

NÖROFİLAMENT PROTEİNLER (Neurofilament Proteins)

Dr. Ali BİLGİÇ*, Dr. Neyhan ERGENE**

* İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, **S.Ü.T.F. Fizyoloji Anabilim Dalı

Nörofilament proteinler nöronal sistoskeleton için özelleşmiş intermediyet filamentlerin bir sınıfıdır. Vertebralılarda sodyum dode sulfat (SDS) poliakrilamid jeldeki meloküler ağırlıkları yaklaşık 70-150-200 kilo dalton olan üç alt birimin heteropolimer bileşimidir (1,2,3,4).

Nörofilament proteinlerin ilk defa Lasek ve Hoffman'ın öncülük ettiği aksonal taşıma çalışmalarında yavaş transportun hareket eden bir elemanı olarak ratlarda varlığı belirtilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir (5,6,7,8,9,10).

Memeli görme sistemi üzerinde yapılan çalışmalar yavaş aksonal transportun Slow component a (Sca) ve Slow component b (Scb) den oluşan iki farklı sistoskeleton şebeke (ağ) sistemine sahip olduğunu göstermiştir. Sca nörofilament tripleks ve tubulin içermektedir. Bu proteinlerin işaretlenmesi ile yapılan çalışmalarda Sca'nın akson içinde çan biçiminde sallanarak ilerlediği gösterilmiştir. Scb, aktin ve diğer sistoskeleton proteinlerini içerir. Dendritlerde birkaç nörofilament ve çok sayıda mikrotubul bulunur. Aksonlar ise çok sayıda nörofilament kapsamaktadır (11,12).

Nörofilament proteinlerin transport oranları siyatik sinirde ve rat lumbur segmental köklerin olgunlaşmış büyümeyen aksonlarında ölçülmüştür.

Transport boyunca nörofilament için transport hızının proksimalden 1.40 ± 0.07 mm/gün distale doğru 0.64 ± 0.04 mm/gün'e kadar azaldığı bildirilmiştir (13).

Nörofilament proteinlerin alt birimlerinin moleküler ağırlıkları, memeli türleri arasında bir dereceye kadar değişme göstermektedir (3,12,14,15).

Shaw ve Debus (14) sürüngen, kanatlı ve memelilerin omurilik ve periferik sinirlerinden elde ettikleri sistoskeleton proteinleri SDS-poliakrilamid jelde ayrıştırarak nitroselüloz kağıda geçirmişler, nitroselüloz kağıtları rat ve domuz nörofilamentleri ile re-

aksiyon veren monoklonal ve poliklonal antikorlar ile inkube ederek diğer türlerin nörofilament proteinleri ile reaksiyonlarını araştırmışlardır. Bu antikorların memeli, kanatlı (kaz, tavuk) proteinleri ile reaksiyon verdiğini belirlemişler ve memeli nörofilament proteinlerin birbiri ile benzer özellik taşıdığını öne sürmüşlerdir. Memeli ve kanatlılarda bulunan nörofilament tripleks proteinlerden düşük ağırlıkta olanları küçük boy, orta ağırlıkta olanları orta boy, yüksek ağırlıkta olanları büyük boy olarak gruplandırarak nitelendirilmiştir. Sürüngen, kertenkele, kaplumbağa ve balıkların iki boy nörofilament proteine sahip olmaları bildirilmiştir.

Türlere göre nörofilament proteinlerin SDS-poliakrilamid jeldeki ağırlıkları Tablo 1'de görüldüğü şekilde belirtilmiştir.

Bilgiç (16) tarafından yapılan bir çalışmada rat orta boy nörofilament proteinleri ile reaksiyon veren poliklonal antiserum ∞ - MSH serum 8515, M 5 ve monoklonal NN 18 antikorları ile bildirilen orta boy nörofilament proteinleri saptanmıştır.

Hirokawa ve arkadaşları (17) memelilerin omurilik ve periferik sinir aksonlarından aldıkları doku kesitlerini hızlı dondurma metodu ile dondurmuşlar, aldıkları kesitleri antikorlar ile boyayarak elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. Bu üç boyutlu kafeste 73-145 kilo dalton nörofilament polipeptidin nörofilament tripleks çekirdeğini oluşturduğu, 195 kilo dalton nörofilament polipeptidin nörofilamentler arası çapraz bağları oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Nörofilament 195 polipeptidin yetişkin aksonda hücre gövdesi ve dendrite nazaran 70-145 KD polipeptide oranla daha çok olduğu da belirtilmiştir (18).

Nörofilament proteinlerin bütün diğer ara filamentlerde olduğu gibi 40 KD çekirdek öz bölgeye ilk yapısal özellik olarak sahip oldukları belirtilmiştir (19,20).

Nörofilament proteinlerin öz bölgesinde coiled-coil (çift sarmal) yapının şekillenmesi ile diğer ara

alt birimlerin öz bölgesinden farklı olduğu bildirilmiştir. Nörofilament proteinlerin öz bölgesi bir yanda değişebilir ağırlıkta (15 KD - 75 KD) -COOH ter-

minali olan iki yan bölgeye sahiptir. NF 150 ve NF 280'in genişliği bunların -COOH terminal alanlarının genişliğinden dolayıdır (4,20,22,23).

Tablo 1: Çeşitli türlere ait nörofilament proteinlerin SDS poliakrilamid jeldeki molekül ağırlıkları

	Küçük boy	Orta boy	Büyük boy
Rat	68	145	200
Fare	68	145	200
Kobay	68	152	219
Tavşan	68	152	203
Kedi	68	152	217
Sığır	72	168	212
Domuz	72	173	217
Kaz	72	160	190
Civciv	72	166	182
Kaplanbağa	75	(145)	
Kertenkele	75	(175)	

Shaw ve Debus'dan alınmıştır (21).

Bilindiği kadarıyla diğer sistoskeletal proteinlerin katılımı ile birlikte nörofilament proteinler nöronun şeklinin düzenlenmesi, boş alanların tamamlanmasında fonksiyon yapmaktadırlar. Çok küçük nöronlar nörofilamentlerin çok sınırlı miktarları ile veya onsuз yaşamını sürdürürken, özellikle uzun aksonal fonksiyona sahip olan büyük nöronlar oldukça zengin nörofilament içermektedirler (5,11). Nörofilament proteinlerin birçoğu akson içinde olup, miyelinli aksonlarda daha çok bulunmaktadır (9,26). Bazı büyük aksonlar fevkalade asimetrik yapıya sahip olmakta, bu asimetrik yapının uzunluğu siyatik sinirde olduğu gibi onların hücre gövdesinden birkaç yüz kat daha uzun olabilmektedir.

Gerçekten de sistoskeletona nörofilamentlerin katılması ile nöronal asimetrinin sınırlılığı kaldırılarak genişletilmiştir. Bu durumda ise yüksek vertebralılarda sinir sisteminde daha kompleks ve uzun nöronal dolaşımın kurulmasına imkan vermiştir (11,18).

Nörofilament Degredasyonu

Nörofilament parçalanmasında rol oynayan kalsiyuma ait ilk deliller rat periferel sinirlerinin elektron mikroskobu ile incelenmelerinden gelmektedir. Elektron mikroskobu için preparat hazırlanmasında

kullanılan değişik fiksasyon solüsyonları arasında kalsiyum içerenlerde nörofilament degradasyonu (parçalanması) olduğu gözlenmiştir (24). Kalsiyum uygulamasının sebep olduğu nörofilamentin granüler parçalanmasına miyelinli ve miyelinsiz sinir ipliklerinde rastlanmıştır. Kalsiyum yokluğunda nörofilamentler bozulmadan sağlam kalmaktadırlar. Nörofilamentin parçalanmasının kalsiyuma bağlı olduğuna dair örnekler periferel sinirlerin doku kesitlerinde omuriliğin miyelinli parçasında, kültürde üretilen sinir örneklerinde ve periferel sinir segmentlerinin kesilip çıkarılarak in vitro kalsiyum ile muamelelerinde görülmektedir (25,26,27).

Kalsiyuma bağlı nörofilament degradasyonunun bütün sinir dokularının ufak çaptaki miyelinli ve miyelinsiz sinir ipliklerinde daha hızlı oluştuğu bildirilmektedir. Bütün örneklerde nörofilament degradasyonu sonucu NF 150 KD ait birim protein ve NF 70 KD alt birim proteinin kaybolması NF 200 KD alt birim proteinin kaybolmasından daha önce olmaktadır (2,22). Biyokimyasal değişiklikler kalsiyumun 10 µM gibi çok az bir miktarının NF proteinler ile inkubasyonu sonucu görülebilir (28). Rat periferel sinir ve omuriliğinden izole edilen nörofilament proteinlerin kalsiyumun mevcudiyetinde parçalanabilmeleri için eriyebilir doku faktörüne de

ihtiyaç duydukları bildirilmiştir. Eriyebilir doku faktörü olan kalsiyumun aktive ettiği nötral proteaz enziminin (CANP) ilk olarak sıçan beyinde tesbit edilmesine karşın CANP'nin sinirlerdeki endojen substratlarının tanımlanması, omurgasızların dev aksonlarının aksoplazmalarının kullanılması sayesinde olmuştur (29,30).

Filbert ve arkadaşları deniz solucanı *Myxicola infundibulum*'un dev aksonları üzerinde yaptıkları çalışmalarda aksoplazmanın CANP'ye bağlı dağılmasının nörofilamentlerin tiftik tiftik pıhtılar şeklinde parçalanmasına yol açtığını göstermişlerdir. Yüksek hızda yapılan santrifüjleme (12.000 rpm) sonucu oluşan süpernatant seçici olarak nörofilament alt birim proteinleri parçalayan CANP etkinliğini içerir. Bu doku faktörleri CANP ısıtmakla inaktive edilebilir ve yalnızca pH 6.8 ± 8.0 olduğu zaman aktif olduğu belirtilmiştir (2,5,28).

Doku faktörlerinin saflaştırılması Schlaepfer grubunun çalıştığı laboratuvarında ve diğer farklı laboratuvarlarda yapılan saflaştırma çalışmalarında kalsiyumun aktive ettiği nötral proteaz enziminin (CANP) iki farklı formunun mM (m CANP) ve µM (µ CANP) olarak tarif edilmektedirler. µMCANP (veya Calparin I) ve mM (Calparin II) güçlü endojen enzim inhibitörü (Calpatatin) gibi memeli sinir dokularında ve beyin dokusunda yaygın olarak birlikte bulunmaktadır. Bulgular CANP'nin yaygın olarak nöroaksis içinde bulunduğunu ve kalsiyum tarafından aktive edilen aksonal transport ile aktif olmayan şeklinin taşındığını göstermektedir (27,28).

Sinir sonlarına ulaşan enzim daha çok aktif olmaktadır. Çünkü aksoplazmanın diğer bölümleri ile karşılaştırıldığında sinir sonlarında kalsiyum kon-

santrasyonu artmaktadır (31). Sinir sonları aynı zamanda işaretlenmiş NF proteinlerinin radyoaktivitesinin hızla kaybolduğu yerlerdir. Sinir sonuna bitişik aksoplazmada NF yoğunluğu azalmaktadır. Sinir sonlarında NF yıkılmasının CANP tarafından dengelendiği öne sürülmüştür. NF proteinlerin presinaptik membran altında eksositozisin aktif alanlarında bulunmadığı bildirilmektedir (31,32).

Dejenere sinirlerde nörofilament proteinler

Schlaepfer ve Micko (33) rat siyatik sinirinde transversal kesilme (cut lezyon) sonrası 0-30 gün içinde oluşan değişiklikleri inceledikleri araştırmalarında, kesilen sinirin proksimal parçasındaki NFP'lerin normal sinirde olduğu gibi değişmeden kaldığı ve distal parçada 24-48 saat içinde NFP'lerin kaybolduğunu kaydetmektedirler.

Ratların siyatik ve sefanus sinirlerinde crush lezyon uyguladıktan sonra immunolojik boyamaların kullanılması ile yapılan çalışmalarda orta boy nörofilament kaybının yaklaşık 24 saat sonra başladığı ve 3 gün içinde tamamlandığı bildirilmektedir (3,10,34,35,36,37).

Dejenere optik ve siyatik sinirler ile yapılan bir çalışmada, optik sinirde nörofilament proteinlerin siyatik sinirlere oranla 7 gün daha geç kaybolduğu bildirilmiş ve bu gecikme optik sinirde dejenerasyonun çok yavaş olmasına bağlanmıştır (38).

Ratlara akrilamid uygulamasının ultrastrüktürel incelemelerinde nörofilament protein sayısında artış belirlenmiştir (34,40,41).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda orta boy nörofilament proteinin CANP tarafından parçalanması sonucu ∞ - MSH benzeri peptidlere dönüşerek rejenerasyonu başlattığı öne sürülmektedir (34,42,37)

KAYNAKLAR

1. Angelide K J, Smith K E, Takeda M, Assembly and exchange of intermediate filament proteins of neurons: Neurofilaments are dynamic structures. *J Cell Biol* 1989; 108: 1495-1506.
2. Ishizaki Y, Kurokawa M, Takahashi K. A calcium-dependent protease associated with the neural cytoskeleton. Purification and partial characterization. *J Biochem* 1985; 140: 331-337.
3. Lee V M, Carden M J, Schlaepfer W W. Structural Similarities and differences between neurofilament proteins from five different species as revealed using monoclonal antibodies. *J Neurosci* 1986; 6 (8): 2179-2186.
4. Weber K, Shaw G, Osborn D E, Geisler N. Neurofilaments, a subclass of intermediate filaments: Structure and expression. In: Marotta C A. (ed). "Neurofilaments". Minneapolis: Pub Univ Minnesota Press, 1983: 717-729.

5. Brichtmaier W. Cytoskeleton structure and function. *TIBS* 1984; 4: 192-195
6. Dahl D, Crosby C J, Bignami A. Neurofilament proteins in fish: A study with monoclonal antibodies reacting with mammalian NF 150 KD and NF 200 KD. *J Comp Neurol* 1986; 250: 399-402.
7. Lasek R J, Hoffman P N. The neuronal cytoskeleton axonal transport and axonal growth. *Cell Motil* 1976; 3: 1021-1049.
8. Nixon R A, Brown B A, Marotta C A. Posttranslational modification of a neurofilament protein during axoplasmic transport: Implications for regional specialization of CNS axons. *J Cell Biol* 1982; 94: 159-164.
9. Schlaepfer W W. Neurofilament of mammalian peripheral nerve. In: Marotta C A (ed). "Neurofilaments". Minneapolis: Univ Minnesota Press, 1983: 5785.
10. Verhaagen J, Edwards P M, Shotman P, Jennekens F G I, Gispen W H. Characterization of epitopes shared by melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) and the 150 KD neurofilament protein (NF 150): Relationship to neurotropic sequences. *J Neurosci Res* 1986; 16: 589-600.
11. Hollenbeck P J. The transport and assembly of the axonal cytoskeleton. *J Cell Biol* 1989; 108: 223-227.
12. Kandel ER. Brain and Behavior. In: Kandel ER (ed). "Cellular basis of behavior". San Francisco: W.H. Freeman, 1976; 1: 45-48.
13. Watson D F, Hoffman P N, Fittro K P, Griffin J W. Neurofilament and tubulin transport slows along the course of mature motor axons. *Brain Res* 1989; 477: 225-232.
14. Shaw G, Debus E, Weber K. The immunological relatedness of neurofilament protein of higher vertebrates. *European J Cell Biol* 1984; 34: 130-136.
15. Talbot K. The cytoskeleton. In: Macleod A, Sikora K (eds). "Molecular Biology Human Disease" Blackwell Scientific Publication, 1988; 5: 49-65.
16. Bilgiç A. Bildirimlerde sinir hasarına nörofilament proteinlerinin yanıtı. Doktora tezi, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü 1990.
17. Hirokawa N, Glicksman M A, Willard M B. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J Cell Biol* 1984; 98: 1523-1536.
18. Bray D, Gilbert D. Cytoskeletal elements neurons. *Ann Rev Neurosci* 1981; 40: 505-523.
19. Bolen J W. Cytoskeletal intermediate filaments: Practical applications of intermediate filament analysis. *Ultrastruc Path* 1987; II: 175-189.
20. Geisler N, Potschka M, Weber K. Are the terminal domains in intermediate filaments organized as octameric complexes? Evaluation of a recent suggestion. *J Ultrastruc Mol Struc Res* 1986; 94: 239-245.
21. Shaw G, Debus E, Weber K. The immunological relatedness of neurofilament protein of higher vertebrates. *European J Cell Biol* 1984; 34: 130-136.
22. Parry D A D, Fraser R D B. Intermediate filament structure: I. Analysis of IF Protein sequence data. *Int J Biol Macromol* 1985; 7: 203-213.
23. Shneidman P S, Carden M J, Lees J F, Lazzarini E A. The structure of the largest murine neurofilament protein (NF-II) as revealed by cDNA and genomic sequences. *Mol Brain Res* 1988; 4: 217-231.
24. Schlaepfer W W. Neurofilaments: Structure, metabolism, and implications in disease. *J Neuropat Exp Neuro* 1987; 46 (2): 117-129.
25. Kamakura K, Ishiura S, Sugita H, Toyokura Y. Identification of Ca²⁺ activated neutral protease in the peripheral nerve and its effect on neurofilament degeneration. *J Neurochem* 1983; 40: 908-913.
26. Nixon R A, Brown B A, Marotta C A. Limited proteolytic modification of a neurofilament protein involves a proteinase activated by endogenous levels of calcium. *Brain Res* 1983; 275: 384-388.
27. Schlaepfer W W, Lee C V M Y, Zimmermen U J P. An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis. *J Neurochem* 1983; 502-509.
28. Zimmermen J P, Schlaepfer W W. Characterization of a brain calciumactivated protease that degrades neurofilament protein. *Biochem* 1982; 21: 3977-3983.
29. Nixon R A. Proteolysis of neurofilaments. In: Marotta C A (eds). "Neurofilaments". Minneapolis: Pub Univ Minnesota Press, 1983; 117-154.
30. Nixon R A. Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: Preferential localization of CANP activities in neurons. *J Neurosci* 1986; 6 (5): 1264-1271.
31. Garner J A. Differential turnover of tubulin and neurofilament proteins in central nervous system neuron terminals. *Brain Res* 1988; 458: 309-318.
32. Schlaepfer W W, Lee C, Trojanowski J Q, Lee W M Y. Persistence of immunoreactive neurofilament protein breakdown products in transected rat sciatic nerve. *J Neurochem* 1984; 43 (3): 857-864.
33. Schlaepfer W W, Micko S. Chemical and structural changes of neurofilaments in transected rat sciatic nerve. *J Cell Biol* 1978; 78: 369-377.
34. Edwards P M, Van der Zee C E E M, Verhaagen J, Schotman P, Jennekens F G., Gispen W H. Evidence that the neurotropic actions of α -MSH may derive from its ability to mimic the actions of a peptide formed in degenerating nerve stumps. *J Neurol Sci* 1984; 64: 334-340.
35. Lundborg G. Nerve regeneration. In nerve injury and repair. New York: Churchill Livingstone 1988; 5: 149-186.
36. Ogata N, Yonekawa Y, Taki W, et al. Degradation of neurofilament protein in cerebral ischemia. *J Neurosurg* 1989; 70: 103-107.

YAYIN KURALLARI

37. Verhaagen J, Edwards P M, Gispen W H. Damaged rat peripheral nerves do not contain detectable amounts of α -MSH. *J Neurosci Res* 1988; 19: 14-18.
38. Soifer D, Iqqmal K, Czosnek H, Martini J, Sturman J A, Winniewski H M. The loss of neuron-specific proteins during the course of Wallerian degeneration of optic and sciatic nerve. *J Neurosci* 1981; 1 (5): 461-470.
39. Hashimoto K, Kurosaka Y, Tani H, Hayashi M. Immunohistochemical studies of Arcylamide-associated neuropathology. *Toxicol* 1988; 49: 65-69.
40. Spencer P S, Thomas P K. Ultrastructural studies of dying-back process. The sequestration and removal by Schwann cells and oligodendrocytes of organelles from normal and diseased axons. *J Neurocyt* 1974; 3: 763-783.
41. Taii H, Hayashi M, Hashimoto K. Neurofilament degradation in the nervous system of rats intoxicated with acrylamide, related compounds or 2-5 hexadione. *Arch Toxicol* 1988; 62: 70-75.
42. Edwards PM, Gispen WH. Melanocortin peptides and neural plasticity. In: Traber J, Gispen WH (eds). *Senil dementia of Alzheimer type*. Berlin: Springer-Verlag, 1985: 231-240.