasyonu PEG (Polietilen glikoz) metoduna göre uygulandı. A-14 mono I¹²⁵-İnsülin konsantrasyonu 1×10^{-9} M idi. Con A reseptör eksikliğinde insülini bağlamaz. Con A, reseptörle beraber İnkübe edil-diğinde neticede gözle görülebilir bir karışım oluşur. 1 mg/ml. Con A konsantras-yonunda % 93'e kadar bir inhibisyon görülebilir. Con A'nın artan konsantrasyonu ile tıpkı kuvvelinear eğriye benzer tarzda yüzde spesifik bağlama aktivitesi azalır. Bu insülin bağlanmasındaki kayıp solüsyondan Con A'nın hasıl ettiği insülin reseptör proteininin uzaklaştırılmasını imha eder. Çözünür. fraksiyondan insülin bağlama kapasitesindeki kayıplar çözünmiyen radioaktivitedeki artışlarla ilgili olarak hesaba katılabilir.

Con A'nın 50 ug/ml konsantrasyonunda % 8 bir inhibisyon tesiri görülürken 500 ug/ml. Con A konsantrasyonunda % 89'a varan bir inhibisyon vardır (Tablo-1) Con A konsantrasyonu arttığında bağlı ¹²⁵I-İnsülin, 10 dakika sonra hızlı bir tarzda çözünür (Yayınlanmamış neticeler).

Tablo -1: Çözünür hale getirilmiş domuz insülin reseptörleri ile ¹²⁵I-İnsülünün bağlanmasına Con A'nın tesirlerinin titrasyonu.

İlâveler Con A (ug/ml)	Spesifik Aktivite Mol/mg. Protein x10 ¹⁴	% Revcovery (Bağlı J ¹²⁵ -İnsülin)
0	13 ± 0,4 ^x	100 ± 3
10	4,9 ± 0,1	38 ± 8
50	2,6 ± 1,3	20 ± 10
100	2 ± 0,5	15 ± 4
250	17, ± 0,8	13 ± 6
500	1,4 ± 1,1	11 ± 8
1000	0,9 ± 1,3	7 ± 10

Sonuçlar 300 ul. reaksiyon karışımındaki 3 tekrar edilebilen denemelerin ortalamasıdır. Herbir ferdi deneme de üçlü tarzda yapılmıştır.

x: Standart hata, en yüksek değerlerden en düşüklerini çıkartıp ikiye bölmek
bölmek suretiyle bulunmuştur. Standart deviasyonlar $SD = \sqrt{\sum_{i=1}^n \infty^2}$ formülün-
den hesaplanmıştır.

Çok yüksek Con A konsantrasyonları yavaş filtrasyonlara sebep olur. Bu sebeple standart deviasyonlar 1 mg/ml, gibi yüksek Con A konsantrasyonlarında çok geniş aralıktadır.

Domuz karaciğer membranlarından solubilize edilen insülin reseptörleri (R), 1×10^{-9} M A-14, 125 J-İnsülin ile inkübe edildi. Bu reseptör Proteinin konsantrasyonu 25 ug/0,3 ml idi ve inkübasyon 15°C 'ta 16 saat süreyle uygulandı. (Bak: Şekil 1)

Bağlama Tamponu: 0,1 Na PO₄, pH= 7,8 idi. Ayrıca içine % 1 BSA taze olarak ilâve edildi. Mono komponent domuz insülini 1.5×10^{-14} M ile 3×10^{-10} M arasında 12 kademede uygulandı. En son tüpler en küçük, eşik (ground) aktivitede bulunduklarından, spesifik bağlama (cmp) değerlerini bulmak için diğer cpm değerlerinden çıkarıldı.

Bağlı 125 J-insülin, PEG metodu ile tayin edildi. Tx-114 konsantrasyonu inkübasyon karışımında % 0,1 idi. Oluşan presipitat 20 p.s.i. lik basınç altında Millipore filtrelerinden süzülde.

Scatchard eğrisinin yüksek afiniteli kısmı 5 ug/ml. ve 10 ml. konsantrasyonda Concanavalin A kullanarak azaltılabilmektedir.

Tablo 2- Con A varlığında ve yokluğunda Scatchard eğrisinden çıkartılan bağlama parametrelerin karşılaştırılması.

İlaveler	K_D (nM)	R (pM)
1- Reseptör	0,36	0,64
2- Reseptör + 5 ug/.ml. Con A	0,87	1,17
3- Reseptör + 10 ug/lml. Con A	1,10	1,10

K_D : Dissosiyasyon sabiti (Reseptörün)

R : Maksimum bağlanma sabiti (Reseptörün)

K_D ve R değerleri Scathard eğrilerinin inen kısmından elde edilebilir. Eğrilerin eğimleri intrinsek affinite sabitleri (K_a 'ya eşittir. Abisis üzerindeki kesim noktaları herbir tipe ait n_1 ve n_2 gibi kenar sayılarını verir; burada insülin reseptör proteininin en yüksek affinite kısmı ile ilgilenilir.

herbir hümanize konsantrasyonların % 0,03-0,1 aralığında bulunmasına özel ille birlikte seki ilinde yapılan konsantrasyonlarda kullanıldı. Tx-114'un Con A solüsyonlarındaki konsantrant ille ve 125I- illelinin Q tamponu pH: Bu denemelerde bağlanma oranları olarak hesaplandı.

şekil-2: İnsulin bağlanmasına Con A'nın tesirleri

şekil-2: İnsulin bağlanmasına Con A'nın tesirleri

şekil-2: İnsulin bağlanmasına Con A'nın tesirleri

Con A konsantrasyonu (µg/ml)	İnsulin bağlanma oranı (%)	İnsulin bağlanma oranı (%)	İnsulin bağlanma oranı (%)	İnsulin bağlanma oranı (%)
0	100	100	100	100
10	95	95	95	95
20	90	90	90	90
30	85	85	85	85
40	80	80	80	80
50	75	75	75	75
60	70	70	70	70
70	65	65	65	65
80	60	60	60	60
90	55	55	55	55
100	50	50	50	50

insülin ve Con A'nın etkisi

insülin ve Con A'nın etkisi

insülin ve Con A'nın etkisi

insülin ve Con A'nın etkisi

insülin ve Con A'nın etkisi

insülin ve Con A'nın etkisi

Her bir değeri 3 il denemelerden ve herbir illeli deneme de üçlü karşılaştırmalı illeli-

Her bir değer 3 lü denemelerden ve herbir üçlü deneme de üçlü çalışılan inkü-
basyon tüplerinin birbirini destekleyen neticelerinden elde edilmiştir.

Spesifik cpm sayımları Mol insülin/mg. protein olarak normalize edilmiştir.

Con A konsantrasyonu arttıķa ^{125}I -İnsülin bağlanması gerek membran
ekstraktında (total), gerek supernatanda, ve gerekse pellet-formundaki sedimentte
azaldığı görüldü.

Ekstraktın ve süpernatanın spesifik bağlanmaları paralel azaldığı halde,
aksine pelletin bağlanması arttı (Tablo 3). Binaenaleyh görülmektedir ki Bütün
bakiye bağlanma tek bir fazda toplanmaktadır. Membran ekstraktının, superna-
tan ve Con A-lı pellet differensiasyonuna başarılı bir şekilde ulaşılmaktadır
(Tablo 3). Öyleyse iki reseptör popülasyonundan bahsedilmelidir.

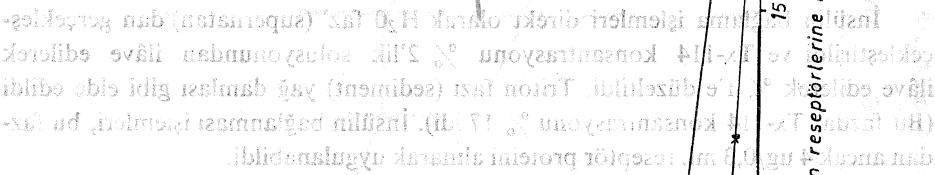
Tablo 3- Domuz membran ekstraktlarından % 1 Tx-114 ile solubilize edil-
miř reseptör proteininin differansiasyonuna Con A'nın tesirleri.

İlaveler	TOTAL Sp.Bağlama %	SUPERNATAN Spe. Baęla. %	PELLET Spe Baę. %	RECOVERY Bağlı İns. %
1) Reseptör (R)	100±18	—	—	—
2) R + Con A (10ug/ml).	37±8	36±5	1±5	37
3) R + Con A (50 ug/ml).	20±8	18±7	2±7	20
4) R + Con A (500 ug/ml).	13±9	5±6	7±8	12

Tekrar edilebilir neticeler elde olunana kadar herbir ferdi deneme 3x3 lü nü-
muneler halinde uygulanmıştır. İstatistik hesaplamalar önceden verildiğı tarzda
yapılmıştır. Reaksiyon karışımına Con A ilâve edilir edilmez supernatanın, tabii
olarak santrifüģasyondan sonra pellet'in (sediment) bağlanmaları (cpm) hesaplan-
mış ve 0 ug/ml. Con A konsantrasyonundaki bağlanmalara göre normalize
edilmiştir; hâliyle Recoveryler de buna göre yazılmıştır. "Total" in anlamı memb-
ran ekstraktının, "Supernatanın" manası da Con A presipitasyonundan sonra üst
sıvıdaki bağlanma dolayısıyla sayımlara tekabül eden düzeltilmiş spesifik bağlan-
maları kastetmektedir.

Bu denemelerde de bağlama tamponu olarak "Tampon G" kullanılmıştır.
Con A solüsyonları, mono komponent insülin ve ^{125}I - İnsülin G tamponu pH:
7,8 ile birlikte şekil 1' altında yazılan konsantrasyonlarda kullanıldı. Tx-114'ün
herbir basamakta konsantrasyonlarının % 0,03-0,1 arasında bulunmasına özel
önem atfedilmiřtir.

respektiivelt 0,01 ml ja 0,02 ml.



Control) Con 0,4 µg/ml.
on A 5 µg/ml.
on A 10 µg/ml.

10 µg/ml.

Tx-114 sediment (pellet) fazında insülin bağlanması daha düşük reseptör proteini konsantrasyonlarında (4 ug/0,3 ml) yapılmıştır. Bu reseptör konsantrasyonu bazan daha az Con A ile bağlı ^{125}J - insülin presipitasyonuna sebep olabildi. Reseptör proteininin geri eldesi (recovery) % 95 olarak mükemmeldi.

Faz seperasyonundan sonra bağlı aktivitenin % 15'i su fazında % 51'i ise ise Tx-114 fazında bulunmuştur. Bununla beraber ^{125}J - insülinin reseptöre bağlanması her iki fazda % 66 olarak geri elde edilmiştir.

Bağlama tamponu olarak 50 mM Hepes, 10 mM MgSO_4 , % 1 BSA pH: 7,8 e ayarlandı.

MC-natif insülin 1×10^{-6} M konsantrasyonda ve de mono ^{125}J -İnsülin $3 \times 10^{-9}\text{M}$ konsantrasyondaydı. Domuz karaciğer membranları reseptör proteini 1 mg/ml konsantrasyonda, içinde 10 mM Hepes, 150 mM NaCl olan % 1 lik Tx-114 tamponunda pH: 7,4) hazırlandı. Concanavalin A, Millipore suyunda, 10 mM Hepes, 10 mM CaCl_2 , 10 mM MnSO_4 , % 0,1 Tx-114 ve 2 mM merkaptto etanol ihtiva edecek şekilde ve pH: 7,4 de hazırlandı.

İnsülin bağlama işlemleri direkt olarak H_2O faz' (supernatan)'dan gerçekleştirildi ve Tx-114 konsantrasyonu % 2'lik solüsyonundan ilâve edilerek ilâve edilerek % 1'e düzeltildi. Triton fazı (sediment) yağ damlası gibi elde edildi (Bu fazda, Tx-114 konsantrasyonu % 17 idi). İnsülin bağlanması işlemleri, bu fazdan ancak 4 ug/0,3 ml. reseptör proteini alınarak uygulanabildi.

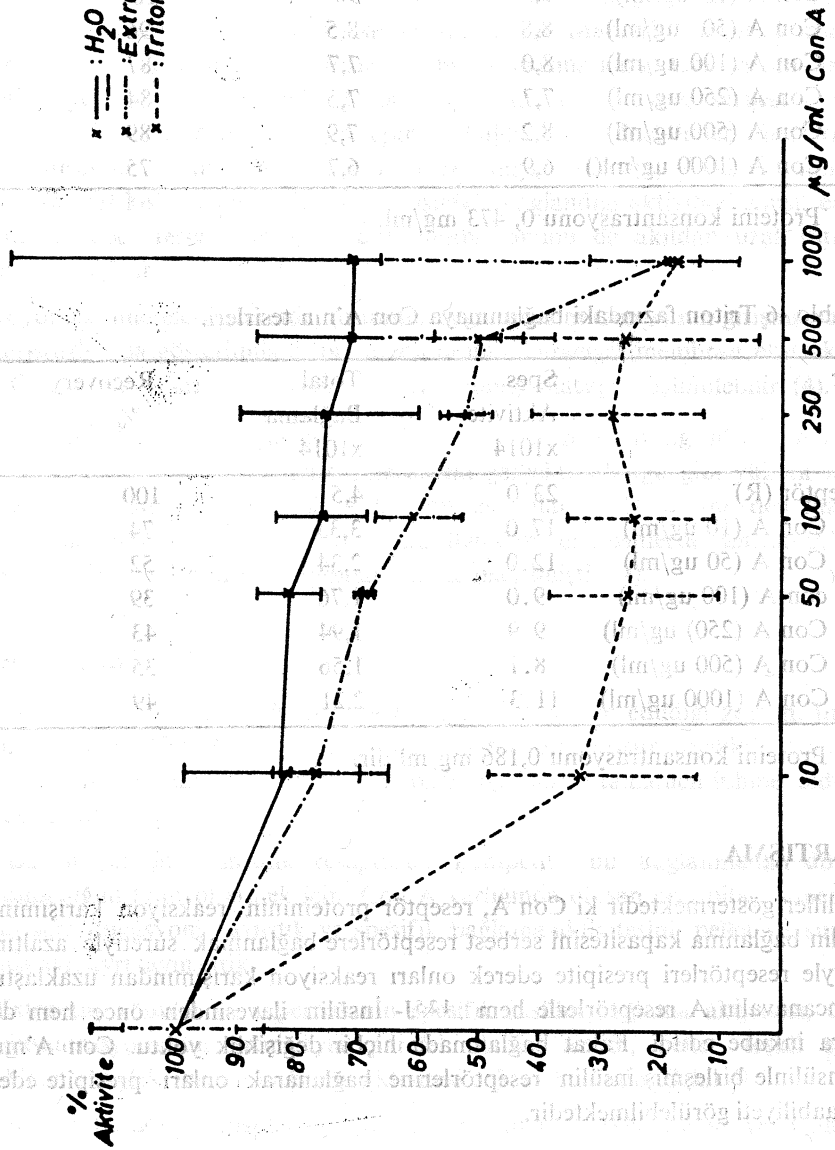
Tablo 4- : Membran ekstraktlarına Con A'nın tesirleri

İlâveler	Spes. Aktivite $\times 10^{14}$	Total Bağlama $\times 10^{14}$	Recovery %
1) Reseptör (R)	9,2	8,9	100
2) R+ Con A (10 ug/ml.)	7,1	6,9	77
3) R+ Con A (50 ug/ml)	5,9	5,7	64
4) R+ Con A (100 ug/ml)	5,5	5,3	60
5) R+ Con A (250 ug/ml)	4,7	4,5	51
6) R+ Con A (500 ug/ml)	4,8	4,6	52
7) R+ Con A (1000 g/ml)	3,4	3,3	37

Membran ekstraktlarına insülin bağlama denemelerinde karışımda 25 ug/ml. reseptör proteini kullanıldı.

Reseptör proteini konsantrasyonu 0,968 mg/ml. dir.

x --- : H₂O Phase
 x --- : Extract
 x --- : Triton Phase



Şekil-4 : Tx-114 iki fazlı sistemi ayrılmış insülin reseptör popülasyonlarına Con A'nın bağlanmadaki tesirleri.

Reseptör proteininin hemen tam olarak geriye alınmasını (Soluble ve insoluble fazlar) tam bir hücre için insülin- reseptör ilişkisi için önemli bir faktördür. İnsülinin vaptür tesiriyle komplekslen oluşmaktadır ve her bir insülin reseptörüne mükerrer

Tablo- 5: H₂O- fazındaki bağlanmaya Con A'nın tesirleri

İlaveler	Spes Aktivite x 10 ¹⁴	Total Bağlama x 10 ¹⁴	Recovery %
1) Reseptör	9,2	8,9	100
2) R+ Con A (10 ug/ml)	9,3	90	101
3) R+ Con A (50 ug/ml)	8,8	8,5	96
4) R+ Con A (100 ug/ml)	8,0	7,7	87
5) R+ Con A (250 ug/ml)	7,7	7,5	84
6) R+ Con A (500 ug/ml)	8,2	7,9	89
7) R+ Con A (1000 ug/ml)	6,9	6,7	75

R. Proteini konsantrasyonu 0,473 mg/ml.

Tablo -6 Triton fazındaki bağlanmaya Con A'nın tesirleri.

İlaveler	Spes Aktivite x1014	Total Bağlama x1014	Recovery %
1) Reseptör (R)	23.0	4,5	100
2) R+ Con A (10 ug/ml)	17.0	3,33	74
3) R+ Con A (50 ug/ml)	12.0	2,34	52
4) R+ con A (100 ug/ml)	9.0	1,76	39
5) R+ Con A (250 ug/ml)	9.9	1,94	43
6) R+ Con A (500 ug/ml)	8.1	1,56	35
7) R+ Con A (1000 ug/ml)	11.3	2,21	49

R. Proteini konsantrasyonu 0,186 mg/ml dir.

TARTIŞMA

Deliller göstermektedir ki Con A, reseptör proteininin reaksiyon karışımında insülin bağlanma kapasitesini serbest reseptörlere bağlanmak suretiyle azaltır, dolayısıyla reseptörleri presipite ederek onları reaksiyon karışımından uzaklaştırır. Concanavalin A reseptörlerle hem ¹²⁵J- İnsülin ilavesinden önce hem de de sonra inkübe edildi. Fakat bağlanmada hiçbir değişiklik yoktu. Con A'nın ¹²⁵J- İnsülinle birleşmiş insülin reseptörlerine bağlanarak onları presipite edebilme kabiliyeti görülebilmektedir.

Reseptör proteinlerinin hemen tam olarak geriye alınmasının (Soluble ve insoluble fazlarda) ima ettiği husus şudur; insoluble radioaktivite, ¹²⁵J İnsülinin yaptığı tersiyer bir kompleksten oluşmaktadır ve herbir insülin reseptörüne müşterek

bağlanmaktadır. Con A ile birleşmiş reseptörlerin çözünememesine rağmen hâlâ reseptörlerin insulini bağliyabilen kısımları bulunabilmektedir (14,16).

Çözünür bağı A-14 ¹²⁵I- İnsülin, Tx-114 de solubilize reseptörler ve en sonunda PEG metodu kullanılarak tayin edildi. (5,15)

En yüksek Con A konsantrasyonundaki (1mg/ml) tam geri elde ediş yüzdesi maksimal azalmış bir bağlanma kapasitesini gösterdi. Mamafih Con A, konsantrasyonu arttıkça insulinin reseptörlerine bağlanmasına karşı Con A'nın artan bir inhibisyon efektinden bahsedilebilir. Çözünmeyen aktivite, serbest ¹²⁵I-İnsülin veya Con A'dan ari reseptöre bağı ¹²⁵I-İnsülinde herbirinin birlikte presipitasyonuna bağı değildir. Çözünmeyen aktivite, ¹²⁵I-İnsülin ve Con A'nın ayrı kısımlarında reseptöre müsterek bağlandığı aktiviteyi temsil eder. Bununla beraber reseptörlerin bu özel inhibisyonunu da akıldan uzak tutmamakta yarar vardır.

Myoblast hücreleri üzerinde, insulinin bağlanmasını Con A'nın girişim yaparak karıştırdığı da gösterilmiştir, bu tarzda domuz karaciğer membran ekstraktlarının Con A ile uyarılmış şekliuin inhibe edilmiş olacağı düşünülebilir (4).

Scatchard eğrilerinden görülebileceği üzere 5 ug/ml ve 10 ug/ml Con A konsantrasyonlarıyla, tıpkı insan eritrositlerindeki gerçekte olduğu gibi yüksek affiniteli kısmı küçültülmüştür. Con A konsantrasyonlarının 20 ug/ml. den fazlası bazı aglütinasyon problemleriortaya çıkardığından eritrositlerde ancak 0,1-15 ug/ml lik Con A konsantrasyonları kullanılabilişti (4).

SONUÇLAR

Solubilize insülin reseptörleri ¹²⁵I-İnsülin ile inkübe edildiği zaman, inkübasyondan sonra Con A ile gözle görülür bulanık bir karışım teşekkül etti ve 1 mg/ml Con A konsantrasyonunda ¹²⁵I-İnsülinin hemen tamamen inhibe olduğu görüldü (Şekil 2).

Bu inhibisyonun insülin reseptörüne kompetitif bir bağlanmadan dolayı olup olmadığını kontrol etmek için, Con A varlığında oluşan presipitatu supernatandan santrifugasyonla ayırdık ve spesifik bağlama aktivitesini pellet ve supernatanda ayrı ayrı tayin ettik.

Ektraktın kontrol ve supernatanın spesifik insülin bağlama aktivitesi, Con A konsantrasyonunun artmasıyla paralel olarak azaldı, pellet teşkil eden Con A'dan spesifik insülin bağlama aktivitesi çok az bulundu (Şekil 4)

Domuz karaciğeri insülin reseptörüne bağlanan ¹²⁵I-insülin ve Con A arasında herhangi bir müsterek bağlanma görülmedi.

Scatchard'a göre insülin bağlama verilerinin analizleriyle eğrilerin biçimlerinin 5 ve 10 ug Con A/ml mevcudiyetinde değiştiği görüldü. Con A olmaksızın, insülin

reseptörünün yüksek affiniteli kısmı, 0,36 nM'lik bir K_d değer e sahipti, bu affinite 0,9 ve 1,0 nM'lik değerlerle sırasıyle 5 ve 10 ug/ml Con A konsantrasyonu mevcudiyetinde azaldı. Diğer taraftan yüksek affiniteli insülin reseptörlerinin bağlama kapasitesi, her iki konsantrasyonda hemen hemen iki misli idi.

Triton x-114 iki fazlı sisteminin domuz karaciğer membranlarından solubilize edilmiş insülin reseptör proteinlerine tatbik edilmesi iki farklı insülin reseptör popülasyonu ile sonuçlandı. Con A'nın tesirleri her iki popülasyonda da tesbit edildi ve hidrofilik fazla (çevrili) reseptör popülasyonu ile insülin bağlanmasını hiç etkilemediği bulundu. Aksine, hidrofobik fazın (Tx-114 fazı) reseptör proteinine insülin bağlama aktivitesi, 10 ug/ml'lik Con A konsantrasyonunda % 20, ve 500 ug/ml de takriben % 70 inhibe edildi. Öyleyse, insülin reseptörlerinin iki popülasyonu arasındaki bu farkın moleküldeki karbonhidrat kalıntılarını ilgilendirdiğini kabulleniyoruz.

EFFECT OF CONCANAVALIN A. ON TWO DISTINCT INSULIN RECEPTOR POPULATIONS FROM PORCINE LIVER MEMBRANES SEPERATED IN THE TRITON-X- 114 TWO PHASE SYSTEM.

SUMMARY

Insülin receptor proteins which are prepared from pig liver membrane, solubilized in 1% Triton X-114 detergent, have been used for native insülin bindings and also the effects of the lectin concanavalin A on these bindings investigated in various concentrations. Con A has caused an inhibition of about 93 % in the concentrations of 1 mg. per ml. In normal insulin binding K_D values were increased from the level 10^{-10} nM ($3,6 \times 10^{-10}$) to 10^{-9} ($1,1 \times 10^{-9}$). By this way Con A, with its concentration of 10 ug/ml, has proved that the affinity of reseptor for insulin was decreased.

The inhibition effects of Con A on insulin reseptors, which could be separated in to two different phases by Tx-114 detergent was seen in two different ways. That is, while the receptors remained in the supernatant phase could maintain the normal binding of insuline almost completely, no binding was seen in the triton phase.

Therefore, it was supposed that the insulin receptors could form two distinct populations.

Although, Con A had the inhibitive effects on total membrane extract, supernatant phase or sediment the inhibition was mostly seen in Tx-114 phase, also showed that the receptor had two different populations. Because, by the way of Con A inhibition, two descending parts of the receptors binding plots with high affinity and low capacity turns into low affinity and high capacity

form. Since that difference was highest in the Tx-114 phase, receptor population with low affinity could be collected in the sediment.

Insulin receptor population which showed high binding affinity in supernatant may be a source of radioreceptor insulin determination methods in its more purified state.

The experimental details are given in the results section.

KAYNAKLAR

- 1) Cuatrecasas, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3528-3534.
- 2) Katzen, H.M. and Mumford, R.A. (1976) Fed. Proc. 35, 1719.
- 3) Katzen, H.M., Vicario, P.P., Mumford, R.A. and Green, B.G. (1981) Biochemistry 20, 5800-5809.
- 4) Herzberg, V. Boughter, J.M., Carlisle, S. and Hill, D.E., (1980). Nature 286, 279-281.
- 5) Katzen, H.M., Soderman, D.D. and Green, B.G. (1981) BBRC 98, 410-416.
- 6) Meyer, H.e., Bücker, U., PaBlack, W. and Reinauer, H. (1982) manuscript in preparation.
- 7) Meyer, H.E., Bubenzer, H.-J., Herbertz, L, Kuehn, L. and Reinauer, H., (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362. 1621-1629.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 9) Cuatrecasas, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1980-1991.
- 10) Scatchard, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672.
- 11) Bordier, C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.
- 12) Gambhir, K.K., Archer, J.A. and Bradly, C.J. (1978) Diabetes 27, 701-708.
- 13) Sumner, J.B. and Howell, S.F. (1936) J. Biol. Chem. 115, 583.
- 14) Jacops, S., Hazum E., Shechter, Y., Cuadrecasas P. (1979) Biochemistry 76: 10, 4918-4921.
- 14) Cuadrecasas, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci 69: 5, 1277-1281.
- 16) Jacops, S., Shechter, Y., Bissell, K., Cuadrecassas, P. (1977) Biochim. Biophys. Res. Com. 77 : 3, 981-988.