

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

278890

**KOMPLEMAN SİSTEMİNİ DÜZENLEYİCİ
PROTEİNLERDEN
CD₅₉'UN AKUT LÖSEMİLERDEKİ EKSPRESYONU**

Uzm. Dr. Can KÜÇÜKAĞSU
Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi programı için öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ANKARA 1997

*T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ*

***KOMPLEMAN SİSTEMİNİ DÜZENLEYİCİ
PROTEİNLERDEN
CD₅₉'UN AKUT LÖSEMİLERDEKİ EKSPRESYONU***

*Uzm.Dr.CAN KÜÇÜKAKSU
Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi programı için öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.*

*TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr. Dicle Güç
ANKARA
1997*

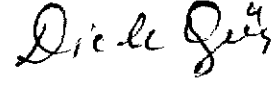
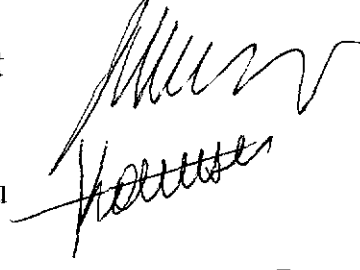
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;
Bu çalışma jürimiz tarafından Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Dicle Güç, H.Ü.

Üye : Prof.Dr. Dinçer Fırat

Üye : Prof.Dr. Emin Kansu

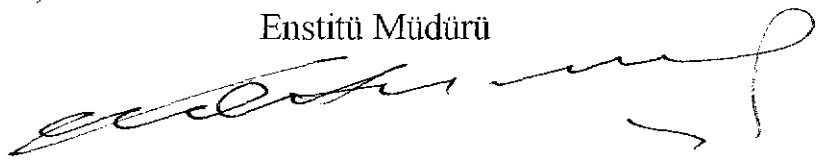
Üye : Yrd.Doç.Dr. Dicle Güç



ONAY :

Bu tez, Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri
tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla
kabul edilmiştir.

Prof.Dr.A.Atilla Hıncal
Enstitü Müdürü



İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
GİRİŞ VE AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. Lenfoid Seri Hücreleri	
1.2. Myeloid Seri Hücreleri	
1.3. Akut Lösemi	
1.4. Kompleman Sistemi	
2. MATERİYAL ve METOD	44
2.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	
2.2. Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi	
2.3. Akım Sitometri Analizi	
2.4. Total Hücre RNA'sının İzolasyonu	
2.5. RNA jel Elektroforezi	
2.6. Northern Blot Analizi	
2.7. DNA-RNA Ölçümleri	
2.8. Plazmid DNA Hazırlanması	
2.9. DNA Düşük Erime Noktalı Agaroz Jel Elektroforezi	
2.10. Agaroz Jelden İnsert DNA Elde Edilmesi	
2.11. Prehibridizasyon	
2.12. cDNA'nın Radyoaktif İşaretlenmesi	
2.13. Kolon Kromatografisi ve Hibridizasyon	
2.14. 28S rRNA'nın Radyoaktif İşaretlenmesi	
2.15. İstatiksel Analiz	
BULGULAR	53
3.1. Hastalıkların Özellikleri ve Akım Sitometri Sonuçları	
3.2. Klonlaşmış Hibridizasyon Proplarının Hazırlanması	
3.3. CD59'un Moleküler Tekniklerle İncelenmesi ve Sonuçları	
KAYNAKLAR	70

ÖZET

Kompleman sisteminin yabancı ve konakçı hücreler üzerindeki litik etkisi; kompleman sistemini düzenleyici proteinler adı verilen sıvı fazda ya da membrana bağlı halde bulunan bazı proteinler tarafından düzenlenir. Biyolojik özellikleri ve tedaviye gösterdikleri yanıt açısından geniş bir heterojeniteye sahip lösemik blast hücreleri de dolaşımında sürekli olarak kompleman sistemiyle karşılaşmaktadır.

Bu çalışmada, akut lösemi hastalarının blast hücrelerinin yüzeyindeki CD59 protein ekspresyonu akım sitometri tekniği ile ve gen ekspresyonu ise moleküler tekniklerle saptanmıştır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi, Erişkin Onkoloji Polikliniği'ne başvuran yeni tanı almış, ancak tedavi başlanmamış Akut lenfoblastik lösemi(ALL) (4), Akut Myeloblastik (AML) lösemi (4) hastası ve laboratuvarımız çalışanlarından 5 sağlıklı kişi dahil edilmiştir.

Her iki hasta grubu arasında ve bunların sağlıklı kontrol grubu ile aralarında CD59 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Bu konuda RT-PCR gibi daha ileri tekniklerle ve hasta grubu çoğaltılarak yapılacak olan çalışmalar, lösemi ve kompleman biyolojisine yönelik önemli bilgiler sağlayabilecektir.

ABSTRACT

The lytic effects of complement system on foreign and host cells have been regulated by some proteins such as complement regulatory proteins. The leukemic blast cells have large heterogeneity in the biological functions and responses to therapy and are closely related with the complement system.

In this study, CD59 protein expression on blast cells of patients with acute leukemia was determined by flow sitometric method. However, genetic expression was detected with molecular technique. Eight patients with acute leukemia admitted to the outpatient clinic of adult medical oncology department at the Hacettepe University were included in this study. Half of them has acute lymphoblastic (ALL) leukemia (group I) and another four patients had acute myeloblastic leukemia (group II). In addition, control group was consisted of 5 healthy men from the technicians of our laboratory.

There was no statistically significant difference in the levels of CD59 both between two study groups and also between the study groups and control group.

In this issue, other studies that will be used further methods as like PCR or RT, and that will include more patients, may lead to important knowledge about complement biology and leukemia.

SİMGELER ve KISALTMALAR

- DAF**(Decay accelerating factor): Yıkım hızlandırıcı faktör
MCP: Membran kofaktör protein
HRF(Homolog restriction factor): Homolog sınırlayıcı faktör
HRF 20: Homolog sınırlayıcı faktör 20
ALL: Akut lenfoblastik lösemi
AML/ANLL: Akut Myeloblastik (Lenfoblastik olmayan) lösemi
MPO: Myeloperoksidaz
FAB: French-American-British
cy: Sitoplazmik
Tdt: Terminal deoksinükleotidil transferaz
NK (Natural killer): Doğal öldürücü hücreler
CFU-GEMM (Colony forming unit): Granülositer, eritroid, monositer, megakaryositer koloni oluşturan birim
BFU-E (Burst forming unit): Eritroid öncü hücreleri oluşturan birim
CR1: Kompleman reseptör tip 1
CR2: Kompleman reseptör tip 2
Ig: İmmünoglobulin
MBP: Mannan bağlayan protein
MASP: Mannan bağlayan proteinle ilişkili proteaz
MAY: Mannan atak yolu
MAK: Mannan atak kompleksi
LDL (Low density lipoprotein): Düşük dansiteli lipoprotein
kDa: Kilodalton
kb: Kilobaz
C4bp: C4 bağlayan protein
DNA: Deoksiribonükleik asit
cDNA: Komplementer DNA
RNA: Ribonükleik asit
mRNA (Massenger RNA): Haberci RNA
SCRs (Short consensus repeats): Kısa, tekrarlayan diziler
IL2: İnterlökin 2
RCA (Regulators of compleman activation): Kompleman aktivasyonunun düzenleyicileri
PNH: Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
PMA: Forbol miristat asetat
KML: Kronik miyelositer lösemi
KLL: Kronik lenfositik lösemi
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. T hücre antogenezi
Şekil 1.2. Klasik kompleman yolu
Şekil 1.3. C, q, r, s yapısı
Şekil 1.4. C₃ tick over ve amplikasyon mekanizması
Şekil 1.5. MAK oluşumu ve düzenlenmesi
Şekil 1.6. Hücre membranlarında poly C₉ kompleksi
Şekil 1.7. iC_{3b}'nin Faktör I etkisiyle C_{3c} ve C_{3dg} fragmanlarına dönüşüm
Şekil 1.8. SCR demanları
Şekil 1.9. DAF etki mekanizması
Şekil 1.10. MCP etki mekanizması
Şekil 1.11. CR1 etki mekanizması
Şekil 1.12. CD₅₉ etki mekanizması
Şekil 2.1. RNA marker
Şekil 2.2. RNA jel ekeltroforezi
Şekil 3.1. CD₅₉ mab ile işaretlenmiş blast hücreleri
Şekil 3.2. CD₅₉ (+) taşıyan ALL'li hastanın lösemik hücre histogramı
Şekil 3.3. CD₅₉ (+) taşıyan AML'li hastanın lösemik hücre histogramı
Şekil 3.4. CD₅₉ (+) taşıyan sağlıklı bir kişinin histogramı
Şekil 3.5. DNA marker
Şekil 3.6. DNA'nın düşük erime noktalı jel elektroforezi
Şekil 3.7. Hibridizasyon sonrası CD₅₉'a ait otoradyografi örneği
Şekil 3.8. 28S rRNA'ya ait otoradyografi örneği

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Klasik yol proteinleri

Tablo 1.2. Alternatif yol proteinleri

Tablo 1.3. Membran atak yolu proteinleri

Tablo 1.4. Çözünabilir serum proteinleri ve fonksiyonları

Tablo 1.5. Membran proteinleri ve fonksiyonları

Tablo 3.1. ALL hasta grubunun yaş, cinsiyet dağılımı ile düzeylerde kullanılan örnek tipi.

Tablo 3.2. ALL grubunun beyaz küre sayısı, örneklerdeki blast oranı ve CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik analiz sonuçları

Tablo 3.3. AML hasta grubunun yaş, cinsiyet dağılımı ile düzeylerde kullanılan örnek tipi.

Tablo 3.4. AML grubuna ait beyaz küre sayısı, örneklerdeki blast oranı ve CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik analiz sonuçları

Tablo 3.5. Sağlıklı kontrol grubunun cins, yaş dağılımları ve CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik analiz sonuçları

GİRİŞ VE AMAÇ

Kompleman sistemi; mikroorganizmalara ve tümör hücrelerine karşı önemli bir doğal savunma mekanizmasıdır. Kompleman sisteminin klasik veya alternatif yolla aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan kompleman ürünleri hedef hücrelerde hasara neden olabildiği gibi, aynı zamanda konakçı hücrelere de bağlanarak hasara yol açabilmektedir. Konakçı hücrelerde oluşan bu hasarın engellenmesi, plazmada ve hücre membranlarında bulunan kompleman sistemini düzenleyen bazı proteinlerce sağlanır.

Solid ve hematolojik bazı malignitelerde kompleman düzenleyici proteinlerin ekspresyonlarında değişiklikler saptanmıştır. Bu ekspresyon değişikliklerinin, tümör hücrelerinin komplemanın litik etkisine karşı dirençlerini arttırdığı izlenmiştir. Bu da hastalığın prognozu ve ileride gelişebilecek immünoterapisiyle ilişkili olabileceğini ve bu proteinlerin birer onkogenez işareti olarak da kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada; sağlıklı bireyler ile akut lenfoblastik ve miyeloblastik lösemi tanısı alan hastalardan elde edilen kan ve kemik iliği örneklerinden ayrılan blastlarda, kompleman düzenleyici proteinlerden biri olan CD59'un gen ekspresyonu moleküler teknikler kullanılarak, blastların yüzeyindeki protein ekspresyonu ise akım sitometri yöntemi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM: GENEL BİLGİLER

1.1. Lenfoid Seri Hücreleri

Lenfositler immün yanıtta rol alan heterojen bir hücre grubudur. Morfolojik benzerliklerine karşın, fonksiyonları ve protein ürünleri oldukça farklıdır.

1.1.1. T Lenfositler

Lenfositlerin ilk büyük grubu; T lenfositleri olarak adlandırılan, öncülleri kemik iliğinde yerleşip daha sonra timusa göç ederek orada olgunlaşan hücrelerdir (1).

T hücreleri hücresel immünite ve sitotoksitede önemli rol oynarlar. Fonksiyonlarına göre iki ayrı alt gruba ayrılırlar: Yardımcı (Th) ve sitotoksik (Tc/s) T lenfositleri. T hücrelerinin alt gruplarının tanımlanmasındaki en büyük etken, ayrı fonksiyonlara sahip popülasyonların farklı membran proteinlerini eksprese ettiklerinin saptanmasıdır. Bu proteinler, farklı lenfosit popülasyonları için fenotipik belirleyicilerdir. Bu belirleyicilere karşı oluşan antikorların kullanımı farklı lenfosit popülasyonlarının tanımlanmasını sağlamıştır. Belirleyiciler CD (cluster of differentiation) sınıflamasıyla belirtilirler (2).

T lenfositleri farklılaşma ve olgunlaşmalarını timusta tamamlarlar. Timusta T hücre antijen reseptörü (TCR) genlerini yeniden düzenlenmesi ve TCR ekspresyonu sağlanmakta, ayrıca otoantijenlerle reaksiyona giren klonlar negatif seleksiyona uğramaktadır (3).

Timusta saptanabilen en immatür timosit, pro T hücresi veya erken kortikal timosit olarak adlandırılır. Yüzeylerinde CD₁, CD₂, CD₇, CD₃₈ ve CD₇₁ antijenlerini taşırlar. Bu dönemde TCR genomunda gen düzenlenmesi yoktur (4).

Pre T hücresi evresinde ise; hücre yüzeyinde CD4, CD8, CD5 antijenleri bulunur. TCR α , β , γ alt birimlerinin genleri yeniden düzenlenir. CD71 ise hücre yüzeyinden kaybolur.

Alfa alt birimi geninin yeniden düzenlenmesi tamamlandı, hücreler olgun timosit aşamasına gelirler. Bu evrede hücreler CD4 veya CD8 yüzey antijenlerinden yalnızca birini taşırlar. Olgun timositler periferik kana geçmeden CD5'lerini de kaybederler (4) (Şekil 1.1)

1.1.2. B Lenfositler

Lenfoid seri hücrelerinin diğer grubu B lenfositlerdir. Antikor üretme yeteneğine sahip tek hücre grubudur. Ayrıca antijen sunumunda ve humoral immünitede de rol oynarlar. Gelişimleri kuşlarda Bursa fabrisius, insanlarda ise kemik iliği ve bir miktar da peyer plaklarında tamamlanır. İnsan B lenfositlerinin gelişimi, aktivasyonu, çoğalması ve farklılaşması çok sayıda hücreyle hematopoetik büyüme faktörlerinin karşılıklı etkileşimiyle düzenlenir (5).

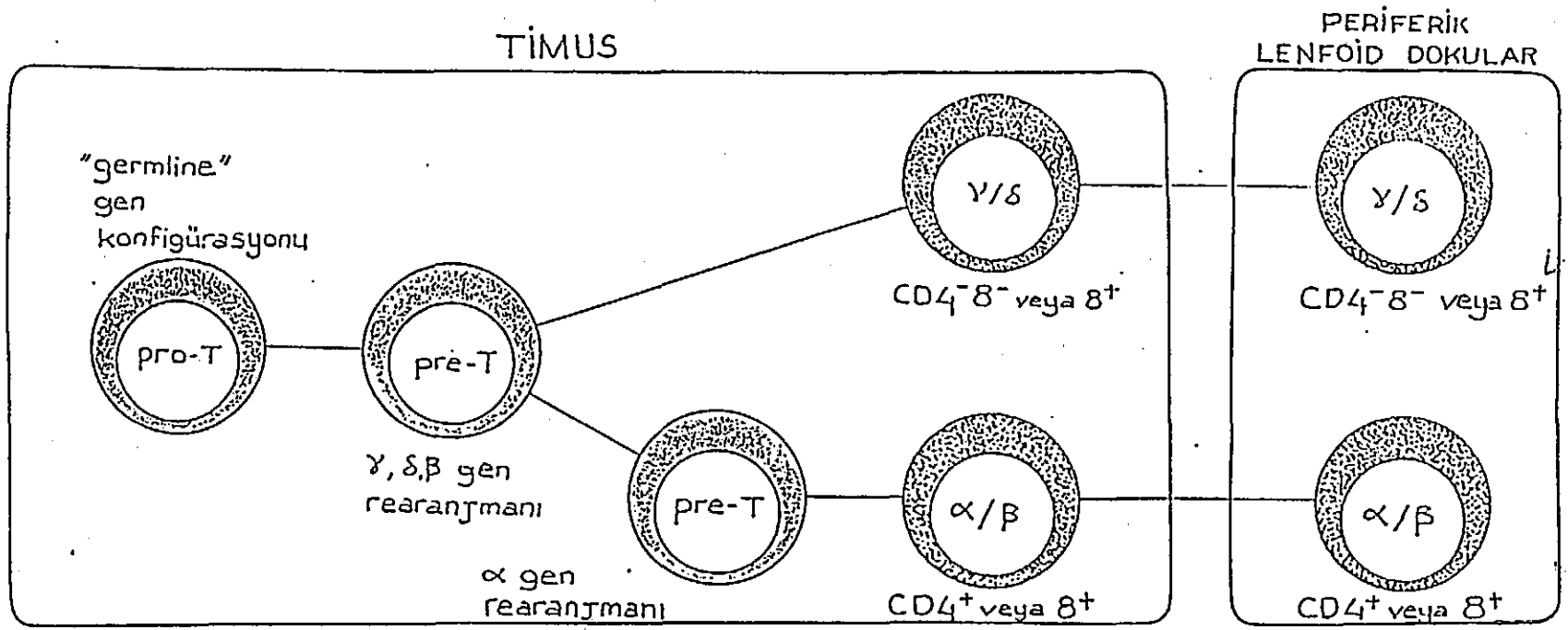
B lenfositlerinin ontogenezi 2 bölüme ayrılabilir (5):

a- Antijenden bağımsız başlangıç dönemi (pre B hücreden olgun B lenfosit oluşumuna kadar geçen dönem)

b- Antijene bağımlı dönem (B lenfositden plazma hücresi oluşumuna kadar olan dönem)

Kemik iliği multipotent hücrelerinden lenfoid popülasyonunun ana hücresinin oluşumuyla ilk dönem başlar. Bu hücre grubu terminal deoksitükleotidil transferaz (Tdt) enzimi taşır ve Tdt enzimi, gen yeniden düzenlenmesinde rol alır. Öncül hücrelerin immatür formu; nükleer Tdt, yüzey HLADR ve CD10 antijenlerini taşır (6).

İnsan immünoglobulin (Ig) ağır zincirinin genleri 14. kromozomun kısa kolu üzerinde, κ hafif zincir geni 2. kromozomda, λ hafif zincir geni ise 22. kromozom üzerinde yer alır. Her Ig ağır zincir geni, 4 farklı gen segmenti içerir. Bunlar; değişken (variable, V), farklılık (diversity, D), birleştirici (joining, J), sabit (constant, C) gen bölgeleridir (7).



sitoplazmik CD3

yüzey CD3/TcR

CD1

CD2

CD5

CD7

SEKİL 1.1 T-HÜCRE ONTOGENEZİ

Germ-line embriyolojik gen diziliminde devamlılık göstermeyen bu gen segmentleri, yeniden düzenlenmeyle değişik V+D+J kombinasyonları oluşturarak Ig çeşitliliğini sağlarlar (8).

Ağır zincir μ geninin yeniden düzenlenmesini sırayla, κ ve λ hafif zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi izler. κ geninin yeniden düzenlenmesinin başarılı olmadığı her üç B hücresinden birinde λ geni düzenlenmesi gerçekteşir. Sitoplazmik ağır zincirin belirlenmesini takiben hücre yüzeyinde IgM ve IgD belirir. Böylece ilk aşama tamamlanır (7).

Dolaşımda ve lenfoid organlarda bulunan bu hücrelerin antijenik uyarımını takiben B hücrelerinde somatik mutasyon, klonal çoğalma ve afinite mutasyonu olur. Özgöl klonda izotip dönüşümü gerçekteşir. Bellek ve plazma hücreleri olarak ayrılan hücreler özgöl antikoru sentezleyip salgılayabilirler (8) (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: B hücrelerinde afinite matürasyonu ve antikor sentezi.

Maturasyon Aşamaları	Kök Hücre	Pre B hücre	İmmatür B hücresi	Matür B hücre	Aktif B hücre	Antikor yapan hücre
Yapılan Ig	Yok	Sitoplazmik μ	Membran IgM (κ veya λ hafif zincir)	Membran IgM, IgD	Düşük oranda Ig sekresyonu, ağır zincir izotop dönüşümü, afinite matürasyonu	Yüksek Ig sekresyonu, azalan membran Ig
IgDNA, RNA	Yeniden düzenlenmiş Ig genleri	Yeniden düzenlenmiş ağır zincir genleri (VDJ- $C\mu$) mRNA	Yeniden düzenlenmiş μ ve κ veya λ genleri	VDJ RNA'nın $C\mu$ ve $C\delta$ mRNA'ya alternatif splicingi	VJD RNA'nın membran veya sekrete Ig mRNA'ya alternatif splicingi	Ağır zincir mRNA'nın predominant sekretuar formu

1.1.3. Doğal Öldürücü Hücreler (NK Hücreleri)

Lenfoid hücrelerin son grubu ise; büyük ve granüler lenfositlerin oluşturduğu doğal öldürücü (Natural killer, NK hücreleri) hücrelerdir. İnsan periferik kan hücrelerinin % 5-8'ini oluşturan büyük granüler lenfositlerin en azından % 70'i NK hücre aktivitesi gösterir. Bu hücreler tümör ya da virüsle enfekte hücreleri, herhangi bir uyarıya gereksinim duymadan yok etme yeteneğindedirler (9).

1.2. Miyeloid Seri Hücreleri

Granülositler, monositler, eritrositler ve trombositler aynı pluripotent ana hücreden kaynaklandıktan sonra lenfoid seri öncül hücresinden farklı, ama ortak bir hücreden geliştikleri gösterilmiştir (6).

Kemik iliği *in-vitro* kültürlerinde, kendini yenileme kapasitesi sınırlı, ama miyeloid seri hücrelerine farklılaşma yeteneği olan bir koloni saptanmıştır. Bu koloniye granülositer, eritroid, monositer, megakaryositer koloni oluşturan birim (CFU-GEMM) adı verilmiştir. Bu aşamadan sonra yönelimli öncül hücrelerin belirlediği saptanmış ve granülositer-monositer koloni oluşturan birim (CFU-GM), eritroid progenitor hücreleri oluşturan birim (BFU-E), megakaryositer koloni oluşturan birim (CFU-M) olarak adlandırılmıştır (10).

CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E, CFU-M hücreleri yüzeylerinde HLA-DR ve CD₃₃ antijenlerini taşırlar. CD₃₃ kemik iliğindeki öncül hücrelerde eksprese olurken, perifere geçen hücrelerde kaybolur (11).

Megakaryositer seri öncül hücreleri ve trombositler de CD₄₁ (Glikoprotein IIb/IIIa) taşırlar (5).

Normal ontogenezleri bu şekilde olan hemopoetik hücrelerin en sık görülen patolojilerin başında akut lösemiler gelmektedir.

1.3. Akut Lösemi

Akut lösemi; etiyolojisi tam olarak bilinmeyen, ilerleyici bir hematopoetik sistem hastalığıdır. Çocuklarda ve genç erişkinlerde en

sık rastlanan malignitelerdendir. Diğer yaş gruplarında ise; tüm malignansilerin % 10'unu teşkil eder (12).

Akut lösemiler, klinik seyirleri, tedavi ve prognozlarındaki farklılıklar, hücre morfolojilerine göre; akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloblastik (lenfoblastik olmayan) lösemi (AML/ANLL) olarak adlandırılır veya sınıflandırılırlar. Histokimyasal boyaların kullanıma girmesiyle, morfolojik grupların ayırımında bir görüş birliğine gerek duyulmuştur ve FAB (French-American-British) sınıflaması geliştirilmiştir (13,14).

Ancak hücrelerin blastik, morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine dayanan FAB sınıflamasının özellikle hastalığın biyolojik ve prognostik açıdan önemi olabilecek alt gruplarının ayırımında yetersiz kalması sitogenetik, moleküler ve immünolojik yöntemlerin gündeme gelmesine yol açmıştır (15,16).

Bu sayede akut lösemilerin biyolojik davranışı, prognozlara yönelik bilgi, yüksek risk grupları ve minimal rezidüel hastalığın saptanması gibi gelişmeler saptanmıştır.

1.4. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi, bir dizi protein, bunların aktivasyon ürünleri, reseptörleri, aktivatör ve inhibitörlerinden oluşan karmaşık bir sistemdir. Bu proteinler; antijen-antikor kompleksi, hücre, bakteri zarı gibi aktivatörlerle karşılaştıklarında koagülasyon sistemine benzer bir mekanizmayla birbirlerini aktive ederek immün yanıtı tamamlayan ya da daha etkili olmasını sağlayan bir çok biyolojik olaya yol açarlar. Bu sistemin temel elemanları; öncelikle karaciğerde sentezlenen protein yapısında, normalde dolaşımda inaktif olan moleküllerdir (17).

1.4.1. Adlandırma

Klasik aktivasyon yolu ve membran atak kompleksindeki (MAK) proteinler “komponent” adını alırlar. Bunların adlandırılmasında C_1 ’den C_9 ’a kadar giden bir sistem kullanılır. Alternatif yol proteinleri ise; “faktör” adını alırlar ve B, D, P gibi harflerle sembolize edilirler. Aktif hale geçen kompleman elemanı üzerine çizgi çekilerek belirtilir (C_{1r} , C_{1s} ,...). Kompleman aktivasyonu sırasında, enzimatik olarak parçalanan komponentlerin dolaşıma katılan fraksiyonları yanlarına eklenen küçük harflerle temsil edilirler (C_{3a} , C_{2a} ,...). Polipeptid alt ünite zincirleri yanlarına eklenen Yunan harfleriyle belirtilir ($C_{3\alpha}$, $C_{3\beta}$) (17).

Kompleman sistemini düzenleyici proteinler, molekülün fonksiyonel aktivitesiyle ilişkili olarak adlandırılırlar (Membran kofaktör protein (MCP), yıkım hızlandırıcı faktör (DAF) v.s.). Kompleman reseptörleri ligandlarına göre veya CD sistemine göre adlandırılır (C_{5a} reseptörü veya CD_{35} gibi).

1.4.2. Kompleman Sisteminin Özellikleri

Serum kompleman komponentleri, çok sayıda proteolitik enzim içerir. Bu proteolitik enzimler, kendilerinden önce aktive olan kompleman sistemi enzimleri tarafından aktif hale geçirilirler, yani zimojendirler.

*

Kompleman proteinleri kanda inaktif dolaşırlar veya çok az miktarda spontan aktivasyon gösterirler. Kompleman sisteminin

aktivasyonu belli şartlarda gerçekleşir. Özgül proteinleri bağlayan immünoglobülinler, kompleman sistemini aktive ettikleri takdirde bu sistem humoral immünitede etkili bir mekanizma haline gelir. Bu şekilde antijen-antikor kompleksi ile başlayan kompleman aktivasyonuna “**klasik aktivasyon yolu**” denir (17).

Bazı kompleman komponentleri ise, antikor olmaksızın doğrudan enfeksiyöz organizmaların yüzeyine bağlanarak aktive olurlar. Kompleman sisteminin bu şekildeki aktivasyonuna da “**alternatif aktivasyon yolu**” denir (18).

Kompleman sisteminin merkezini oluşturan protein C_3 'dür. C_3 'ün proteolitik yıkım ürünleri biyolojik aktivite gösterirler. Her iki yolda da farklı aşamalar sonucu C_3 konvertaz enzimi meydana gelir. Bu enzim C_3 'den C_{3a} ve C_{3b} oluşumuna yol açar. Bir sonraki basamak C_{3b} 'nin C_3 konvertaz enzimine bağlanarak onu C_5 konvertaz enzimine dönüştürmesidir. Bu enzim ise; C_5 parçalanmasını katalizler. Her iki yolun C_5 konvertazları moleküler olarak farklı oldukları halde aynı reaksiyonları katalize ederler (19).

C_5 parçalanmasını izleyen basamaklar iki yol için de ortaktır. Son aşamalarda artık proteoliz olmaz, çözünebilir kompleman proteinlerinin ard arda bağlanmasından ibarettir. Membran atak kompleksi oluşur ve hücrenin osmotik lizisine neden olur (20).

1.4.3. Klasik Aktivasyon Yolu

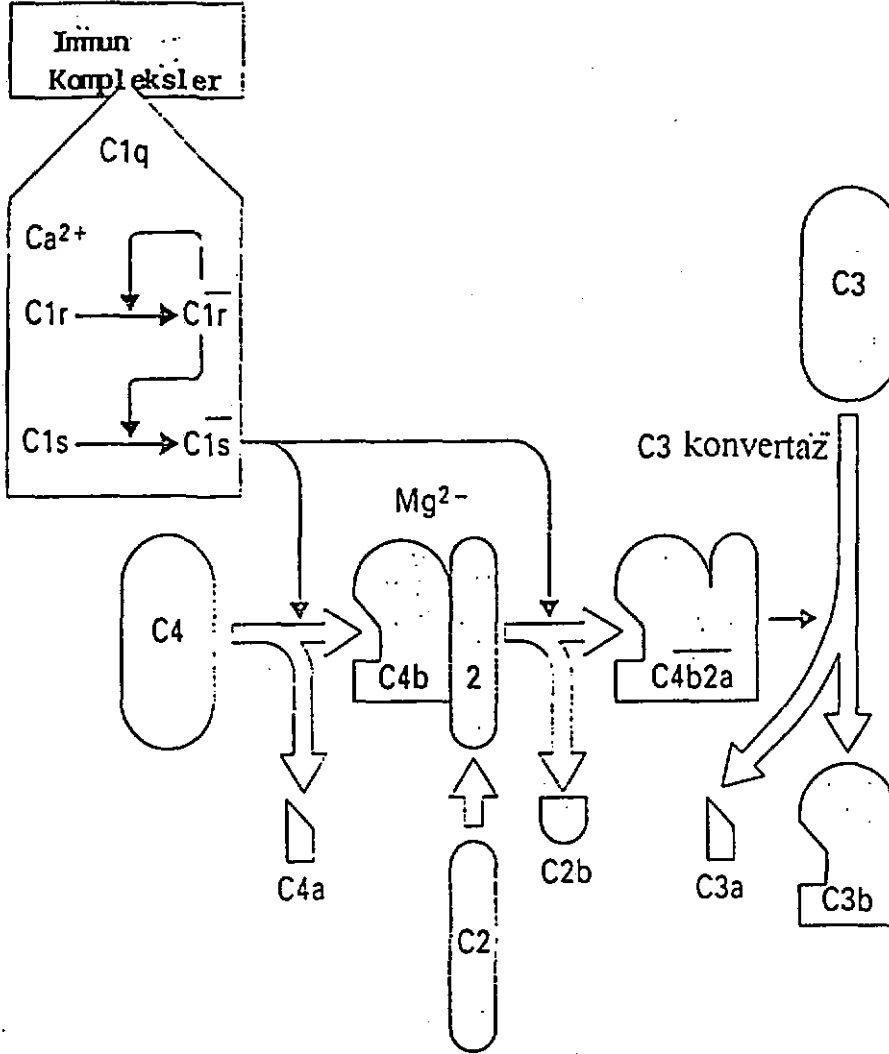
Antikor bağımlı immün yanıtların etkili mekanizmasıdır. Klasik yol proteinleri; C_{1q} , C_{1r} , C_{1s} , C_2 , C_3 , C_4 'dür (Tablo 1.2).

C_1 'in antijen-antikor kompleksinin Fc bölgesine bağlanmasıyla başlar. Bu aktivasyon ancak belli şartlarda gerçekleşir (17) (Şekil 1.2);

C_1 ; IgM'nin CH_3 domainine veya IgG'nin CH_2 domain'ine bağlandığında aktivasyon başlar.

Tablo 1.2. Klasik yol proteinleri

Komponent	M.A. (kDa)	Altünite	Aktivasyon Ürünleri	Görevleri
C1qr2s2	750			Klasik yolu aktifler.
C1q	410	6 Adet A,B,C zinciri		Ig'nin Fc kısmına bağlanır.
(C1r)2	85	Tek zincir	C1r	C1r serin proteazdır, C1s'i parçalar.
(C1s)2	85	Tek zincir	C1s	C1s serin proteazdır, C4 ve C2'yi parçalar.
C4	210	Birer α , β , γ zinciri	C4a ve C4b	Anafilotoksin, opsonindir. C3 konvertazın parçasıdır.
C2	110	Tek zincir		
C3	195	Birer α , β	C3a ve C3b	Anafilotoksin, opsonindir. C3 ve C5 konvertazın parçasıdır.



Şekil 1.2. Klasik kompleman yolu

(Roitt et al. Immunology 1993; p:12.6'dan adapte edilmiştir)

Tek bir C_1 molekülü immünoglobülinin en azından iki Fc parçasına bağlanmalıdır. Bu C_1 molekülündeki konformasyonel değişiklikler için gereklidir.

IgM bir pentamer olduğundan beş adet Fc bölgesi içerir ve bir IgM molekülü C_1 'i bağlayıp klasik yolu aktive edebilir. IgG ise; monomer olduğundan en az iki adet IgG molekülü C_1 'i bağlayarak aktivasyonu başlatabilir. Immünoglobülin izotiplerinin yapılarındaki bu farklılıklardan ötürü IgM kompleman aktivasyonunda daha etkilidir.

Sadece antijen-antikor kompleksi de bu yolu aktive edebilir. Serbest veya çözünebilir antikorlar aktivasyonu uyaramaz. Immünoglobülin antijene ya da hücre yüzeyine bağlandığı takdirde konformasyon değişikliği olur. Fc bölgeleri dışarı çıkar ve C_1 bağlanacak hale gelebilir (17).

C_{1q} ; kollektinler (kollojen lektinler) olarak bilinen kalsiyum bağımlı lektinler ailesinin bir üyesidir. Bu ailede ayrıca MBP (mannan bağlayan protein), konglütinin, akciğer sülfaktan proteinleri A ve D'de bulunur. Serumdaki MBP; bakteri yüzeyindeki terminal mannoz gruplarına bağlanma yeteneğindedir ve böylece MASP (mannan bağlayan proteinle ilişkili serin proteaz) ile ilişkiye girebilecek hale gelir. MASP, C_{1r} ve C_{1s} 'in yapısal homologudur. Dolayısıyla MBP ve MASP 'nin ilişkisi; C_{1q} 'nın C_{1s} ve C_{1r} ile ilişkisine benzer. Böylece klasik kompleman yolu antikordan bağımsız olarak aktive olur (17).

C_{1q} aynı zamanda direkt olarak belli mikroorganizmalara bağlanabilir (mukoplazma ve bazı retrovirüsler gibi) ve bu şekilde de antikordan bağımsız aktivasyon gerçekleşebilir (17).

Kompleman sisteminin ilk komponenti; heterodimer bir molekül olan C_{1q} ve tek zincirden ibaret iki adet C_{1r} ve iki adet C_{1s} molekülünden meydana gelir (C_{1qr2s2}). C_{1q} 'nın iki C_{1r} ve iki C_{1s} ile bağlanması ancak kalsiyumun varlığında mümkündür (21) (Şekil 1.3).

C_{1q} subuniti; immünoglobüline bağlanan kısımdır ve klasik yolun tanıma ünitesidir, 410 kilodalton (kDa) molekül ağırlığındadır. Serum

konsantrasyonu 80 mg/l'dir. Üç farklı polipeptid zincirinden oluşan, amino terminalinde kollojen benzeri üçlü heliks yapısı, karboksi terminalinde ise globüler başlar içeren bir moleküldür. Globüler başı, IgG ve IgM'nin Fc bölgesindeki spesifik alanlara bağlanır. IgG₃; C_{1q}'ya en iyi bağlanan alt gruptur. IgG₄ ise C_{1q}'ya bağlanmaz (22).

C_{1r} ve C_{1s}; her ikisi de birer zincirden oluşan, 85 kDa ağırlığındaki moleküllerdir. Serin esteraz zimojenleridir. Diğer serin proteazlarla kuvvetli homoloji gösterirler. Proteolitik kaskatın devamı için gereklidirler. Serumda yaklaşık 50 mg/l konsantrasyonda bulunurlar. Her birinden ikişer tane olmak üzere C_{1s}- C_{1r}- C_{1r}-C_{1s} diziliminde lineer bir tetramer oluştururlar. Bir tetramer, bir C_{1q} molekülüne bağlanır. C_{1q}'nın globüler başlarının iki veya daha fazlasına IgM ya da IgG moleküllerinin bağlanmasıyla C_{1r}'nin enzimatik aktivasyonuna neden olacak konformasyonel değişiklikler oluşur. Sonuçta; C_{1r} molekülleri, kendi kendilerini parçalayarak 28 kDa'luk ve 57 kDa'luk iki kısma ayrılırlar. 28 kDa'luk C_{1r} molekülü serin esteraz aktivitesine sahiptir (22).

C_{1r}; C_{1s}'i 57 ve 28 kDa'luk iki bölüme ayırır ve 28 kDa'luk C_{1s} de serin esteraz aktivitesi taşır. Klasik yolun daha sonraki komponentleri olan C₄ ve C₂ üzerine etkilidir (22).

C₄; klasik yolda aktive edilen diğer bir çözünebilir serum proteindir. C₃ konvertazın yapısında yer alır. Molekül ağırlığı 210 kDa olup, α , β , γ olmak üzere üç polipeptid zincirinin heterotrimerik komplekslerinden oluşur. Serum konsantrasyonu 450-750 mg/l'dir. C₄'ün α zinciri, sistein rezidüleri arasında internal tiyoester bağı içerir. C_{1s}; C₄'ün α zincirini bölerek 8.6 kDa'luk C_{4a} ve daha büyük bir molekül olan C_{4b}'ye ayırır. Bir C_{1s} molekülü çok sayıda C_{4b} molekülü oluşturabilir (23).

Bu proteolitik basamağın sonucunda C_{4b} fragmanındaki α zincirinin tiyoester bağı, amin ve hidroksil gruplarının nükleofilik

ataklarına açık hale gelir. Bu yapı çok labil olup, “metastabil C_{4b} ” olarak adlandırılır (17).

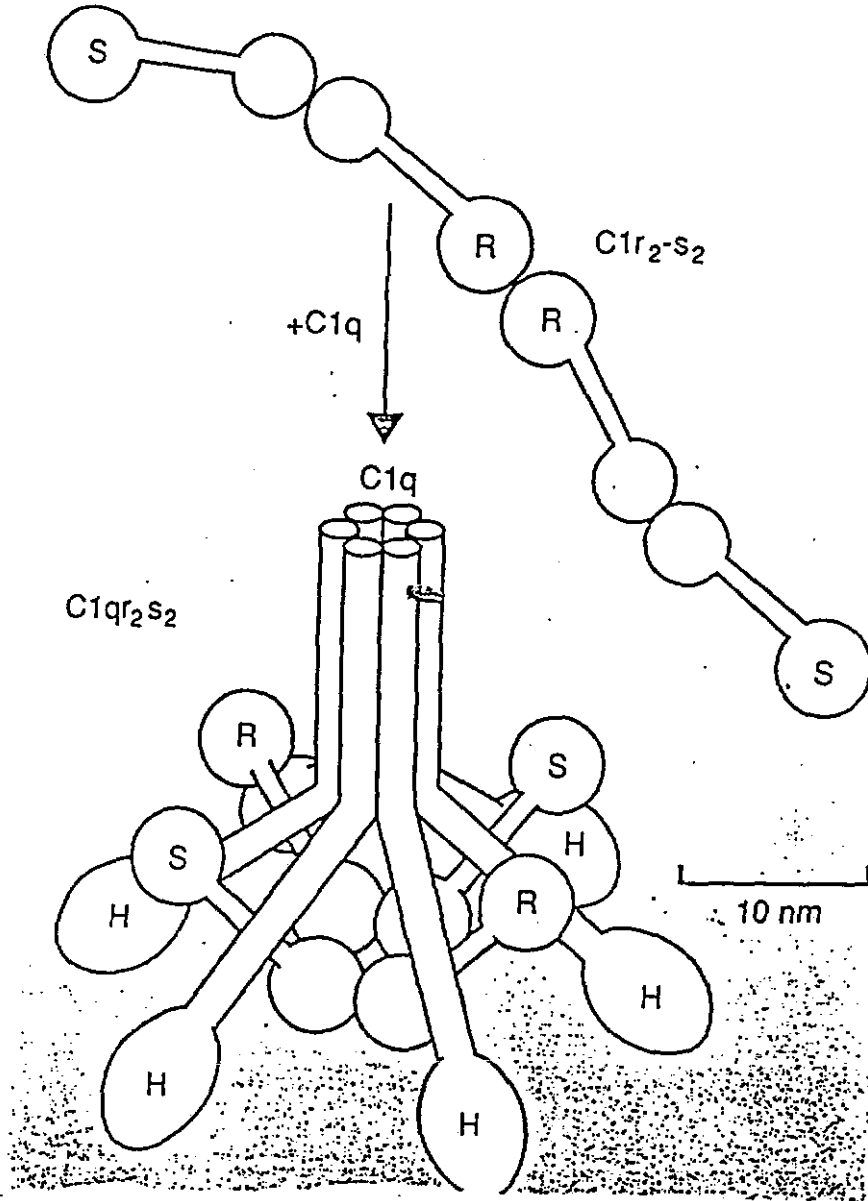
C_{4b} tiyoester bağlarının sadece %1’i protein ve karbonhidratlara bağlanır. Geri kalanlarsa su molekülleriyle hızlı bir biçimde reaksiyona girip, kısa ömürlü inaktif bir ürün olan iC_{3b} ’yi oluşturur.

C_4 ; primer yapıları çok küçük ayrıntılar gösteren ancak fonksiyonel özellikleri birbirinden oldukça farklı iki izotipten oluşur. C_{4A} ; özellikle amino gruplarına bağlanırken, C_{4B} amino ve hidroksil gruplarıyla ilişkiye girer. C_4 molekülünü kodlayan genlerin major histokompatibilite kompleksinin Class III bölgesinde lokalize olduğu saptanmıştır (24).

C_2 ; klasik yolun üçüncü çözünür serum komponentidir. C_3 konvertazın yapısında yer alır, 110 kDa’luk tek zincirli bir polipeptiddir. Serum konsantrasyonu 20 mg/l’dir. Magnezyum iyonu varlığında, hücre yüzeyindeki C_{4b} ’ye bağlanabilir. C_{4b} ile kompleks oluşturduğunda C_{1s} molekülü ile, hücre yüzeyinden diffüze olabilen 45 kDa’luk C_{2b} ve C_{4b} ile, hücre yüzeyine bağlı kalan 75 kDa ağırlığındaki C_{2a} fragmanlarına ayrılır. C_{2a} ; C_2 ’nin karbon terminalinden, C_{2b} ise amino terminalinden kaynaklanır (23).

C_{4b2a} kompleksi, klasik yolun C_3 konvertazıdır. Bu dayanıklı bir kompleks olmayıp C_2 ’nin ayrılmasıyla 37 °C’de 2 dakikada inaktif hale geçer. Kalan C_{4b} diğer bir C_{2a} ’yı bağlayabilir. C_1 ’de mevcut ise kompleman döngüsü işlemeye devam eder (23).

C_3 ; klasik yolun dördüncü çözünebilir komponenti ve aynı zamanda alternatif yolun ana komponentidir. Serum konsantrasyonu kompleman sisteminin diğer tüm elemanlarından fazladır (1300 mg/l), 195 kDa’luk α ve β polipeptid zincirlerinden oluşur. C_4 molekülündeki gibi tiyoester bağları içerir.



Şekil 1.3. C1,q,r,s yapısı (Globüler başları H ile gösterilmiştir)
(Immunol Today 1987;8:106-110'dan adapte edilmiştir).

C₃ konvertaz, C₃'ün α zincirinin amino terminal segmentindeki arjinin-serin bağıncı kırınca önemli bir anafilotoksin olan 9 kDa'luk C_{3a} fragmanı ve daha büyük bir fragman olan potansiyel reaktanlara açık, 180 kDa'luk metastabil C_{3b} molekülü oluşur. C_{4b} molekülünde olduğu gibi metastabil C_{3b} molekülü de yüzeydeki hidroksil ve amino gruplarıyla ester veya amid bağları oluşturabilecek tiyoester grubu taşır. Bu tiyoesterler yaklaşık 60 milisaniye gibi kısa bir yarı ömüre sahiptir. Eğer yüzeye bağlanamazlarsa hidrolize gider ve C_{3b} inaktif faz C_{3b}'si haline gelir (18).

C_{3b} molekülünün % 10'dan fazlası hücre yüzeyine ya da immünoglobüline bağlı C_{4b2a}'ya bağlanır. Bu oluşan yeni kompleks klasik yolun C₅ konvertazıdır (C_{4b2a3b}). Kompleks C₅'in enzimatik parçalanmasını katalizler ve MAK formasyonu başlar.

1.4.4. Alternatif Aktivasyon Yolu

Alternatif yol; antikor yokluğunda C₃'ün proteolizini katalizleyen C₃ konvertazın çözünmüş veya membrana bağlı formlarıyla aktive olur (25).

Alternatif yol proteinlerinin başlıcaları; Faktör H, D ve klasik yolda da bulunan C₃'dür. Ayrıca düzenleyici olarak properdin de bu yolda yer alır (Tablo 1.3).

C₃, kendi başına bu yolun başlamasında ve ilerlemesinde kritik bir role sahiptir. Çünkü alternatif yol C₃'ün iki formundan biriyle uyarılır. Bunlar; C_{3b} ve dolaşımdaki C₃'ün internal tiyoester bağlarının spontan ve yavaş hidroliziyle oluşan C₃(H₂O)'dur. Bu formların her ikisi de Faktör B'ye bağlanır.

Faktör B; 93 kDa ağırlığında, tek zincirden oluşan, klasik yoldaki C₂'nin homoloğu olan bir proteindir. Serum konsantrasyonu 210 mg/l'dir. C_{3b} veya C₃(H₂O) ile kompleks oluşturduğunda diğer bir

protein olan Faktör D tarafından oluşturabilecek proteolize duyarlı hale gelir (19).

Faktör D; 24 kDa ağırlığında, bir serin proteazdır. C_{1r} , C_{1s} , Faktör Xa, Faktör XIa, plazmin ve trombin gibi diğer serin proteazlarla homolog diziler içerir. Serumda ve plazmada her zaman aktif formdadır. Serum proteaz inhibitörleriyle inhibe edilemez. Serum konsantrasyonu 2 mg/l'dir. Bu protein, Faktör B'nin arginin-lizin bağlarına yüksek substrat spesifitesi gösterir. Faktör B'yi proteolitik olarak parçaladığında, 33 kDa ağırlığında Ba ve 63 kDa ağırlığında Bb fragmanları oluşur (19).

Bb; C_{3b} veya $C_3 (H_2O)$ 'ya tutunur. Oluşan bu C_{3bBb} veya $C_3(H_2O)Bb$ kompleksi alternatif yol C_3 konvertazıdır. Bu enzim sıvı fazda $C_3(H_2O)$ şeklinde ya da hücre yüzeyine bağlı C_{3b} şeklinde bulunur. Çok dayanıksız olan bu kompleksleri dayanıklı hale getirmek için diğer bir alternatif yol proteini olan properdin bağlanır.

Properdin; 220 kDa ağırlığında, nonkovalent olarak bağlanmış dört adet alt ünitiden oluşur. Serum konsantrasyonu 26 mg/l'dir. C_{3bBb} kompleksini stabilize ederken aynı zamanda da aktif formu, Faktör B ile birleşmesini artırır (26).

Alternatif yolun normal fonksiyonlarının devam edebilmesi iki önemli özelliğe bağlıdır;

1- C_{3b} ; alternatif yol C_3 konvertazı ile sürekli olarak oluşturulur. Bu işlemse C_3 'ün α zincirindeki tiyoester bağının spontan hidroliziyle başlatılır (C_3 tickover). Dolaşımda düşük miktarlarda olmak üzere sürekli olarak C_3 bulunur ancak hızla inaktif forma dönüşür. Bu sayede dolaşımda kompleman aktivasyonu oluşmaz. Eğer C_{3b} otolog hücre yüzeylerinde depolanırsa düzenleyici proteinlerce hızlı bir biçimde inaktive edilir. Ancak mikroorganizmaların yüzeyine bağlanırsa sonuçta C_{3bBb} oluşur (25).

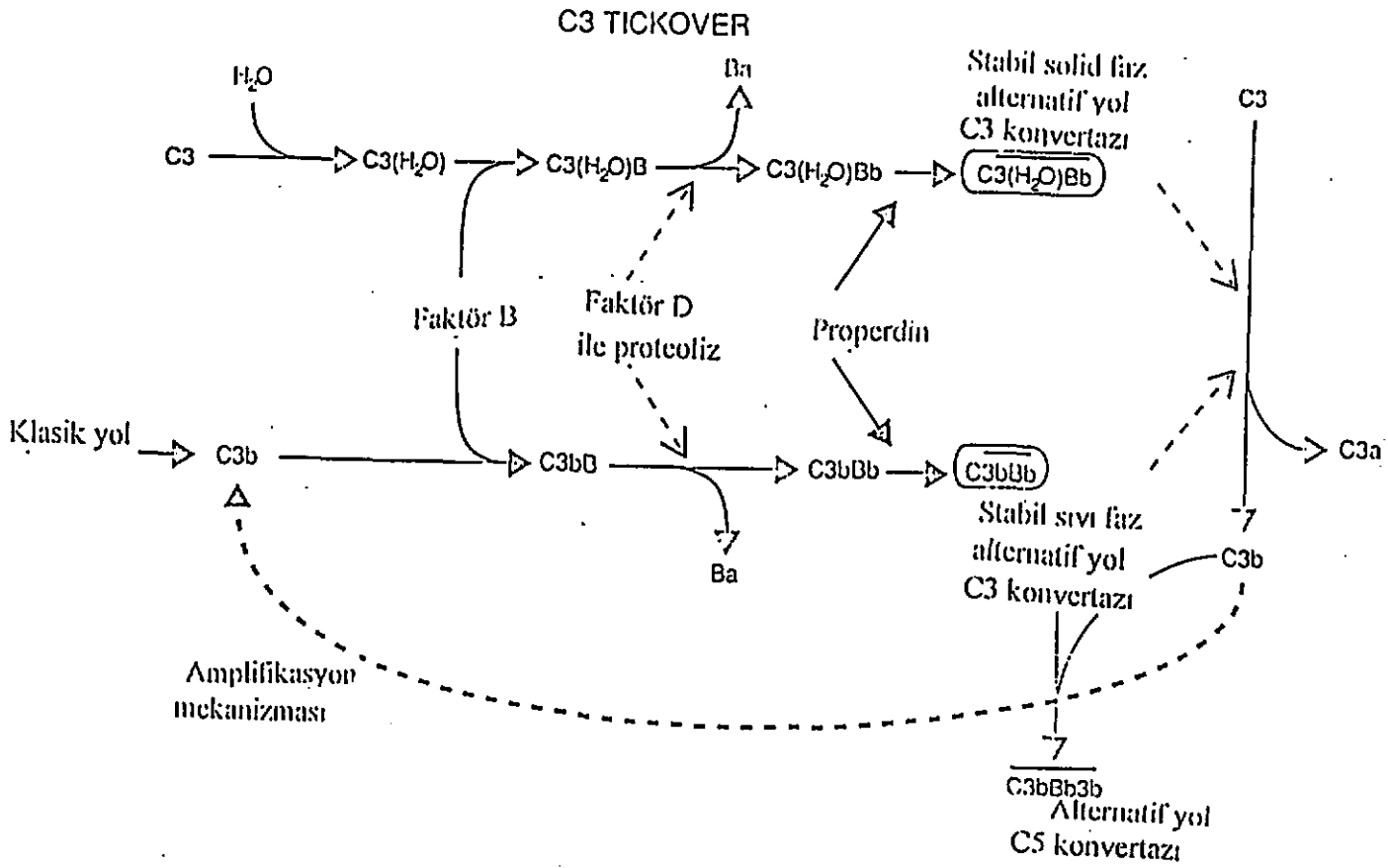
2- Alternatif yol, kompleman sistemi için önemli bir intrinsek amplifikasyon mekanizmasıdır. Yüzeye bağlı C_{3bBb} kompleksi daha fazla C_{3b} molekülünün oluşumuna yol açar. Bu da aynı yüzeyde daha

fazla C_3 konvertaz oluşumuna neden olur. Yani; C_{3b} hem C_3 konvertaz enzim kompleksinin bir üyesidir, hem de bu enzimle oluşturulan bir üründür. Bu durum alternatif yol için bir (+) feed back amplifikasyondur (25) (Şekil 1.4).

Alternatif yol C_3 konvertazı ile oluşan C_{3b} moleküllerinin bir kısmı, C_3 konvertazla yeni bir kompleks oluşturmak üzere bağlanır ($C_{3b}Bb_{3b}$). Bu alternatif yol C_5 konvertazıdır ve klasik yol C_5 konvertazının analogudur. C_5 'i proteolitik olarak parçalar. Bu basamaktan sonra her iki yol ortak olarak devam eder (18,19,26).

Tablo 1.3. Alternatif Yol Proteinleri

Proteinler	Serum Kons. (mg/l)	M.A. (kDa)	Altünite Yapıları
Faktör B	210	93	Tek zincir
Faktör D	2	24	Tek zincir
Properdin	26	220	60 kDa'luk alt ünitler halindeki trimer ve tetramer yapıdaki polimerler
C ₃	1300	190	1 α zincir (1154 kDa) 1 β zincir (75 kDa)



Şekil 1.4. C3 tickover ve amplifikasyon mekanizması

(Abbas K.A et al. Cellular and molecular Immunology 1994;pp:301'den adapte edilmiştir)

1.4.5. Membran Atak Yolu (MAY)

Her iki yolun C_5 konvertazları kompleman sisteminin son komponentlerinin aktivasyonunu başlatır. Sonuçta hedef hücrenin ölümüne neden olan membran atak kompleksi (MAK) oluşur (27).

Bu basamak, her iki yolun aktivasyonu sonucu oluşan C_5 konvertazlardan birinin C_5 'i parçalamasıyla başlar. Kompleman kaskatındaki enzimatik olayların sonuncusudur. Daha sonraki basamaklar intakt proteinlerin bağlanması ve polimerizasyonu ile oluşur (Şekil 1.5).

MAY proteinleri; C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 'dur (Tablo 1.4).

C_5 ; 190 kDa ağırlığındadır, C_3 ve C_4 'e homolog yapıda disülfid bağlarıyla bağlı α (115 kDa) ve β (75 kDa) zincirlerinden oluşur. Ancak internal tiyoester bağı içermez. Serum konsantrasyonu 70 mg/l'dir. Her iki yoldan da gelebilen C_3b molekülüne bağlanır ve sonuçta 11 kDa'luk küçük C_{5a} fragmanı ile, iki zincirden oluşan 180 kDa'luk C_{5b} fragmanı meydana gelir. C_{5a} potent biyolojik etkilere sahiptir. C_{5b} ise; hücre yüzeyine bağlı kalır. Kısa süre içinde kaskatın diğer bir proteini olan C_6 'ya bağlanacak hale gelir (17,18).

C_6 ; tek zincirli bir glikoproteindir. 128 kDa ağırlığındadır. Serum konsantrasyonu 60 mg/l'dir. C_{5b} 'nin de bağlanmasıyla stabil C_{5b6} kompleksi oluşur ve C_7 'ye bağlanana kadar hücre yüzeyinde gevşek bir şekilde tutunur (18).

C_7 ; 121 kDa ağırlığında tek zincirli bir moleküldür, 821 aminoasit içerir. Amino terminali C_8 ve C_9 ile homologtur. Aynı zamanda düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörü, epidermal büyüme faktörü, koagülasyon faktörlerinden IX ve X ile de homoloji gösterir. Serum konsantrasyonu 60 mg/l'dir (27).

C_{5b67} kompleksi çok lipofiliktir. Hücre plazma membranının ya da viral membranların lipid tabakalarını kolaylıkla geçer. Burada C₈ molekülü için yüksek afiniteli integral membran reseptörü haline gelir (27).

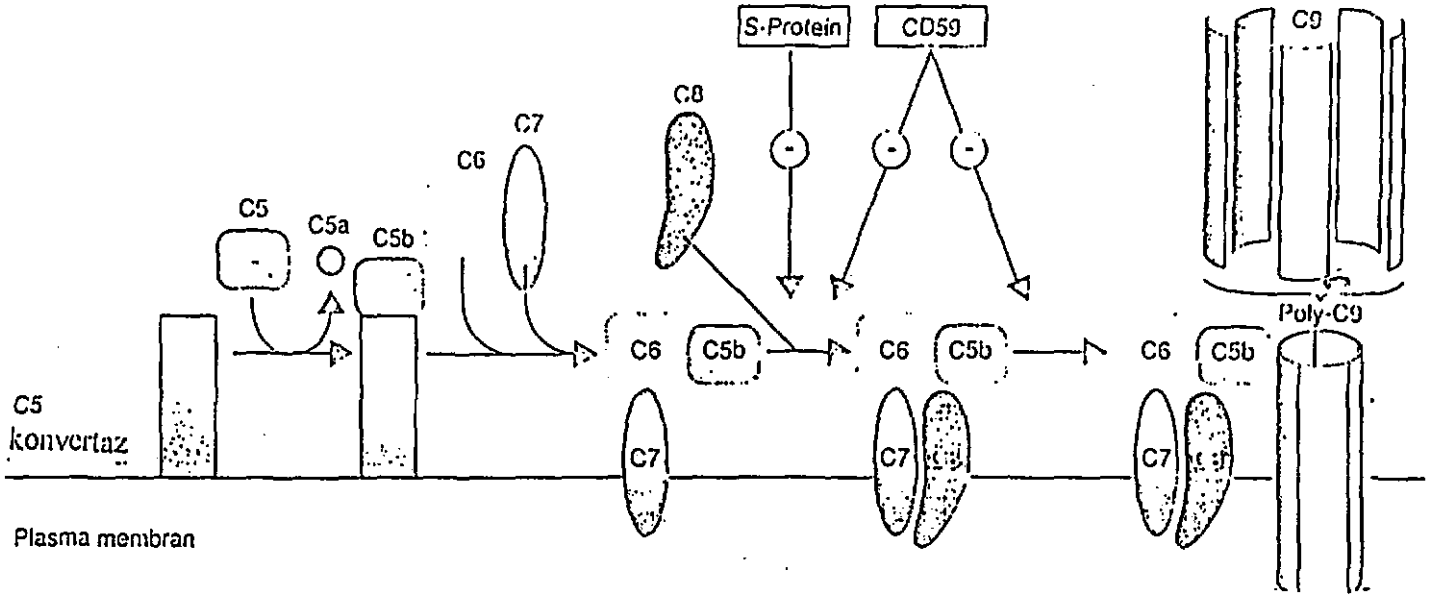
C₈; 155 kDa ağırlığında bir proteindir, üç ayrı zincirden meydana gelmiştir (α , β , γ). β zinciri C₅ için, α zinciri ise C₉ için spesifik tanıma bölgeleridir. Serum konsantrasyonu 60 mg/l'dir. Gama zinciri membran lipid bariyerine girer ve C_{5b678} kompleksi oluşarak hücre yüzeyine stabil olarak bağlanır. Bu kompleks bazı mikroorganizmalar ile ökaryotik hücrelerin lizisini başlatabilme yeteneğindedir ve MAK'ın bir bölümüdür (17).

MAK'ın litik aktivitesindeki artış C₉'un bağlanmasıyla başlar. Kompleman kaskatının son komponenti olan C₉; 79 kDa ağırlığında, monomerik bir serum proteindir. Serum konsantrasyonu 60 mg/l'dir. Amino terminalindeki 39 rezidü segmenti, LDL reseptörünün de en fazla tekrarlanan kısmıdır. Bu domain sisteinden zengindir ve C₈, C₇'nin sisteinden zengin dizileriyle de homologdur (18).

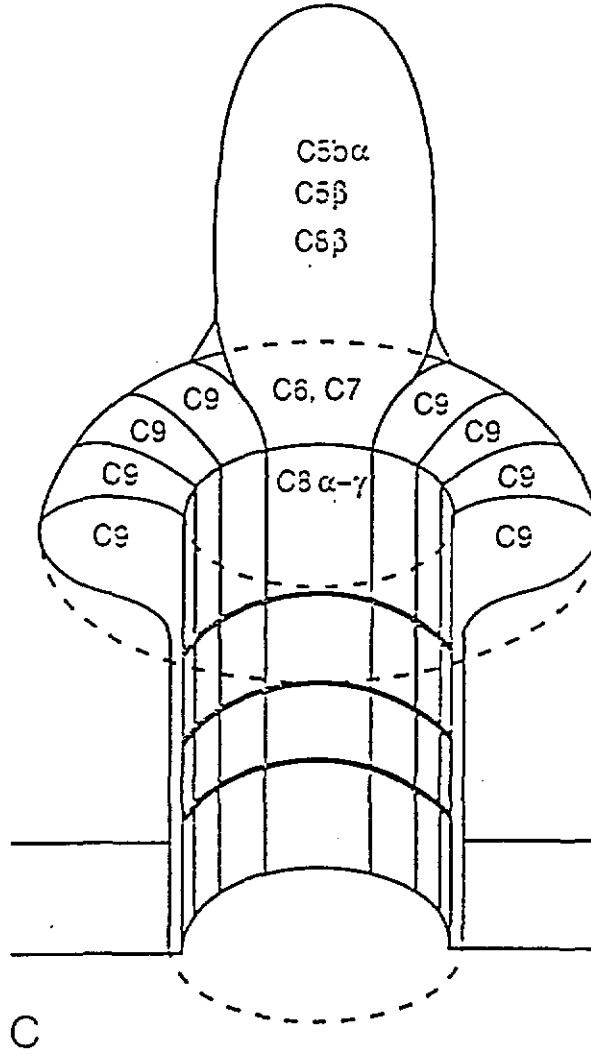
C₉ proteininden 4 adet içeren MAK yeterli litik kapasiteye sahip olur. 12-15 adet C₉ içeren MAK ise poly-C₉ olarak adlandırılır (19). Plazma membranlarında karakteristik elektron mikroskopik görünüm veren porları oluşturur. Bu porlar yaklaşık 110 Å çapındadır ve yapısal görünimleri, sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinde bulunan perforinin oluşturduğu porlara benzemektedir. Porlar; suyun, iyonların ve küçük çözünebilir moleküllerin geçişine izin verirken, proteinler gibi büyük moleküllerin geçişine engel olurlar. Bu durumda; hücre içine su girişi olur, osmotik lizis gerçekleşir. Por oluşumu tamamlanmadan da hücrenin lizise uğraması mümkündür. Bu ise; lipid tabakanın normal yapısının C₅₋₉ kompleksindeki hidrofobik kısımlara bağlı olarak yeniden düzenlenmesine bağlıdır (19) (Şekil 1.6).

Tablo 1.4. Membran atak yolu proteinleri

Proteinler	Serum kons. (mg/l)	M.A. (kDa)	Altünite Yapıları
C ₅	70	190	1 α zinciri (115kDa) 1 β zinciri (75kDa)
C ₆	60	128	Tek zincir
C ₇	60	121	Tek zincir
C ₈	60	155	1 α zinciri (64kDa) 1 β zinciri (64kDa) 1 γ zinciri (22kDa)
C ₉	60	79	Tek zincir



Şekil 1.5. Membran atak kompleksinin oluşumu ve düzenlenmesi (Abbas K.A et al. Cellular and molecular Immunology 1994;pp:302'den adapte edilmiştir).



Şekil 1.6. Hücre membranlarında poly C9 kompleksi (Abbas K.A et al. Cellular and molecular Immunology 1994;pp:303'den adapte edilmiştir).

1.4.6. Kompleman Sisteminin Temel Biyolojik Fonksiyonları

a- Hücre membranlarında porlar oluşturarak hücrelerin lizisine neden olurlar (osmotik lizis).

b-Yabancı organizma ve partiküllere opsonin adı verilen kompleman proteinleri bağlanarak, fagositoz işlemini kolaylaştırır.

c- İnflamasyon reaksiyonun başlaması ve artışı kemotaktik ve anafilotoksin özelliğine sahip kompleman proteinlerinin oluşumu sonucu gerçekleşir.

d-Doku hasarına neden olabilecek immün kompleksler, kompleman proteinlerine bağlanarak zararsız hale getirilirler (17).

1.4.7. Kompleman Sisteminin Düzenlenmesi

Hem klasik, hem de alternatif aktivasyon yolları membrana bağlı veya sıvı fazda bulunan çeşitli proteinlerce sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Tablo 1.5 ve 1.6).

Kompleman sistemin inhibisyonu ve aktivasyonu arasındaki denge, otolog hücrelerin ve dokuların hasardan korunmasını sağlarken, yabancı organizmaların da etkili bir biçimde harap olmalarına neden olur. Düzenleyici proteinlerin eksik olduğu çeşitli hastalık durumlarında, kompleman aktivasyonu kontrolsüz olarak ilerler (25).

Sıvı fazda yer alan serum proteinleri spontan aktivasyonu önlerken, integral membran proteinleri de komplemanın yıkıcı etkisinden otolog hücreleri korurlar. Bazı membran proteinleri aynı zamanda kompleman aktivasyon ürünleri için reseptör görevi yaparlar.

1.4.7.1. Sıvı Faz Düzenleyici Proteinlerinin Fonksiyonları

1.4.7.1.1. C1 İnhibitör

Serum proteaz inhibitörlerinin, serpin ailesinin bir üyesidir, 104 kDa ağırlığında, tek zincirli bir glikoproteindir. Serum konsantrasyonu: 200 mg/l'dir. C_{1r} ve C_{1s}'in enzimatik bölgelerine kovalent olarak bağlanarak dayanıklı ester bağları oluşturur ve böylece C₁ inhibitörü, C_{1r} ve C_{1s}'in substratlarını parçalanmalarına engel olur. Aynı zamanda C₁'in spontan aktivasyonunu da inhibe eder. Kandaki

C₁'in büyük kısmı C₁ inhibitöre bağlıdır. Böylece spontan aktivasyona yol açan konformasyonel değişiklikler engellenir. Eğer C_{1q} alt grubu yoluyla C₁'e antijen-antikor kompleksi bağlanacak olursa C₁ inhibitör molekülden ayrılır ve klasik yol aktivasyonu başlar (19).

1.4.7.1.2. C_{4b} bağlayan protein (C_{4bp})

C_{4bp}; klasik aktivasyon yolunu, C_{4b}'nin yıkımında Faktör I için kofaktör rolü oynayarak ve C₃ konvertazın yıkımını hızlandırarak düzenler. Molekül ağırlığı 550 kDa, serum konsantrasyonu 250 mg/l'dir.

C_{4bp}; aynı zamanda bir antikoagülan olarak rol oynayan vitamin K bağımlı protein S'i inaktive eder.

C_{4bp}; farklı kompozisyona sahip en azından üç alt grup içeren heterojen bir proteindir. En önemli izoformu $\alpha7\beta1$; 7 α zinciri (70 kDa) ve 1 β zinciri (45 kDa) içerir. Diğer izoformları ise; $\alpha7\beta0$ ve $\alpha6\beta1$ 'dir.

C_{4bp α} ve C_{4bp β} zincirleri C_{4bpA} ve C_{4bpB} genleriyle kodlanır. Bu genler kompleman aktivasyonunu düzenleyici gen grubunda yer alır ve esas olarak karaciğerden eksprese edilirler (28).

1.4.7.1.3. Faktör H

Plazmada veya membrana bağlı bulunabilen, tek zincirden oluşan glikoproteindir. C_{4b} bağlayan proteinin homologudur. C_{3b}'ye bağlanarak, Faktör B ve C₅'in bağlanmasına engel olur. Bu sayede alternatif yol C₃ ve C₅ konvertazının oluşumu kısıtlanır. Aynı zamanda C_{3b} ve iC_{3b}'nin katabolizmasında Faktör I'nin kofaktörüdür. Molekül ağırlığı 150 kDa, serum konsantrasyonu 480 mg/l'dir (19).

1.4.7.1.4. Faktör I

Bir serin proteazdır, ama bu enzim grubunun genel inhibitörü olan diizopropil fluorofosfonat ile inhibe olmaz. Ayrıca diğer plazma

serin proteazlarının aksine dolaşında proenzim şeklinde değildir. Molekül ağırlığı 88 kDa, serum konsantrasyonu 35 mg/l'dir.

Faktör I; kofaktörlerin varlığında (H, C_{4b}p, CR1, CR2, MCP gibi) C_{4b} ve C_{3b}'nin α zincirlerinin parçalanmasından sorumludur. C_{4b} α zinciri parçalandığında C_{4c} ve C_{4d} fragmanları oluşur. C_{4c} sıvı faza salınırken, C_{4d} içerdiği tiyoester bağı sayesinde membrana bağlı olarak kalır. C_{3b}, Faktör I ile C_{3f} ve iC_{3b}'ye dönüşür. iC_{3b} de yine Faktör I ile C_{3c} ve C_{3d,g} fragmanları oluşur (Şekil 1.7) (19).

1.4.7.1.5. Anafilotoksin İnaktivatörü

C_{3a}, C_{4a}, C_{5a} gibi anafilotoksinlerin terminal arjinin rezidülerini proteolitik olarak ortaya çıkarır ve onları inaktif hale getirir.

1.4.7.1.6. S Protein

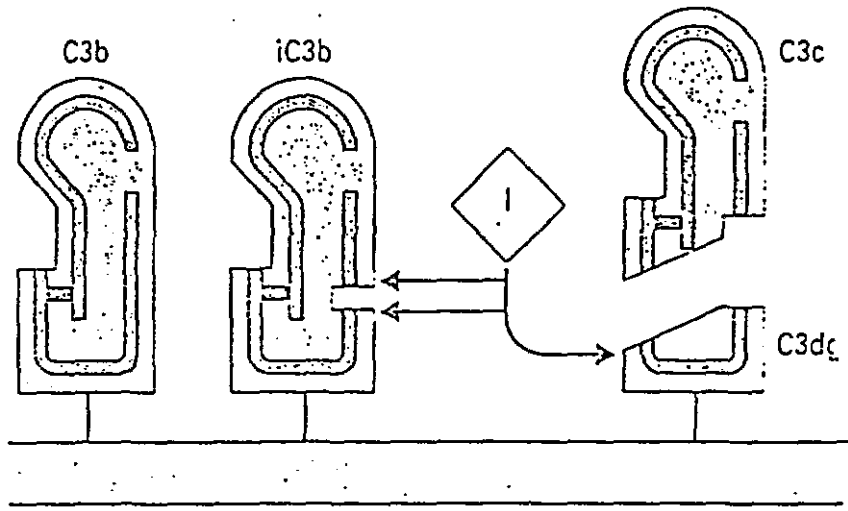
S proteini veya diğer adıyla vitronektin; bir MAY düzenleyicisidir. Molekül ağırlığı 83 kDa ve serum konsantrasyonu da 505 mg/l'dir. Laminin ve fibronektine benzer bir serum proteindir. Çözünebilir C_{5b67} kompleksine bağlanır ve hücre membranlarına girişi engellenerek reaktif lizis inhibe edilir (18).

S protein aynı zamanda koagülasyon sistemiyle de ilişkilidir. Serumda trombinle kompleks oluşturur (18).

1.4.7.1.7. SP 40, 40

SP 40, 40; MAY kontrolünde rol oynayan önemli bir proteindir. C_{5b6} ile başlayan lizisi inhibe eder.

Serum konsantrasyonu 50 mg/l'dir. İki adet aynı büyüklükte 40 kDa'luk zincirden oluşur. Bu zincirlerin amino terminalleri birbirinden farklıdır. Zincirdeki 23 aminoasitin dizilişi C₇, C₈ ve C₉ ile belirgin bir benzerlik gösterir (18). SP 40, 40 mRNA en fazla karaciğer, beyin, pankreas, akciğer, kalp, böbrek dokusunda eksprese edilir.



Şekil 1.7. iC3b'nin Faktör I etkisiyle C3c ve C3 d,g fragmanlarına dönüşümü (Roitt et al. Immunology 1993;p:12.8'den adapte edilmiştir).

Tablo 1.5. Çözünebilir serum proteinleri ve fonksiyonları

Proteinler	M.A (kDa)	İlişkide Oldukları Moleküller	Serum Kons. (mg/l)	Fonksiyonları
C ₁ İnhibitör	104	C _{1r} , C _{1s}	200	Serinproteaz inhibitör, inaktif C ₁ 'e bağlanır spontan aktivasyonu önler. Kallikrein, plazmin, Faktör XIa, Faktör XIIa'yı inhibe eder.
C ₄ bp	550	C ₄ b	250	Klasik yol C ₃ konvertazının yıkımını hızlandırır.
Faktör H	150	C ₃ b	480	Alternatif yol C ₃ konvertazının yıkımını hızlandırır.
Faktör I	88	C ₄ b, C ₃ b	35	C ₄ b ve C ₃ b'yi proteolitik olarak parçalar.
Anafilotoksin İnaktivatör	310	C ₃ a , C ₄ a, C ₅ a	35	Anafilotoksinlerin arjının rezidülerini açığa çıkarır ve inaktifleştirir.
S Protein	83	C ₅ b-7	505	MAK'ın zara girişini engeller.
SP 40,40	80	C ₅ b-9	50	MAK oluşumunu düzenler.

1.4.7.2. Membran Düzenleyici Proteinler

İntegral membran proteinleridir. Bu proteinler de kendi aralarında C₃ ve C₅ konvertaz enzim inhibitörleri ve MAK inhibitörleri olarak iki gruba ayrılırlar (18,19) (Tablo 1.6).

1.4.7.2.1. C₃ ve C₅ Konvertaz İnhibitörleri

Üç membran düzenleyici protein; membran kofaktör protein (MCP), yıkım hızlandırıcı faktör (DAF), kompleman reseptörü tip 1 (CR1); C₃ ve C₅ konvertaz enzimlerinin aktivitelerini kısıtlarlar. Hepsinin yapısal özellikleri birbirlerine ve aynı zamanda C_{3b} veya C_{4b} ile ilişkiye giren kompleman reseptörü tip 2 (CR2), Faktör H, C_{4b}P gibi moleküllerin yapısal özelliklerine benzer. Bu moleküllerin hepsi ortak, yaklaşık 60 aminoasitten oluşan, kısa, tekrarlayan diziler içerirler (SCRs: short consensus repeats). Bu diziler; iki adet disülfid köprüsü ile paketlenmiş dört invariant sistein rezidülerini içerir. Ardarda dizilen bu tesbih tanesi görünümündeki diziler molekülün fonksiyonel açıdan önemli bölgelerini oluşturur. Dizilerin sayısı, molekülden moleküle değişir. CR1’de otuz adet iken, MCP ve DAF’da dörder adettir (27,30) (Şekil 1.8).

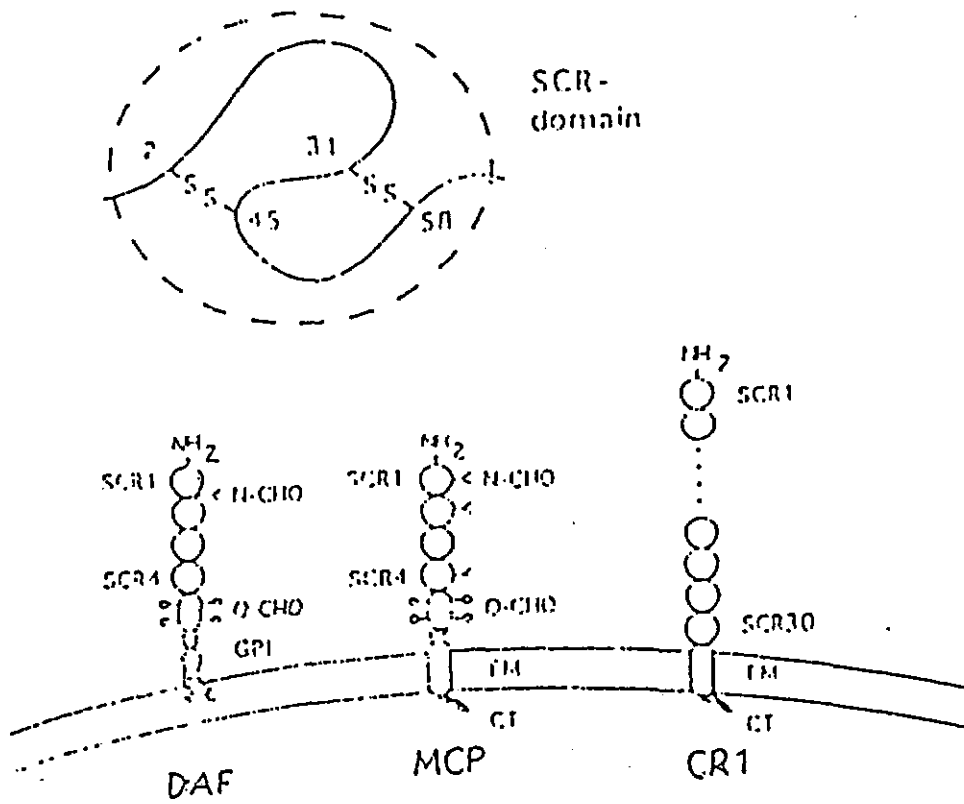
Yapısal olarak benzer bu molekülleri kodlayan genlerin tamamı 1. kromozomun kısa kolunda 1q3.2. bandında bulunur. Bu bölgede “kompleman aktivasyonu düzenleyicileri gen kümesi (RCA: regulatory of complement activation gene cluster)” adı verilir (27,31).

Bu ailenin C₃ ve C₅ konvertazları inhibisyon mekanizması iki şekildedir. Konvertazı oluşturan bimoleküler enzim kompleksinin yıkımını hızlandırmak veya Faktör I aracılığıyla nonkatalitik alt gruplarının (C_{3b} veya C_{4b}) parçalanmasına yardımcı olmak yoluyla etki gösterirler.

DAF ve CR1 yıkımı arttırıcı etki gösterirler. Aynı zamanda membrana bağlı C_{4b} veya C_{3b}’nin prokatalitik öncüleri olan C₂ ve Faktör B’nin birleşmelerini engellerler. Böylece hem oluşmuş konvertazların yıkımı hızlanır, hem de yeni oluşacaklar engellenmiş

olur. Bu sayede konakçı hücre yüzeyindeki C_3 aktivasyonunun amplifikasyonu önlenir.

MCP ve CR1; C_{3b} veya C_{4b} 'nin proteolitik parçalanmasında kofaktör rolü oynarlar. Bir plazma serin proteazı olan Faktör I; MCP ve CR1 gibi membrana bağlı veya Faktör H gibi çözünebilir faktörlerin varlığında C_{3b} ve C_{4b} 'yi parçalar. Bunlar bir kez inaktive olup parçalanınca tekrar aktif C_3 ve C_5 konvertaz formuna dönüşemezler (25,30).



Şekil 1.8. SCR domainleri (Ann Rev Immunol 1986;4:503-528).

Tablo 1.6. İntegral membran proteinleri ve fonksiyonları

Proteinler	M.A.(kDa)	Hedefleri	Fonksiyonları
Kompleman reseptörü tip1 (CR1,CD35)	190-280	C _{3b} , C _{4b} , İC _{3b}	C ₃ , C ₅ konvertazlarının yıkımını hızlandırır. C _{3b} , C _{4b} 'nin Faktör I ile parçalanmasında kofaktördür. İmmün komplekslere bağlanıp fagositozu kolaylaştırır.
Membran kofaktör protein (MCP,CD46)	45-70	C _{3b} ,C _{4b}	C _{3b} , C _{4b} 'nin Faktör I ile parçalanmasında kofaktördür.
Yıkım hızlandırıcı faktör (DAF,CD55)	70	C _{4b} 2b C _{3b} 2b	Klasik ve alternatif yol C ₃ konvertazlarının yıkımını hızlandırır.
Homolog sınırlandırıcı faktör (HRF,C ₈ bp)	65	C ₈ ,C ₉	Reaktif lizisi inhibe eder. C ₈ ve C ₉ 'un MAK'a bağlanmalarını bloke ederek otolog hücre lizisini engeller.
Membranın reaktif lizisini inhibe eden faktör (MIRL,CD59)	18-21	C ₇ ,C ₈	Reaktif lizisi inhibe eder. C ₉ 'un C ₈ 'e bağlanmasını dolayısıyla MAK oluşumunu engeller.

1.4.7.2.1.1.Yıkım Hızlandırıcı Faktör (DAF)

Bu protein ilk kez insan eritrositlerinin stromasında 1969 yılında tanımlanmıştır. Saflaştırılması ise 1981 yılında gerçekleşmiştir (30).

Yıkım hızlandırıcı faktör olarak adlandırılan bu protein; klasik ve alternatif yol C_3 ve C_5 konvertazlarının yıkımını hızlandırır. Ancak Faktör I için kofaktör değildir. C_3b molekülü hücre yüzeyine ester veya amid bağları ile sıkıca tuttur. DAF bu moleküle bağlanarak C_3 konvertaz oluşumunu da engeller (Şekil 1.9).

DAF; 70 kDa ağırlığında, tek zincirden ibaret membrana bağlı bir proteindir. Yaklaşık 381 aminoasitten oluşur ve her biri 60 aminoasit içeren 4 adet kısa tekrarlayan dizi içerir (SCR). Bu dizilerin karboksi terminalleri serin, treonin, prolin rezidülerinden zengindir. LDL ve interlökin 2 (IL-2) reseptörleri ile MCP de de aynı yapı izlenmektedir (32).

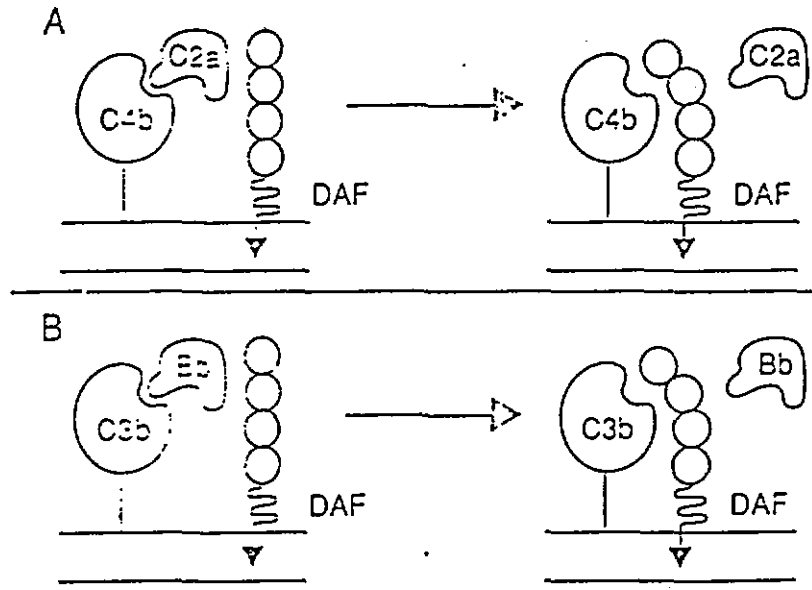
DAF geni; 1. kromozomda CR2 ve C_4b genleri arasında (1q.3.2) yer alır. 11 eksondan ibarettir ve yaklaşık 40 kilobaz kadardır (33).

Dolaşımdaki tüm hücrelerde ve plasentanın anne karnına maruz kalan bölgelerinde DAF ekspresyonu saptanmıştır. Nötrofillerdeki ekspresyonu, intrasellüler depolarına bağlı olarak aktivasyondan sonraki dakikalarda iki kat artar. Eritrositlerdeki miktarı yaşa bağlı olarak giderek azalır (32).

DAF aynı zamanda plazma, tükürük, sinovial sıvı ve beyin omurilik sıvısında da erimiş olarak bulunur. Fakat bu çözünmüş formu hücre membranlarına tutunma yeteneğinde değildir (30).

1.4.7.2.1.2. Membran Kofaktör Protein (MCP)

MCP veya $CD46$ olarak adlandırılan bu protein; C_3b 'ye bağlanarak onun Faktör I bağımlı parçalanmasında rol oynar. Ancak iC_3b 'ye etkili olmadığı gibi, C_3 konvertazın yıkımını hızlandırma etkisi de yoktur. Daha zayıf olarak C_4b 'ye bağlanıp onun da parçalanmasını artırır.



Şekil 1.9. Yıkım hızlandırıcı faktör (DAF'ın etki mekanizması (Springer Semin Immunopathol 1994;15:369-395).

DAF'den farklı olarak biyolojik membranlara giremez, ama kofaktör aktivitesi sıvı fazda da devam eder. Hatta sıvı faz C_{3b} 'si için Faktör H'den 50 kat daha potenttir. Ancak asıl görevi, membrana bağlı C_3 ve C_5 konvertazları inaktive etmek için intrinsek kofaktör olmasıdır (30) (Şekil 1.10).

MCP; plateletler, granüositler, sitotoksik ve yardımcı T lenfositleri, B lenfositler, NK hücreleri, monositler, epitelial ve endotelial hücreler, fibroblastlar, ayrıca spermatozoa ve plasental trofoblastlarda da yaygın olarak bulunur (30).

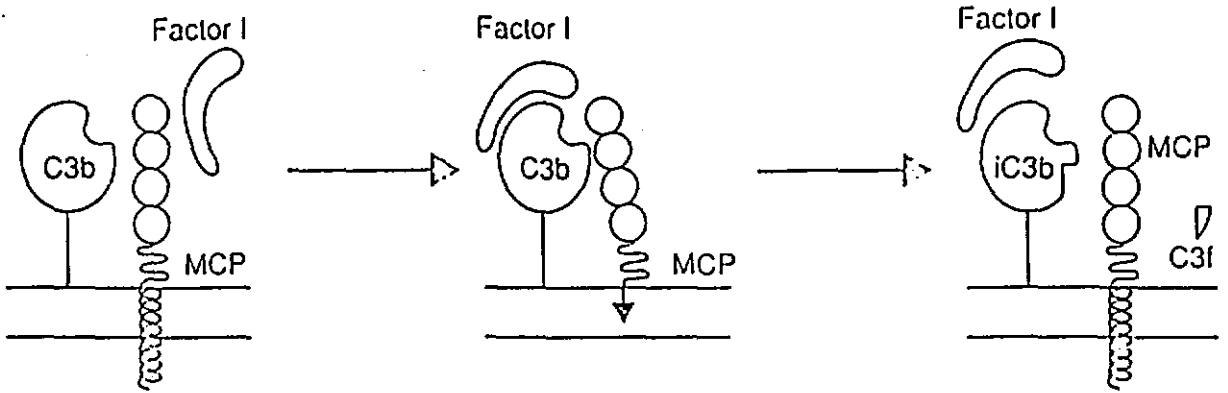
MCP cDNA'sı 384 aminoasitten oluşur. Geni 14 ekzon içerir, 43 kilobaz kadardır ve CR1 geniyle komşudur (30,34).

1.4.7.2.1.3. Kompleman Reseptörü Tip 1 (CR1)

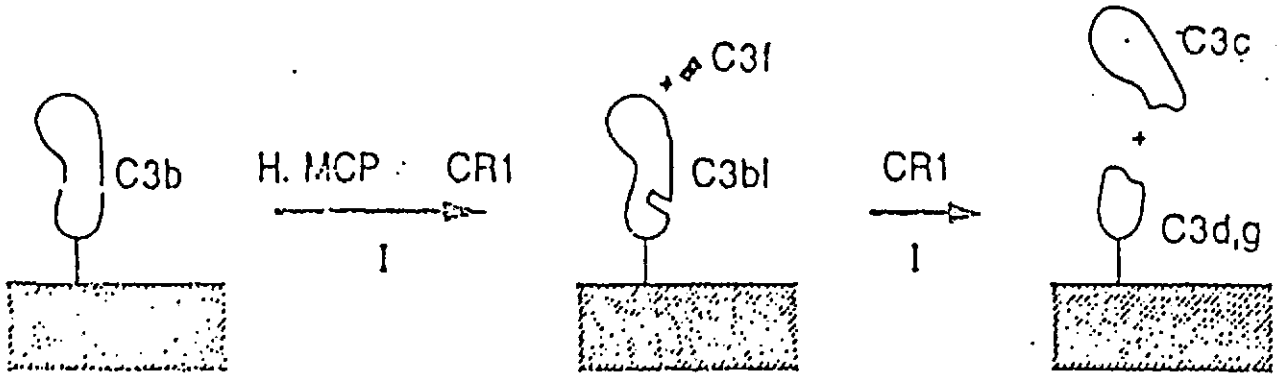
CR1 veya diğer adıyla CD_{35} ; büyük, 190-280 kDa ağırlığında, polimorfik bir glikoproteindir. Geni 160 kilobaz kadardır ve 42 ekzon içerir. C_{3b} ve C_{4b} 'nin Faktör I ile parçalanmasında kofaktördür. Aynı zamanda iC_{3b} 'nin C_{3c} ve $C_{3d,g}$ 'ye dönüşümü ve inaktivasyonunda da tek kofaktördür. Bu özelliği ile sadece ilk aşamada etki gösteren MCP'den farklıdır (17) (Şekil 1.11).

CR1 ekspresyonu; eritrositler, granüositler, monositler, B ve bazı T hücreleri, böbrek podositleri, periferik sinir liflerinde gösterilmiştir (30).

CR1; nötrofil, monosit ve makrofajlarda endositoz ve fagositoza aracılık eden bir reseptör görevi üstlenir. Eritrositler ve plateletlerde ise; immün komplekslerin toplanmasına yardım ederek bunların mononükleer fagositik sistem hücrelerine taşınmasına katkıda bulunur. B lenfositlerdeki CR1; CR2 ile birlikte lenfosit aktivasyonu için aracı reseptör görevini yapar. Plazmada sıvı fazda da CR1 molekülü saptanmıştır ama bu formun fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılamamıştır (35).



Şekil 1.10. Membran kofaktör protein (MCP) etki mekanizması (Springer Semin Immunopathol 1994;15:369-369).



Şekil 1.11. CR1 etki mekanizması (Liszewski M.K et al. Ann Rev Immunol 1991;9:431-55'den adapte edilmiştir).

1.4.7.2.2. Membran Atak Kompleksi İnhibitörleri

1.4.7.2.2.1. Homolog Sınırlayıcı Faktör (HRF)

Bu proteinin saflaştırılması 1970'li yıllarda olmuş, C₈'e bağlanan protein veya membranı inhibe eden protein gibi çeşitli adlarla anılmıştır. Komplemana bağlı lizisi inhibe etmede oldukça etkili bir proteindir (30).

Eritrositler, plateletler, T ve B lenfositleri, nötrofillerde ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca podositlerde, amniotik epitel hücrelerinde ve troid follikül hücrelerinde de bulunmaktadır (30).

Eritrositlerdeki HRF 65 kDa, çekirdekli hücrelerdeki ise 50-65 kDa ağırlığındadır. HRF'nin sıvı formu plazma ve idrarda bulunur. Bu formu C_{5b-8} membran atak kompleksini tanır ve C₉ polimerizasyonunu önler.

Çözünmüş formunun aynı zamanda sitotoksik T hücrelerinde de bulunduğu ve hedef hücrelerin lizisini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulguya dayanılarak HRF'nin sitotoksik hücrelerin korunmasında ve hücrel sitotoksitenin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (29).

1.4.7.2.2.2. Membranın Reaktif Lizisini İnhibe Eden Faktör (MIRL,CD₅₉)

1988 yılında Sugita ve arkadaşları tarafından ilk kez saflaştırılan bu glikoprotein, tek zincirli ve 18-21 kDa ağırlığındadır. İnsan hücrelerindeki en önemli MAK inhibitörüdür (36).

CD₅₉; aktivitesini C₈'in α zincirine ve C₉'un b domainine bağlanarak gösterir. Böylece C₉'un polimerizasyonu ve membranda bulunan C_{5b-9} kompleksine bağlanması inhibe edilir (37,38) (Şekil 1.12).

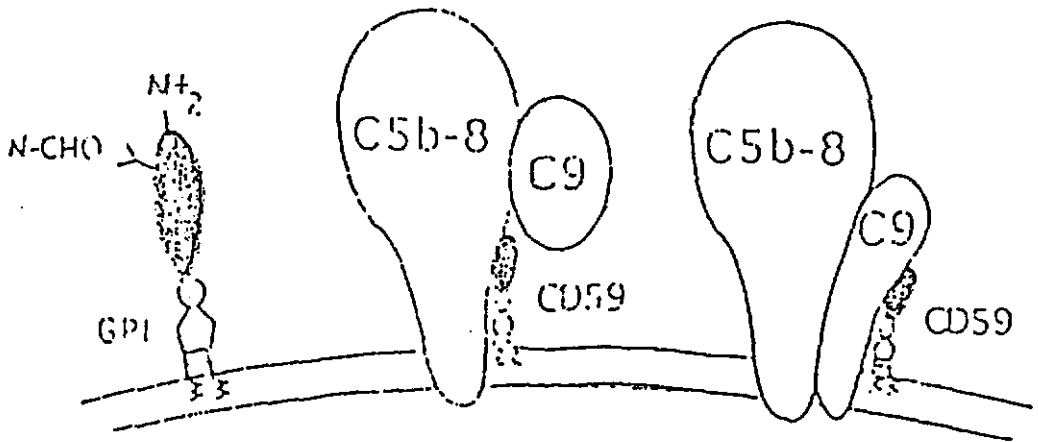
Biyokimyasal ve cDNA klonlama çalışmaları CD₅₉'un hücre membranlarına glikozil fosfatidil inozitolden oluşan (GPI) uzantısı ile

tutunduğunu göstermiştir (38). Dizi analizleri; terminal kompleman komponentlerinden ve hatta diğer komplemet faktörlerinden hiçbirisi ile benzerlik göstermediğini ortaya koymuştur. Sadece sıçan Ly6 süper gen ailesiyle yapısal benzerliği gösterilmiştir (39). Bu lenfosit antijenlerinin, T hücre aktivasyonunda rol oynadığı kabul edilmektedir. Benzer olarak uygun kositümülatörlerin varlığında CD59 epitopları T hücre aktivasyon kaskadının erken ve geç dönem olaylarını uyarmaktadır, yani T hücre aktivasyonunda aksesuar molekül rolünü üstlenmektedir (40,41). Böylece CD59 sadece otolog hücreleri kompleman lizisine karşı korumakla kalmaz, muhtemelen aynı zamanda immün cevabın belirlenmesinde hücre-hücre ilişkilerini de düzenler (42).

Bu protein organizmada çok yaygın olarak ekprese edilmektedir. Dolaşımdaki tüm hücrelerin (43) yanı sıra glomerüler podositler (44), epitelial ve endotelial hücreler (45), karaciğer hücreleri (46), spermatozoalarda da (47, 48) bulunduğu ispatlanmıştır. Nishikori ve arkadaşları, CD59'un erken dönemde sito ve sinsityotrofoblastlardan ekprese edildiğini göstererek fetal korumada da bir rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (49).

CD59'un çözünabilir formu; idrar, göz yaşı, ter, tükürük, meme sütü, plazma, amniotik sıvıda saptanmıştır. Ancak bu form membranlara tutunamadığı için kompleman inhibisyonu etkisi ya hiç yoktur ya da çok azdır (49,50).

Bu proteinin ekspresyonu bazı patolojik durumlarda ve bazı uyarıcılar karşısında değişmektedir. Normal miyokard dokusunda saptanan ekspresyonun miyokard infarktüsü sonrasında kaybolduğu tesbit edilmiştir (51). Sinir dokusunda az miktarda bulunurken Alzheimer hastalığında dejeneratif alanlarda ekspresyonu çok artmaktadır. Endotel hücrelerindeki miktarı ise; forbolmiristat asetat (PMA), cAMP, kalsiyum iyonoforu A23187 gibi ajanlarla artmaktadır. Bu ajanlar; protein kinaz C uyarıcılarıdır ve CD59 ekspresyonunu artırır. Özellikle de inflamasyon ve vaskülit durumlarında CD59'un ekspresyonu çok artar. Bu ya CD59 geninin transkripsiyonunda ya da transkriptin stabilitesindeki artışa bağlıdır. Her hücredeki ekspresyon artışı da, o hücrenin antikör ve komplemana bağlı lizisine karşı direnç artışına yol açar (53).



Şekil 1.12. CD₅₉ etki mekanizması (Springer Semin Immunopathol 1994;15:369-369).

Uzun depolanma süresi boyunca, yüksek sıcaklıkta bile aktivitesi aynı kalan CD59 molekülü, yapısındaki disülfid bağları nedeniyle indirgeyici ajanlara karşı çok duyarlıdır (20).

Southern blot çalışmaları CD59'u kodlayan genin 11. kromozomun kısa kolunda (p14-p13) lokalize olduğunu göstermiştir. Bu gen DNA'nın 20 kilobazını işgal eden, 4 adet ekson içeren oldukça büyük bir gendir ve Northern analizlerinde 5 farklı uzunlukta mRNA transkripleri saptanmıştır (6,2.2,1.9,1.2,0.6 kb) (54,55).

Tüm membrana bağlı kompleman düzenleyici proteinler ve özellikle de DAF ve CD59'un kalıtsal eksikliği proksimal nokturnal hemoglobinüri (PNH) hastalarda gösterilmiştir (56). Bu grubun ortak özellikleri GPI uzantıları olduğundan, hastalığın asıl mekanizmasının bu uzantının normal senteziyle ilişkili olan PIG-A genindeki mutasyona bağlı olduğu düşünülmektedir. PIG-A genindeki somatik mutasyonlar pluripotent kök hücreyi etkilemekte ve bunun sonucu olarak GPI uzantısı taşıyan bu proteinler, tüm hemopoetik elemanlarda eksik olmaktadır. Böylece kompleman sisteminin litik etkisi kısıtlanamaz ve hemoliz meydana gelir (57).

DAF'ı normal olup, sadece CD59 proteininde eksiklik bulunan PNH'lı hastalarda hemoliz sıklıkla gözlenmektedir. Buna karşın CD59'u normal olup, DAF eksikliği olanlarda herhangi bir hemoliz belirtisine rastlanmamakta, ancak bu hastaların eritrositleri, normal kişilerin eritrositlerine oranla kompleman atağına daha duyarlı hale gelmektedir. Bu bulgular, PNH patogenezinde CD59 eksikliğinin daha önemli olduğunu düşündürmektedir (56).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ocak 1995-Ocak 1997 tarihleri arasında H.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmaya onkoloji polikliniğine başvuran yeni akut lösemi tanısı alan hastalar dahil edilmiştir.

Yaşları 18 ile 66 arasında değişen ALL (4) veya AML (4) tanısını yeni almış ve henüz hiçbir tedavi başlanmamış toplam 8 hastanın periferik kan veya kemik iliği örnekleri çalışılmıştır.

Laboratuvar çalışanlarından 5 kişi de sağlıklı kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

1. Heparinle yıkanmış plastik enjektörlere steril koşullarda periferik kan ve/veya kemik iliği örnekleri alınmıştır.

2. Ficoll (Histopaque)

3. Kültür Ortamı

RPMI 1640 mediumu	(43.5 cc)
Fetal calf serum	(% 10-20) (5 cc)
L-Glutamin	(0.5 cc)
Penisilin / streptomisin	(0.5 cc)
Fungizone	(0.5 cc)

4. Bakteri Kültür Ortamı ve Tamponlar

L-Broth: Bactotryptone (10 g), NaCl (10 g), Yeast agar (5 g)

L-Broth Agar: Bactotryptone (10 g), NaCl (10 g),

Yeast agar (5 g) Bactoagar (10 g)

Lizozim karışımı: Glukoz (5mM), EDTA (10 mM)

1x Tris Borate EDTA (TBE): This base (54 g), Borik asit (27,5 g) EDTA (500 mM)

20x Fosfat tampon salin (PBS): NaCl (320 g)
K₂ HPO₄ (48,4 g)
KH₂PO₄ (13,6 g)

5. Nükleik Asit Manipasyonu için Kullanılan Solüsyonlar

10x MOPS: Sodyum morpholinopropansulfonik asit (0,2 M),
Sodyum asetat (0,05 M), Disodyum EDTA (0,01 M)

20x SSPE: Sodyum klorid (3 M), Sodyum dihidrojen ortofosfat
(0,2 M), EDTA (0,02 M)

10x SSC: Sodyum klorid (1,5 M), Trisodyum sitrat (150 mM)

100x Denhard's solüsyonu: Ficoll (2 g), Polivinil pirolin (2 g),
Bovine serum albumin (2 g)

Salmon sperm DNA (1 mg/ml): 0,1 g salmon sperm DNA 100 ml
suya eklenir.

Sample buffer (Örnek tampon): Formamide (150 µl), 1xMOPS
(30 µl), Gliserol (20 µl),
Formaldehit (48 µl), DEPC.H₂O
(20 µl), Bromo fenol mavisi
(% 10) (16 µl)

TE buffer: Tris. HCL (10 mM), EDTA (1 mM)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (% 10): SDS (10 g), H₂O (90 ml)

Dye mix (RNA için boya karışımı): Etidyum bromid (10 mg/ml)
(1 g), H₂O (100 ml)

Dye mix (DNA için boya karışımı): Brom fenol mavisi (% 0.01)
Gliserol (% 50)

2.2 Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi

Heparinli enjektöre 10 cc periferik kan örneği veya 2,5 cc kemik iliği örneği alındı. Alınan örnek PBS ile 1:1 oranında dilüe edildi ve Falcon tüpteki 5 cc Ficoll üzerine yayıldı. 1800 rpm'de 20 dakika çevrildi. Santüfütüj sonrası interfazdaki mononükleer hücreler Pastör pipetiyle toplanarak santrüfütüj tüpüne kondu. Üzerine 8 cc PBS eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika çevrildi. Süpernatant atılarak aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Daha sonra ml'de 1×10^6 hücre olacak şekilde sayım yapıldı. Hücreler RPMI 1640 mediumda monositlerin

yapışmasını sağlamak için 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda en az 3 saat inkübe edildi (58).

2.3 Akım Sitometri Analizi

Ayrılan 1x10⁶ hücre üzerine mouse antihuman CD59 FITC (MEM43, Serotec) konuldu. İzotipik kontrol olarak MS IgG kullanıldı. 30 dakika + 4°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası 3 kez PBS ile 1800 rpm'de, + 4°C'de 5 dakika yıkandı. Üzerine fluoresan işaretli antikordan 5 µl eklenerek 30 dakika daha + 4°C'de bekletildi. PBS ile bir kez daha yıkanarak 5 dakika 1800 rpm'de santüfjüj edildi. Akım sitometri aletinde (EPICS 541, Coulter electronics, UK) 5000 hücre sayılarak analiz yapıldı (58).

2.4. Total Hücre RNA'sının İzolasyonu

Hücreler 1800 rpm'de 5 dakika santüfjüj edildi ve pellet haline getirildi. Süpernatant atılarak 5x10⁶ hücre için 1 ml trizol eklendi. Pipetle karıştırılarak oda ısısında bekletildi. Eklenen her 1 ml trizol için 200 µl kloroform ilave edildi, 2-3 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 15 dakika 13000 rpm'de + 4°C'de santüfjüj edildi.

Berrak faz üstten alınarak her 1 ml trizol için 500 µl isopropanol eklendi. Tüp içeriği vorteksle karıştırılıp, oda ısısında 10 dakika bekletildi. Sonra tekrar + 4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santüfjüj edildi.

% 75'lik etanolden başka kullanılan her 1 µl trizol için 500 µl eklendi. 5 dakika santüfjüjün ardından üstteki kısım atılarak tekrar etanol ilave edildi. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanıp, süpernatant atıldıktan sonra pellete 500 µl etanol konulup, kullanılıncaya kadar -20°C'ye kaldırıldı (59).

2.5. RNA Jel Elektroforezi

RNA elektroforezi için jel şu şekilde hazırlandı:

1 gram agaroz

84, 4 ml DEPC. H₂O

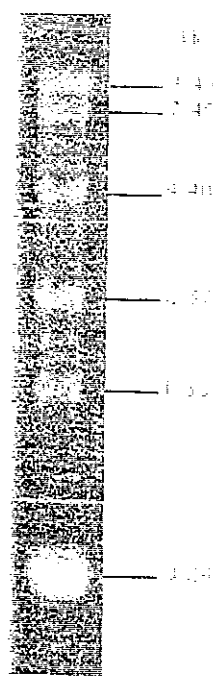
10 µl 10xMOPS

20 µl DEPC karışımı bir erlenmayere konularak 2 dakika mikrodalga fırında ısıtıldı. Çözünen bu karışım 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 5.6 ml formaldehit eklendi. Hazırlanan elektroforez tankına, kabarcık oluşturmayaacak şekilde döküldü. Yaklaşık 40 dakika kadar donması beklendi. Daha sonra tanka 1xMOPS'dan 200 ml ilave edildi. Taraklar çıkarılarak hazır hale getirildi.

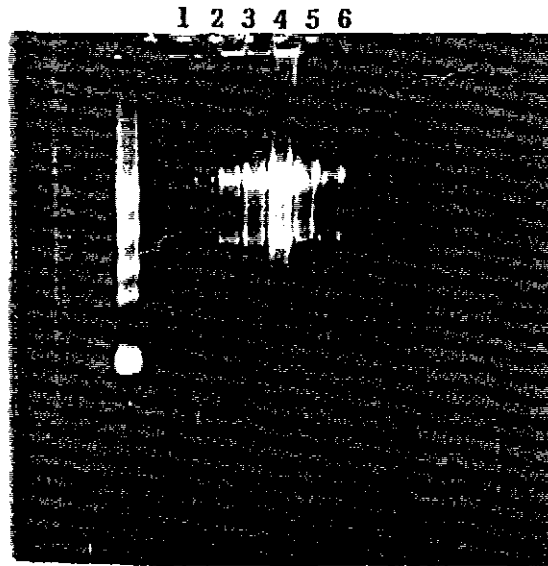
Daha önceden ayrılan RNA pelletleri -20°C çıkarılarak 5 dakika santürlüj edildi, üzerindeki alkol kısmı alınarak buz üzerine aktarıldı. Pelletin büyüklüğüne göre 10-30 µl TE buffer eklendi. Çözülen RNA'nın miktarı 2.7'de anlatıldığı gibi ölçüldü ve 10 µg'ı örnek tampon (sample buffer) ile karıştırıldı, 65°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek RNA denatüre edildi. Tekrar buz üzerine alınarak üzerine hazırlanmış stok etidyum bromür boyasından (1 mg/ml) 1 µl konuldu. Bu karışım jel tankının kuyucuklarına yerleştirildi. RNA markerda (0.23-9.5 kb) (Şekil 2.1) aynı jeldeki bir kuyucuğa konularak yüksek voltaj altında (100 V ve 70 mA) 2 saat süreyle elektroforez yapıldı (Şekil 2.2) (60).

2.6. Northern Blot Analizi

Elektroforez sonrası jeldeki RNA'lar UV ışığı altında kontrol edildi. RNA'nın Hybond-N⁺ membranlara transferi Amersham protokolünde olduğu gibi alkalın tampon olarak 0.05 M NaOH kullanılarak gerçekleştirildi. Plastik bir kaba yaklaşık 500 cc NaOH konuldu. Üzerine belli bir yükseklikte cam plaklar yerleştirildi. Üç adet 3M kağıdı cam büyüklüğünde kesilerek NaOH ile ıslatılıp, cam üzerine arada hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde yayıldı. Bunların üzerine jel ve (+) yüklü membran yerleştirildi. En üstte de birkaç kat kurutma kağıdı konuldu. Üç saat sonunda transferin gerçekleşip gerçekleşmediği UV ışığı altında kontrol edildi. Daha sonra membran 2 x SSC ile yıkanarak naylona sarıldı ve kullanıma kadar -20 °C'ye kaldırıldı (60).



Şekil 2.1. Northern Blot analizinde kullanılan RNA ladder (marker), 0.24-9.5 kb



Şekil 2.2. RNA jel elektroforezi

1 ve 2 numaralı kuyularda kontrol grubu, 3. ve 4. kuyularda AML'li, 5. ve 6. kuyularda ALL'li hastalardan izole edilen RNA örnekleri yer almaktadır.

2.7. DNA ve RNA ölçümleri

DNA ve RNA'nın kantitatif ölçümleri spektrofotometri de (LKB Ultraspec K 4053) 260 ve 280 nm'de yapıldı ve 260 nm dalga boyunda 1.0'in optimal dansitesi çift zincirli DNA'nın yaklaşık 50 µg/ml'sine, tek zincirli DNA'nın veya RNA'nın yaklaşık 40 µg/ml'sine karşılık geldi. DNA ve RNA'nın 1 µl'si 1 ml su ile dilue edildi ve 260 ve 280 nm'de okundu.

2.8. Plazmid DNA Hazırlanması

Uygun plazmite transforme edilmiş E Coli'nin gliserol stoğu daha önceden hazırlanmış L-Broth agar ve uygun antibiotik (ampicilin 100 ng/ml) içeren petri kutularına steril öze yardımıyla yayıldı. Bu petriler bir gece boyunca 37 °C'de inkübatörde bırakıldı.

Ertesi gün Falcon tüpe 10 ml L-Broth ve 10 µl ampicilin konuldu. Üreme olan petriden tek bir koloni alınarak bu tüpe ilave edildi, gece boyunca 37°C'de bırakıldı. Bu L-Broth kültürden 1,5 ml alınıp 13000 rpm'de 2 dakika santüfuj edildi. Süpernatant alınarak aynı işlem bir kez daha yinelandı. Süpernatant atılıp üzerine daha önce hazırlanmış olan lizozim solüyonundan 200 µl ilave edildi. Yeniden süspansiyon haline getirilerek 5 dakika oda ısısında bekletildi. 400 µl taze hazırlanmış 0.2 M NaOH/SDS % 1 karışımı eklenerek karışması sağlandı. Karışım şeffaflaşınca buz üzerinde 5 dakika bekletildi, 300 µl 3 M sodyum asetat eklendi ve 10 dakika buz üzerine alındı. Sıvı bulanıklaşınca 13000 rpm'de 5 dakika süreyle santüfuj edildi. 37°C'de 5 dakika bekletildi. Berrak süpernatandan 800 µl alınarak diğer bir tüpe aktarıldı. Üzerine 48 µl isopropanol konuldu, -20°C'de 1 saat bekletildi. 13000 rpm'de 10 dakika santüfuj edildi. Süpernatant atıldı. DNA pelleri % 95'lik etanolle yıkanarak -20°C'ye kaldırıldı (61).

2.9. DNA Düşük Erime Noktalı Agaroz Jel Elektroforezi

Önceden hazırlanan plazmid DNA'ları -20°C'den çıkarılarak 5 dakika 13000 rpm'de santüfujlendi. Etanol atılarak pellet TE bufferda çözüldü. Öncelikle cDNA insertlerinin elde edilebilmesi bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

Uygun restriksiyon endonükleazı (Xbal)	(5 µl)
Plazmid DNA'sı	(10 µl)
Hazır enzim tamponu	(10 µl)
Spermidin (20 mM'lik)	(5 µl)
H ₂ O	(50 µl)

Bu karışım 37°C'lik su banyosunda bir gece boyunca bekletildi. Ertesi gün 60°C'de 5 dakikada ısıtıldı ve buz üzerinde soğutuldu. 1/10 volüm DNA için boya karışımı (dye mix) eklendi (62).

Düşük erime noktalı agaroz jel hazırlamak için 1 gram agaroz 100 ml 1 x TBE içerisinde mikrodalga fırında çözüldü. Solüsyon soğutulup 50°C'ye geldiğinde içine 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. Elektroforez tankına yayılan jel soğuk odada donmaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuklara DNA örnekleri yerleştirildi, 50 V ve 50 mA'de elektroforez yapıldı. İlk kuyucuğa 1 kb DNA ladder yerleştirildi.

2.10. Agaroz Jelden İnsert DNA Elde Edilmesi

Jel UV kutusu üzerine konularak ilgili bant kesilip çıkarıldı. Ependorf bir tüpe konularak, üzerine 5 volüm steril H₂O eklendi, 65°C'lik su banyosunda 5 dakika süreyle ısıtıldı. Böylece agarozun erimesi sağlandı. Eşit volümde fenol ilave edilerek vortekslendi. 65°C'de 1 dakika tutulup 13000 rpm'de 5 dakika santüfütüj edildi. Berrak faz alınıp üzerine fenol eklenerek aynı aşamalar yineleni. Santüfütüj sonrası ayrılan berrak faza 1/10 volüm 3 M sodyum asetat ve 2 volüm etanol ilave edildi. Bir gece boyunca -70°C'de bırakıldı. Ertesi gün 13000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santüfütüjlendi ve oluşan pellet iki kez % 70'lik etanolle yıkandı, 50 µl TE tampon (buffer) içinde çözülerek -20°C'de saklandı (62).

2.11. Prehibridizasyon

Bir hibridizasyon solüsyonu hazırlandı:

20 x SSPE	(6.25 ml)
100xDenhard's solüsyonu	(1.25 ml)
Formamide	(12.5 ml)

% 20 SDS	(1.25 ml)
H ₂ O	(3.75 ml)
Salmon sperm	(200 µl)

(10 dakika kaynatılıp, 5 dakika buzda soğutulup en son ilave edildi)

Northern blotlarının bulunduğu naylonlara yaklaşık 5 ml solüsyon eklendi. Blotlar yeniden naylonla kaplanarak 42°C'lik sallanan su banyosunda gece boyunca bırakıldı (63).

2.12. cDNA'nın Radyoaktif İşaretlenmesi

cDNA proplarının radyoaktif işaretlerinin Random Primed DNA Labelling Kit (Boehringer) kullanılarak yapıldı. cDNA -20°C'den çıkarılıp 10 dakika kaynatıldı ve 5 dakika buzda soğutuldu.

dGTP	(1 µl)
dATP	(1 µl)
dTTP	(1 µl)
Reaksiyon karışımı	(2 µl)
Steril H ₂ O	(5 µl)
DNA polimeraz 1 Klenow fragmenti	(1 µl)
(αP ³²) dCTP	(5 µl)

tüpe konularak 30 dakika 37°C'de bırakıldı (63).

2.13. Kolon Kromatografisi ve Hibridizasyon

Pastör pipeti içine yaklaşık 1 cm uzunluğunda cam yünü yerleştirildi. Üzerine Biogel A (1.5 M) ilave edildi. 37°C'de bırakılan proba, 20 µl prob boya karışımı (dye mix) eklendi. Tamamı hava kabarcığı olmayak şekilde kolondan geçirildi. Mavi renk oluşturan işaretli probdan yaklaşık 500 µl bir eppendorf tüpüne toplandı. Toplanan prob 10 dakika süreyle kaynatıldı ve 5 dakika buzda soğutuldu. Hibridizasyon tamponu içeren blotların her birine radyoaktif işaretli probdan 1x10⁶ cpm/ml konsantrasyonda olacak şekilde eklendi. 40°C'lik su banyosunda gece boyunca bırakıldı.

Blotlar ertesi gün naylonlarından çıkarılarak 2 x SSC/% 0.1 SDS solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yıkandı. Daha sonra

aynı solüsyonda 60°C'lik sallanan su banyosunda 30 dakika bırakıldı. Bu aşamadan sonra 0.5 SSC/% 0.1 SDS ve 0.1 SSC/% 0.1 SDS ile 60°C'de iki yıkama daha yapıldı.

Blotlar sayacıta kontrol edilerek, yıkamanın yeterli olduğu düşünüldüğünde naylonla kaplanıp, intensifiye ekranlı kasetler içinde (RPN 6 Hyperfilm MP 18x24 cm) ekspozite edildi, -70°C'ye kaldırıldı. Ekspozisyon zamanı 1-15 gündü (63).

2.14. 28S rRNA'nın Radyoaktif İşaretlenmesi

Blotların normalizasyonunu değerlendirebilmek için 2.12'deki işlemler bir kez de 28S rRNA için uygulandı. Radyoaktif olarak işaretlenen 28S rRNA blotları naylonla kaplanarak aynı film kasetlerinde -70°C'ye kaldırıldı.

2.1.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistikleri Student t testi ile yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışma grubuna, yeni tanı almış ve herhangi bir tedavi başlanmamış akut lenfoblastik lösemili (4), akut myelositer lösemili (4) hastalar ile sağlıklı kontrol grubu (5) olmak üzere toplam 13 örnek dahil edilmiştir.

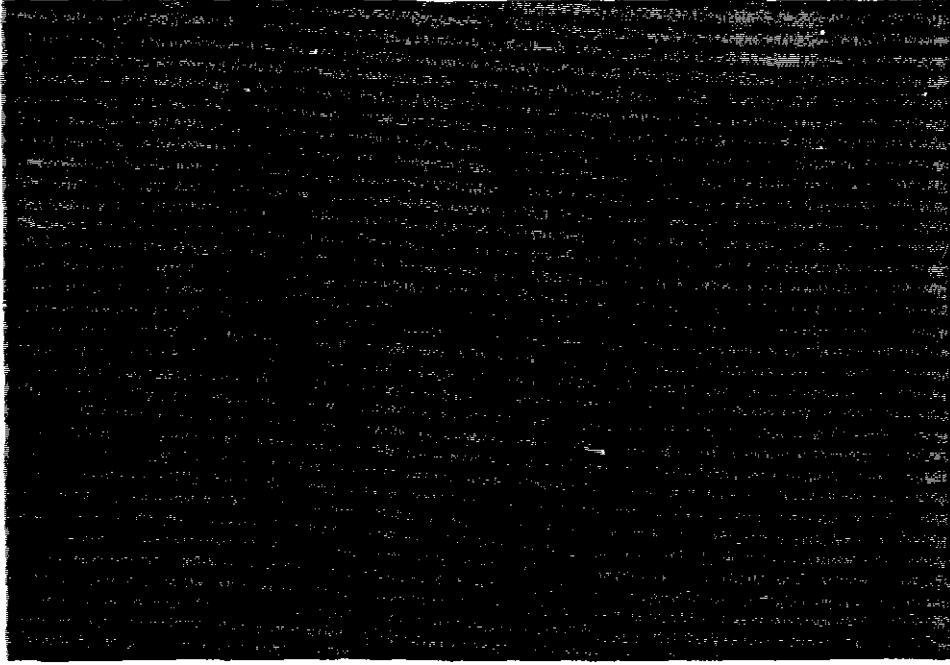
3.1 Hastaların Özellikleri ve Akım Sitometri Sonuçları

Hastaların periferik kan ve kemik iliği örneklerinden Şekil 2.2’de anlatıldığı gibi blotlar elde edildi. Bunlar mouse antihuman CD59 (MEM43 Serotec) flouresan antikoru ile işaretlenerek Zeiss flouresan mikroskobunda 100’lük büyütmede incelendi (Şekil 3.1).

Elde edilen blastların daha sonra Bölüm 2.3’de anlatıldığı gibi akım sitometrik incelemeleri yapıldı.

3.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi Hastaların Özellikleri

Bu gruba 3’ü kadın, 1’i erkek olmak üzere toplam 4 ALL’li hasta dahil edildi. Bu grubun yaş ortalamaları 29.8 ± 11 idi. Periferik yaymalarında blast oranı % 80’in üzerinde olan hastalar çalışmaya alındı (Tablo 3.1).



Şekil 3.1. CD59 (MEM43) monoklonal antikoruyla işaretlenen lösemik blast hücrelerinin fluoresan mikroskopta 100'lük büyütmedeki görüntüleri

Tablo 3.1. ALL hasta grubunun yaşı, cinsiyet dağılımı ile deneylerde kullanılan örnek tipi belirtilmiştir.

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Örnek
1	44	Kadın	Periferik kan
2	25	Kadın	Periferik kan
3	18	Erkek	Periferik kan
4	32	Kadın	Periferik kan
N	4	4	4

N: Örnek sayısı

Aynı hasta grubunun CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik incelemeleri yapılmıştır. Bu incelemede ortaya çıkan sonuçlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.ALL hasta grubunun beyaz küre sayısı, örneklerdeki blast oranı ve CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik analiz sonuçları:

Hasta No	Beyaz küre (mm ³)	Blast oranı (%)	CD59 (%)
1	22000	80	90
2	6200	80	82
3	19800	80	43
4	3600		51
Ort			66.5
SEM			11.4
STD			22.99
N			4

SEM: Ortalamanın standart hatası

STD: Standart hata

N: Örnek sayısı

3.1.2. Akut Myeloblastik Lösemili Hastaların Özellikleri

Bu gruba 2'si kadın, 2'si erkek olmak üzere toplam 4 AML'li hasta dahil edildi. Bu grubun yaş ortalamaları 52 ± 18.7 idi. Periferik yaymalarında blast oranı % 80'in üzerinde olan hastalar çalışmaya alındı. Bu hastaların özellikleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: AML hasta grubunun yaş, cinsiyet dağılımı ile deneylerde kullanılan örnek tipi

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Örnek
1	54	Kadın	Periferik kan
2	25	Erkek	Kemik iliği
3	66	Kadın	Kemik iliği
4	63	Erkek	Periferik kan
N	4	4	4

N: Örnek sayısı

Aynı hasta grubunun CD59 proteinlerinin hücre yüzey akım sitometrik ekspresyonlarının incelemeleri yapılmıştır. Bu analizde ortaya çıkan sonuçlar Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. AML grubuna ait beyaz küre sayısı, örneklerdeki blast oranı ve CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının analiz sonuçları.

Hasta No	Beyaz küre (mm ³)	Blast oranı (%)	CD59 (%)
1	38300	100	32
2	41000		91
3	17000		68
4	90600	100	31
Ort	55.5		
SEM	14.6		
STD	29.26		
N	4		

SEM: Ortalamanın standart hatası

STD: Standart hata

N: Örnek sayısı

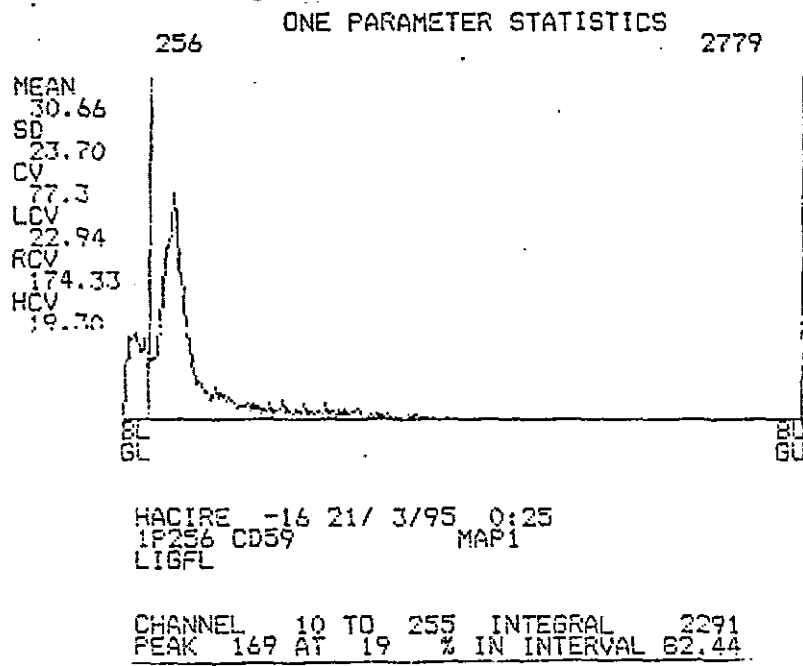
3.1.3. Kontrol Grubunun Özellikleri

Kontrol grubuna laboratuvarımız çalışanlarından sağlıklı 5 kişi dahil edildi. Bunların 3'ü erkek, 2'si kadındı ve yaş ortalamaları 29.8 ± 3.7 idi. Bu gruba ait özellikler ve CD59 prpteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik analiz sonuçları Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

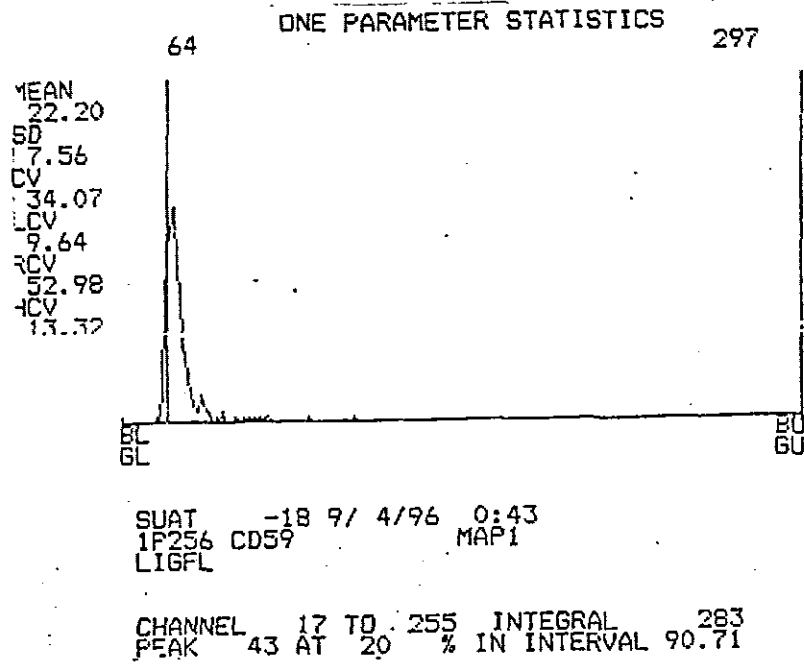
Tablo 3.5. Sağlıklı kontrol grubunun cins, yaş dağılımları ve CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik analiz sonuçları.

Kontrol No	Cins	Yaş	CD59 (%)
1	Erkek	23	86
2	Erkek	33	87
3	Erkek	31	51
5	Kadın	29	34
5	Kadın	33	51
Ort			61.8
SEM			10.5
STD			23.59
N			5

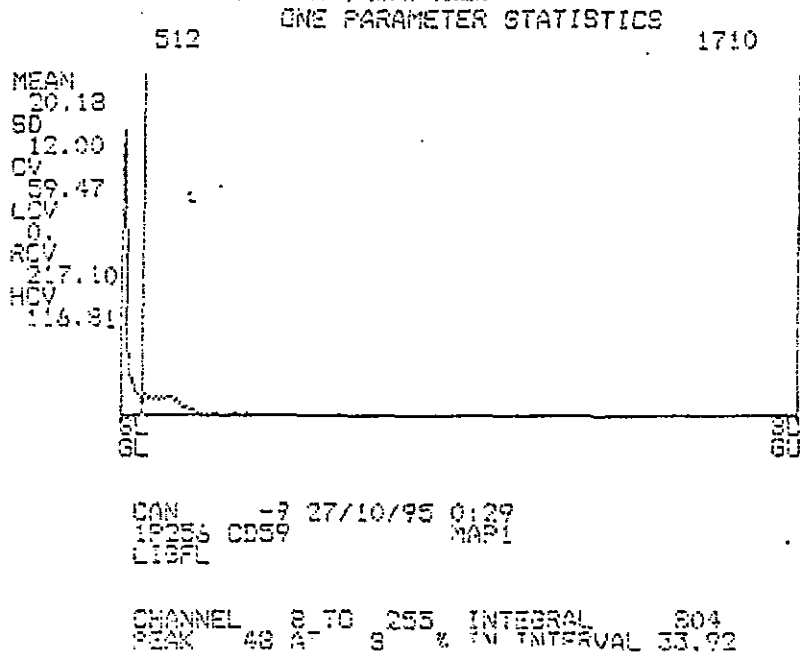
Akım sitometri tekniğiyle CD59 proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonları her 3 grupta da analiz edilmiştir. Her 3 grup içinde bu analizlere birer örnek olarak Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 de verilmiştir.



Şekil 3.2: CD59(+) taşıyan ALL'li hastanın lösemik hücre histogramı.



Şekil 3.3: CD59 (+) taşıyan ALL'li hastanın lösemik hücre histogramı.



Şekil 3.4. CD59 (+) taşıyan sağlıklı bir kişinin hücre histogramı.

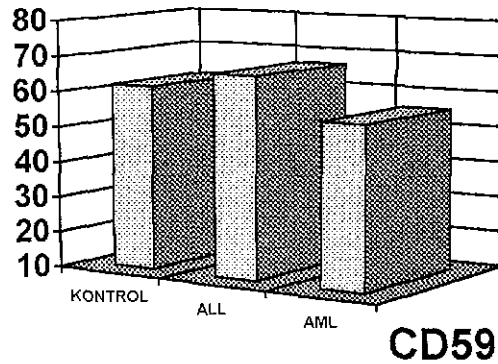
Her grup kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. ALL hasta grubunun CD₅₉ proteinlerinin hücre yüzey ekspresyon değerleri 66.5 ± 22.99 iken, AML grubunun 55.5 ± 29.26 idi ve ikisi arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.576$).

AML grubunun CD₅₉ ekspresyon değerleri (55.5 ± 29.26) ile kontrol grubunun CD₅₉ ekspresyon değerleri (61.8 ± 23.59) arasında da anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.730$).

ALL grubunun CD₅₉ ekspresyon değerleri (66.5 ± 22.99) ile kontrol grubunun CD₅₉ ekspresyon değerleri (61.8 ± 23.59) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.773$).

Sonuç olarak; her 3 grubun CD₅₉ proteinlerinin hücre yüzey ekspresyonlarının akım sitometrik incelemelerinde ekspresyon değerleri AML grubunda olmasına karşın istatistiksel anlamlı bir fark saptanamamıştır (Grafik 3.1).

Grafik 3.1. Gruplardaki CD₅₉ düzeyleri



Grafik 3.1. CD₅₉ kompleman düzenleyici proteinin ALL, AML ve kontrol grubunda elde edilen örneklerdeki hücre yüzey ekspresyon değerleri

3.2. Klonlaşmış Hibridizasyon Probleminin Hazırlanması

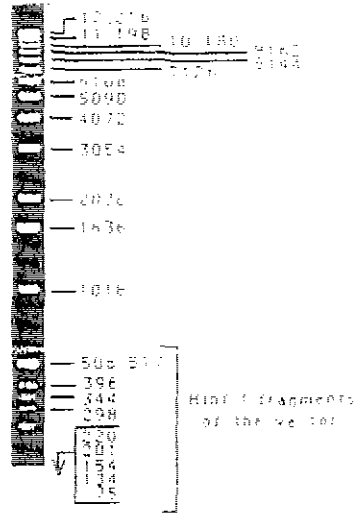
Daha önceden bölüm 2.8’de anlatıldığı gibi elde edilen plazmid DNA’ları uygun restriksiyon endonükleazı XbaI ile kesildi. 1.2 kb’lık bir insert cDNA elde edildi (Şekil 3.5). Birinci kuyucuğa DNA maker yerleştirildi (Şekil 3.6).

3.3 CD59 Moleküler Tekniklerle İncelenmesi ve Sonuçları

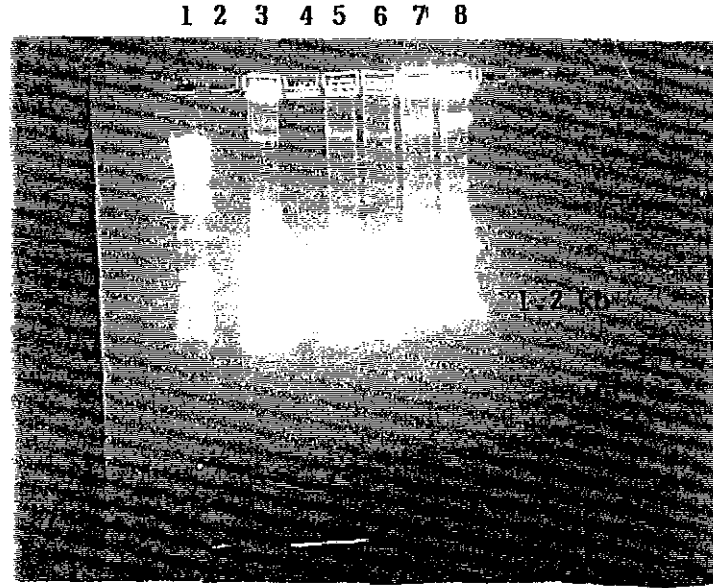
Klonlaşmış hibridizasyon problemleri, random prime işaretleme kiti kullanılarak işaretlendi. Hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan periferik kan ve kemik iliği örneklerinden elde edilen total hücresel RNA’lardan hazırlanan Northern blotlar, radyoaktif olarak işaretli CD59 cDNA’ları ile hibridizasyona tabi tutuldu.

X-Ray filmler 7. ve 15. günlerde incelendi ve CD59 cDNA insert’i doğru büyüklükte ve cDNA’nın random prime işaretlenmesi gayet başarılı olmasına rağmen otoradlarda hiç bir banda rastlanmadı (Şekil 3.7).

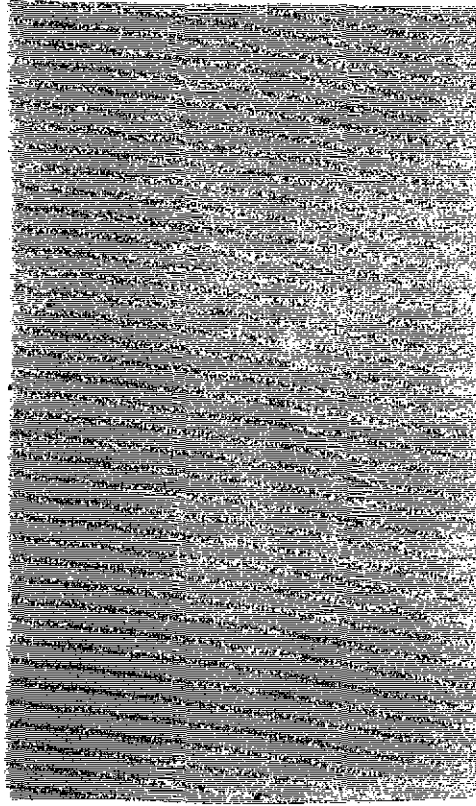
Aynı blotlar normalizasyon amacıyla 28S rRNA ile işaretlendiğinde ise mRNA ekspresyonu izlendi (Şekil 3.8). Bu mRNA’ların degrade olmadığını ancak ekspresyonunun çok düşük olması nedeniyle saptanamadığını düşündürmektedir.



Şekil 3.5. DNA jel elektroforezinde kullanılan DNA ladder (marker) 1.2 kb



Şekil 3.6. DNA'nın düşük erime noktalı jel elektroforezi
1 numaralı kuyuda DNA marker bulunmaktadır. 7 ve 8 numaralı kuyularda CD59'un XbaI restriksiyon enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan 1.2 kb'lık insert DNA izlenmektedir. Diğer kuyulardaki CD59'lar enzimle kesilmemiştir.



Şekil 3.7. CD59 probuyla işaretlenmiş Northern blottan 15 gün bekletildikten sonra elde edilen otoradyografi örneği.



Şekil 3.8 28S rRNA'ya ait otoradyografi örneği

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kompleman sisteminin en önemli fonksiyonlarından biri; yabancı hücrelerin, virüsle enfekte hücrelerin ve tümör hücrelerinin lizise uğratılmasıdır. Bu sitolitik olaylar; 20 kadar plazma proteininin klasik ve alternatif yollardan biriyle ardarda aktive olmasıyla gerçekleşir. Bu yolların son aşamaları ortaktır ve MAK oluşumuyla sonuçlanır. MAK'ın membranda meydana getirdiği por, plazma membranının 2 lipid tabakası arasına girerek hedef hücre lizisine yol açar (29).

Kompleman komponentleri; konakçı hücreleriyle de ilişkiye girerek hasar görmelerine neden olabilir. Ancak bu olay; plazma ya da membran proteinlerinden oluşan “kompleman sistemini düzenleyici proteinler” adı verilen bir grup inhibitör protein tarafından engellenir.

Kompleman inhibitörlerinin mRNA'larının, tümör hücrelerinde fazla miktarda eksprese edildiği ve bu hücrelerin relatif olarak antikora bağımlı kompleman sitotoksitesine karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla bu mRNA'lar tarafından kodlanan proteinlerin komplemana bağlı sitolizde tümör direncini arttırabileceğini düşündürmüştür (29, 64).

Bu konudaki çalışmalar özellikle solid tümörlerde yoğunlaştırılmıştır. Kumar ve arkadaşları (29) yaptıkları çalışmada; CD59, DAF ve SP-40,40 mRNA ekspresyonlarını araştırmışlar ve bazı akciğer kanserleri dışında CD59 ekspresyonunun çoğu tümör tiplerinde, normal hücrelere oranla daha fazla olduğunu göstermişlerdir. DAF ve SP-40,40 ekspresyonları ise; tümör hücre gruplarında farklılık göstermektedir. Akciğer adenokarsinomu ve yassı hücreli karsinomlarında DAF ekspresyonu artmışken; kondrosarkom, baş boyun yassı hücreli karsinomları ve glioblastome multiforme gibi tümörlerde SP-40,40 ekspresyonunu artmış olarak saptamışlardır.

Seya ve arkadaşları (65), pek çok değişik hücre gruplarında MCP ekspresyonlarının, normal hücrelere oranla 2-8 kat artmış olarak bulmuşlardır. Ekspresyondaki bu artışın tümör hücrelerine karşı kompleman atağını inhibe ettiğini, dolayısıyla da dolaşımdaki ömürlerinin uzayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte MCP ekspresyonlarının tümör hücrelerinin farklılaşması süresince azaldığı ve hastalığın prognozuyla da ilgili olabileceği görüşünü savunmuşlardır.

Aynı çalışmada; verdikleri rekombinant G-CSF tedavisiyle myeloid hücrelerin, hemin tedavisiyle de K-562 eritroblastik hücre grubunun MCP ekspresyonlarının azaldığını, akım sitometrik incelemelerinde belirlemişlerdir. Bu tedavilerin tümörün kompleman hasarına olan direncini azaltmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Marchbank ve arkadaşları (66); K-562 hücre gruplarında CD59 ekspresyonu olduğunu ve bu ekspresyonun uygun monoklonal antikorlar ile bloke edildiğinde, bu hücrelerde kompleman atakına karşı direncin azalmakta olduğunu göstermişlerdir.

Cheung ve arkadaşları (67); melanoma hücrelerinde DAF ekspresyonunu incelenmişlerdir. Daha sonra anti-DAF monoklonal antikor ile muamele ettikleri tümör hücrelerinde gerileme olduğunu saptamışlardır. Bu bulguya dayanarak da, kompleman düzenleyici proteinlerin ekspresyonlarının baskılanmasının tümör hücrelerinin immunoterapisinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Hakulinen ve arkadaşları (68); solid meme tümörlerinde CD59 ekspresyonunu immüofloresan mikroskop kullanarak araştırmışlardır. İmmünafinite kromatografisi kullanarak tümör hücrelerinin membranlarından CD59'u izole etmişlerdir. Sonuçta; tüm solid meme tümörlerinin benzer yapı ve özellikle CD59 eksprese ettiğini ve *in-vitro* olarak CD59 spesifik monoklonal antikorlarla bloke edildiğinde tümör hücrelerinin lizisinde belirgin artış olduğunu gösterebilmişlerdir. Gorter ve arkadaşları da (69), renal hücre karsinomları üzerindeki çalışmalarında DAF, CRI ve CD59 ekspresyon artışlarını saptamışlardır.

Björge ve arkadaşları (70) diğer bir yaklaşımla; az differansiye kolon adenokarsinomlarında CD59 ekspresyonunun en yüksek oranda olduğunu, dolayısıyla da, bir diferansiasyon işareti olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca Levamizol tedavisi verdikleri hastalarda da bu ekspresyonun düştüğünü, kolon karsinomu rölaps oranının daha da azaldığını saptamışlardır (71).

Hematolojik malignitelerde kompleman düzenleyici proteinlerle ilgili çalışmalar azdır. Seya ve arkadaşları (65), lösemik hücre grubunda MCP ekspresyonunu 2-8 kez artmış, bazı lenfoid hücre gruplarında da

normal hücrelere oranla azalmış olarak akım sitometri ile saptamışlardır.

Tomako ve arkadaşları (72), hematolojik malignitelerin çoğunda CR1 ekspresyonlarını azalmış olarak bulmuşlardır. Kronik lenfositik lösemilerde ise; MCP ekspresyonunun belirgin olarak artmış, DAF ekspresyonunu da düşük olarak saptamışlardır.

Marinov ve arkadaşları (73) yaptıkları çalışmada, Non T-ALL, T-ALL, AML, B-KLL (kronik lenfositik lösemi), KML (kronik miyelositik lösemi), AML gibi değişik lösemi alt gruplarında, toplam 68 hastada diğer birkaç adezyon molekülüyle birlikte CD59 ekspresyonunu da akım sitometri yöntemiyle incelemişlerdir. Sonuçta bu ekspresyonun heterojen olduğunu ve lösemi alt gruplarıyla birlikte herhangi bir korelasyon olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bizim de yaptığımız çalışmada, ALL (n=5) ve AML (n=4) hasta gruplarında CD59 ekspresyonu açısından herhangi bir farklılığa rastlanamadı.

Gerek solid, gerekse hematolojik malignitelerde kompleman düzenleyici proteinlerin ekspresyonundaki bu farklılıklar, antijenik ve klinik heterojeniteyle uyumludur. Neoplastik transformasyonla birlikte ekspresyonlarda görülen değişiklikler gen transkripsiyonlarındaki azalmaya yönelik düzenlemelerle ilişkili olabilir. Marchbank ve arkadaşları (66), CD59'un K-562 hücrelerindeki ekspresyonuna PMA'nın etkisini araştırdıklarında; PMA ile muamele edilen bu hücrelerde ekspresyonda belirgin bir artış saptamışlardır. Bir protein sentez inhibitörü olan Aktinomisin D ile muamele edilen hücrelerde CD59 ekspresyonlarının büyük oranda inhibe olması PMA'nın etkisinin esas olarak transkripsiyonal düzeyde olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmamıza başladığımızda literatürde; sağlıklı kişilerle, akut ve kronik lösemili hasta gruplarında CD59 ekspresyonlarını protein ve mRNA düzeyinde araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda, lösemili blast hücrelerinin yüzeyindeki CD59 protein ekspresyonları akım sitometri ve gen ekspresyonları da, Northern blot yöntemiyle saptandı. Sonuçta AML ve ALL hasta gruplarıyla, sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır. Bu bulgu Marinov ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyum sağlamaktadır.

Ancak; bu çalışmaya paralel olarak laboratuvarımızda sürdürülen bir başka araştırmada; ALL (8), AML (13) ve sağlıklı (7) kişilerde hem CD59, hem de diğer kompleman düzenleyici proteinler olan MCP, DAF, CR1 ekspresyonları akım sitometrik olarak incelendiğinde; CR1 ve DAF ekspresyonu ALL grubunda belirgin olarak düşük bulunmuştur. Diğer parametrelerde ise gruplar arasında bir fark saptanamamıştır (74).

Bu çalışma genişletilip, hasta grubu artırıldığında ise; AML (14), ALL (11), kontrol (15) gruplarında; DAF; hem ALL, hem de AML grubunda anlamlı bir şekilde azalmış olarak bulundu. MCP, ALL grubunda azalmış olarak saptandı, CD59 AML grubunda biraz daha düşük bulundu. Ancak en belirgin fark, AML grubunda CR1 proteinin ekspresyonlarında saptandı. Daha önceki çalışmalarda da, CR1 proteininin bir matürasyon proteini olma olasılığı ileri sürülmüştü (72). Bizim çalışmamızda CR1 başta olmak üzere, kompleman düzenleyici proteinlerinin blast hücre yüzeyindeki ekspresyonlarının azaldığı yönündedir. Dolayısıyla bunların birer onkogenez işareti olma ihtimali söz konusudur. Ancak CD59 için bu fark belirgin değildir.

Özet olarak; çalışmamızda CD59'un lösemik blast yüzeylerindeki ekspresyonları, akım sitometrik yöntemlerle incelendiğinde her 3 grup arasında anlamlı bir farka rastlanamadı. Protein ekspresyonu olmasına rağmen otoradyografi de herhangi bir ekspresyonun gösterilememesi, CD59'un gen düzeyindeki ekspresyonunun çok düşük olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışma yapıldığı sırada, laboratuvarımızda PCR (polimeraz chain reaction, polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle çalışma olanağımız olmadığından zorunlu olarak daha az duyarlı bu yöntemler kullanılmıştır. Aynı araştırmanın daha geniş bir hasta grubunda ve RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılması halinde, lösemik blast hücreleri ve kompleman biyolojisine daha fazla katkıda bulunulması mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1.Boehmer H, Rajiwsky K: Lymphocyte development. Curr Opin Immunol 1992;4:131-181.
- 2.Stites PD, Terr IA: Basic and clinical immunology. International Edition Lange Medical Publications U.S.A. 1991;P:16.
- 3.Royer HD et al: T Lymphocytes: Ontogeny, function and relevance to clinical disorders. N Eng J Med 1987;317:1136-1142.
- 4.Bochmer VH: The developmental biology of T Lymphocytes. Ann Rev Immunol 1988;6:309-326.
- 5.Uçkun FM: Regulation of humman B cell ontogeny. Blood 1990;1908-1923.
- 6.Cooper MD: B Lymphocytes: Normal development and function. N Eng J Med 1987;317:1452-1456.
- 7.Schwartz RS, Stollar BD: Heavy chain directed B cell maturation: continous clonal selection beginning at the pre-B cell stage. Immunol Today 1994;15:27-31.
- 8.Rajewsky K: Clonal selection and learning in the antibody system. Nature 1996;391;27:751-758.
- 9.Britten J et al: Natural killer and cancer. Cancer 1996;77:1226-1243.
- 10.Roitt I et al: Immunology. Mosby year book. Europe Limited, England. 1993;P:11.10.
- 11.Messner HA, Griffin JD: Biology of acute myeloid leukemia. Clin Haematol 1986;15:641-645.
- 12.Whittaker JA, Judge M: Acute leukemias. Clinical Haematology Oxford Textbook of medicine. 1992; Volumes 1.p:121.
- 13.Bennet JM et al: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia. Br j Haematol 1991; 78:325-329.
- 14.Van der Reijden HJ et al: A comparision of surface maker analysis and FAB classification in acute myeloid leukemia. Blood 1983; 61:443-447.
- 15.Coco F, Foa R: Diagnostic and prognostic advances in the immunophenotypic and genetic characterization of acute leukemia. Eur J Haematol 1995; 55:1-9.
- 16.Lauria F et al: Increased expression of myeloid antigen markers in adult acute lymphoblastic leukemia patients: diagnostic and prognostic implications. br J Haematol 1994;87:286-292.
- Roitt I et al: Immunology. Mosby year book. Europe Limited, England. 1996;P:293.

18. Abbas K.A. et al: Cellular and molecular Immunology Saunders text and review series. Second edition. 1994;pp 293-316.
19. Müller Eberhard HJ: Molecular organization and function of the complement system. *Ann Rev Biochem* 1988;321-347.
20. Kinoshita T: Biology of complement: the overture. *Immunol Today* 1991; 12:291-294.
21. Arlaud JG et al: A functional model of the human C1 complex. *Immunol Today* 1987;8:106-110.
22. Cooper NR: The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* 1985;37:155-216.
23. Reid KBM, Porter R.R: The proteolytic activation systems of complement. *Ann Rev Biochem* 1981;50:433-464.
24. Law SKA, Dodds WA: Catalysed hydrolysis the complement guicstep. *Immunol Today* 1996;17:105.
25. Atkinson JP Farries T: Separation of self from nonself in the complement system. *Immunol Today* 1987;8:212-215.
26. Müller Eberhard H.J, Schreiber R.D: Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. *Adv Immunol* 1980;29:1-53.
27. Müller Eberhard HJ: The membrane attack complex. *Ann Rev Immunol* 1986;4.503-528.
28. Gracia OC et al: Isoforms of human C4b binding protein. *J Immunol* 1995;155:4037-4043.
29. Kumar S et al: Expression of messenger RNAs for complement inhibitors in human tissues and tumors. *Cancer Res* 1993;53:348-353.
30. Morgan PB, Meri S: Membrane proteins that protect against complement lysis.
31. Fodor W.L et al: A novel bifunctional chimeric complement inhibitor that regulates C3 convertase and formation of the membran attack complex. *J Immunol* 1995;155:4135-4138.
32. Finberg RW et al: Decay accelerating factor expression on either effector or target cells inhibits cytotoxicity by human natural killer cells. *J Immunol* 1992;145:2055-2060.
33. Lublin MD, Atkinson JP: Decay accelerating factor: Biochemistry, molecular biology and function. *Ann Rev Immunol* 1989;7:35-58.
34. Liszewski M.K et al: Membrane cofactor protein (MCP or CD46): Newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Ann Rev Immunol* 1991;9:431-455.

35. Ross GD, Medof ME: Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv Immunol* 1985;37:217-267.
36. Sugita Y et al: Isolation from human erythrocytes a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *J Biochem* 1988;104:633.
37. Rollins AS, Sims PJ: The complement inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol* 1990;144:3478-3483.
38. Meri S et al: Human protectin (CD59) an 18000-20000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-9 catalysed insertion of C9 into lipid barriers. *Immunology* 1990;71:1-9.
39. Stefanova I, Horejisi V: Association of the CD59 and CD55 cell surface glycoproteins with other membrane molecules. *J Immunol* 1991;147:1587-1592.
40. Deckert M et al. CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T cell adhesion and activation. *J Immunol* 1992; 148:672-677.
41. Korthy PE et al: CD59 functions as a signal transducing molecule for human T cell activation. *J Immunol* 1991;146:4092-4098.
42. Hahn WC et al: Overlapping but nonidentical binding sites on CD2 for CD58 and a second ligand CD59. *Science* 1992;256:1805-1807.
43. Hideshima T et al: Expression of HRF 20, a regulatory molecule of complement activation on peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 1990;69:396-401.
44. Funabashi K et al: Tissue distribution of complement regulatory membrane proteins in rats. *Immunology* 1994;81:444-451.
45. Meri S et al: regulation of CD59 expression on the human endothelial cell line. *Eur J Immunol* 1993;23:2511-2516.
46. Simpson KL et al: Complement regulatory proteins in early human fetal life: CD59, membrane cofactor protein (MCP) and decay accelerating factor (DAF) are differentially expressed in the developing liver. *Immunology* 1993;80:183-190.
47. Fenichel P et al: Expression of the complement regulatory protein CD59 on human spermatozoa: Characterization and role in gametic interaction. *Mol Reprod Develop* 1994;38:338-346.
48. Simpson KL et al: Differential expression of complement regulatory proteins decay accelerating factor (DAF), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. *Immunology* 1994;81:452-461.

- 49.Nishikori K et al: The change of membrane complement regulatory protein in chorion of early pregnancy. Clin Immunopathol 1993;69:167-174.
- 50.Rooney JA, Morgan BP: Characterization of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 antigen on human amniotic cells and in amniotic fluid. Immunology 1992;76:541-547.
- 51.Vakeua A et al: Loss of expression attack complex in myocardial infarction. Lab Invest 1992;67:608-616.
- 52.Letho T, Meri S. Interactions of soluble CD59 with the terminal complement complexes. J Immunol 1993;151:4941-4949.
- 53.Holguin H. et al: Enhanced expression of the complement regulatory protein, membrane inhibitor of reactive lysis (CD59), is regulated at the level of transcription. Blood 1993;82:968-977.
- 54.Rushmere NK et al: Molecular cloning of the rat analogue of human CD59: structural comparison with human CD59 and identification of a putative active site. Biochem J 1994;304:595-601.
- 55.Holguin MH et al: Analysis of the gene that encodes the complement regulatory protein, membrane inhibitor of reactive lysis. J Immunol 1996;157:1659-1668.
- 56.Tomita A, Parker CJ. Aberrant regulation of complement by the erythrocytes of hereditary erythroblastic multinuclearity with a positive acidified serum lysis test (HEMPAS). Blood 1994;83:250-259.
- 57.Prince GM et al: Peripheral blood harvest of unaffected CD34+CD38- hematopoietic precursors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 1995;86:3381-3386.
- 58.Kansu E, Hauptman SP: Suppressor cell population in Sezary syndrome. Clin Immunol and Immunopathol 1979;12:341-350.
- 59.Chomczynski P, Sacchi N: Single step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. Ann Rev Biochem 1987;56:156-159.
- 60.Sambrook J et al: Molecular cloning a laboratory manual. 1989;7.39-7.53.
- 61.Sambrook J et al: Molecular cloning a laboratory manual 1989;1.33-1.38.
- 62.Coligan JE et al: Resolution and recovery of DNA fragments Current Protocol in Immunology 1991;10.4.1-10.4.4.
- 63.Güç D et al: Expression of the components and regulatory proteins of the alternative complement pathway and the membrane attack.

64. Ollert MW et al: Molecular basis of complement resistance of human melanoma cells expressing the C₃ cleaving membrane protease p65. *Concer Res* 1993;53:592-599.
65. Seyo T et al: Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. *J Immunol* 1990;145:238-245.
66. Marchbank KJ et al: Regulation of CD59 expression on K565 cells: effects of phorbol myristate acetate, cross-linking antibody and non-lethal complement attack. *Immunology* 1995;85:146-152.
67. Cheung NC et al: Decay accelerating factor protects human tumor cells from complement mediated cytotoxicity in-vitro. *J Clin Invest* 1988;81:1122-1128.
68. Hakulinen J, Meri S: Expression and function of the complement membrane attack complex inhibitor protectin (CD59) on human breast cancer cells. *Lab Invest* 1994;71:820-827.
69. Garter A et al: Expression of CD46, CD55 and CD59 on renal tumor cell lines and their role in preventing complement-mediated tumor cell lysis. *Lab Invest* 1996;74:1039-1049.
70. Bjorge L et al: Expression and function of CD59 an colonic adenocarcinoma cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1597-1603.
71. Bjorge L et al: Davun-regulation of CD59 (protection) expression on human colorectal adenocarcinoma cell lines by leuamisol. *Scand J Immunol* 1995;40:512-516.
72. Tomako H et al: Levels of complement regulatory proteins CD35 (CR1), CD46 (MCP), AND CD55 (DAF) in human haematological malignancies. *Br J Haematol* 1992;83:368-373.
73. Marinov I et al: Lack of expression of adhesion molecules on leukemic cells: possible pathogenetic factor in blood malignancies. *Neoplasma* 1994;41:141-143.
74. Güç D, Canpınar H, Küçükaksu C et al: Expression of complement regularory proteins, DAF; MCP; CR1 and CD59 on the cell surface of leukemic blast cells. *Blood* 1996;88:10:suppl 156b (Abstract).

