

283884

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**NORMAL, PERİFERİK, İNSAN B VE T LENFOSİTLERİ İLE,
K - 562 HÜCRELERİNİN
BAZI YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

YAVUZ TAGA

ANKARA — 1981

jo

K I S A L T M A L A R

Con A	:	Concanavalin A
α MMA	:	Alfa metil mannopiranozid
ANS	:	1-Anilinonaftalen 8-sulfonyk asit
Ig	:	immünglobülin
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PPO	:	2,5-Difeniloksaazol
POPOP	:	1,4-Di-2-(5-Feniloksaazolil)-benzen
BSA	:	Sığır serum albümini
HRSS	:	Hank'in dengeli tuz çözeltisi
FCS	:	Metel dana serumu
Fl-IgM	:	Fluorescein bağlı immünglobülin M
Fl-Con A	:	Fluorescein bağlı Concanavalin A
Sbd	:	Sayım bölü dakika
Ci	:	Küri
EDTA	:	Etilen di-amin tetra asetik asit
DTT	:	Dithiotreitol
TEBED	:	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

NORMAL, PERİFERİK, İNSAN B VE T LENFOSİTLERİ İLE,
K-562 HÜCRELERİNİN
BAZI YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

BIYOKİMYA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

YAVUZ TAGA

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç.Dr. KAYA EMERK

ANKARA - 1981

Bu çalışmanın yürütülmesinde yardımlarını
esirgemeyen Doç. Dr. řemsettin Ustaçelebi'ye ve
tezin yazılmasında ve çizimlerin yapımında yar-
dımıcı olan sayın Yük. Müh. Tahir Dengiz ve eşim
Fethiye Taġa'ya teřekkürü borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
I. G İ R İ Ő _____	1
I.1. HÜCRE YÜZEYİ VE HÜCRE ZARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER _____	1
I.1.1. Hücre zarı lipitleri _____	2
I.1.2. Zarsal proteinler _____	2
I.1.3. Hücre yüzeyi deęişikliklerinin kontrolü _____	4
I.2. LENFOSİT HAKKINDA GENEL BİLGİ _____	6
I.2.1. T ve B hücreleri _____	6
I.3. ERİTROİD MATÜRASYON, ERİTROSİT VE ERİTROSİT ZARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER _____	11
I.3.1. Eritroid matürasyon _____	11
I.3.2. Olgun eritrosit _____	11
I.3.3. Eritrosit zarı _____	12
I.4. K-562 HÜCRELERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER _____	14
I.5. LEKTİNLER HAKKINDA GENEL BİLGİ _____	16
I.5.1. Concanavalin A _____	16
I.6. ZAR YAPISININ İNCELENMESİNDE FLUORESAN LİGANDLAR _____	18
I.7. NORMAL HÜCRELERDE VE TUMÖRAL TRANSFORMASYON GÖSTEREN HÜCRELERDE, LEKTİN RESEPTÖRLERİNİN SAYI VE KİNETİKLERİ VE LEKTİN HÜCRE ETKİLEŞMESİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER _____	21
I.8. AMAÇ _____	23
II. A R A Ç , G E R E Ç v e Y Ö N T E M L E R _____	24
II.1. ARAÇ VE GEREÇLER _____	24
II.2. YÖNTEMLER _____	25
II.2.1. Hücreler _____	25
II.2.2. Hücre kültürleri _____	26
II.2.3. Protein tayinleri _____	26

	<u>Sayfa</u>
II.2.4. Radyoaktivite sayımları _____	26
II.2.5. Dioksan'ın peroksitlerden arındırılması _____	27
II.2.6. Bray sayım çözeltisinin hazırlanması _____	27
II.2.7. ³ H-Con A'nın hazırlanması _____	27
II.2.8. Mikrohemaglutinasyon _____	27
II.2.9. Mikrofüj tekniği ile bağlanma deneyi _____	28
II.2.10. Asosiyasyon sabiti (K_a) ve reseptör sayısı (N)'nin hesaplanması _____	28
II.2.11. 5' Nükleotidaz enzim aktivitesinin ölçülmesi _____	30
II.2.12. Hücre zarlarının fluoresein Con A ve Fluoresein Anti IgM ile etkileşmelerinin, fluoresan mikroskopu ile incelenmesi _____	31
II.2.13. Fluorometrik tayinler _____	31
II.2.14. Plazma zarlarının ayrılması _____	33
II.2.15. Hücre zarındaki majör polipeptidlerin elektroforetik analizi _____	34
II.2.16. SDS'li poliakrilamid jellerin ³ H-Concanavalin A ile işaretlenmesi _____	35
III. B U L G U L A R _____	37
III.1. LENFOSİT İZOLASYONU _____	37
III.2. ³ H CONCAVALİN A İLE HÜCRELERDE CON A RESEPTÖR SAYILARININ VE AFİNİTELERİNİN İNCELENMESİ _____	42
III.3. HÜCRELERDE ANS BAĞLANMA YERLERİNİN SAYI VE AFİNİTELERİNİN İNCELENMESİ _____	52
III.4. HÜCRELERDE ANS BAĞLANMA YERLERİ İLE TRİPTOFAN MOLEKÜLLERİ ARASINDAKİ UZAKLIĞIN (r) NİN İNCELENMESİ _____	56
III.5. CON A BAĞLANMASININ, HÜCRELERİN ZARSAZ 5' NÜKLEOTİDAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ _____	57
III.6. HÜCRELERİN anti IgM ile BAĞLANDIKTAN SONRA ³ H-CON A BAĞLANMALARININ İNCELENMESİ _____	58
III.7. B LENFOSİTLERİ VE K-562 HÜCRELERİNİN FLUORESAN MİKROSKOPTA İNCELENMESİ _____	60
III.8. SDS'Lİ POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ YAPILAN, B-LENFOSİTLERİ ve K-562 HÜCRELERİ ZARLARININ İNCELENMESİ _____	63

	<u>Sayfa</u>
IV. TARTIŞMA _____	65
V. ÖZET _____	73
VI. KAYNAKLAR _____	74

I - G İ R İ Ő

I.1. HÜCRE YÜZEYİ VE HÜCRE ZARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER :

Hücreler, dış ortamlarıyla ilk ve direkt etkileşmelerini hücre yüzeyleri yani hücre zarları ile yapmaktadırlar. Bir organizmanın parçası olan herhangi bir normal hücre, yakın veya uzak çevresi ile haberleşmesini, veya çevre ile karşılıklı kontrollerini hücre yüzeyi aracılığı ile gerçekleştirmektedir.

Bir tümör hücresinde ise, yüzey özelliklerinde meydana gelen değişimler sonucu hücre-hücre kontaktının düzenleyici rolü ortadan kalkmakta ve hücre, yüzeyine bağlanarak etki gösteren serum faktörlerine, hormonlara ve diğer ajanlara karşı duyarsız kalmaktadır. Tümör hücreleri böylece normal büyüme kısıtlamalarından değişik derecelerde otonomi kazanmakta ve hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu, primer tümörün büyümesi gözlenmektedir. Bu arada hücrelerin birbirini tanıma ve belirli hücrelerin belirli pozisyonlarda bulunmasını sağlayan kontrol mekanizmaları da ortadan kalkar ve metastazlar ortaya çıkar. Son olarak, tümör hücrelerinin, konağın bağışıklık sistemi tarafından tanınması tümör hücre popülasyonunun yüzeyinde meydana gelen değişikliklerden büyük ölçüde etkilenmektedir.

Hücre zarları, lipitler, proteinler, oligosakkaritler ve polisakkaritlerden oluşur (1). Bu bileşenler için en uygun düzenleniş tarzı, her yapı taşı için, en düşük serbest enerjili durumu sağlayandır.

Yapılarında hidrofilik ve hidrofobik kısımlar taşıyan ve yapısal olarak asimetrik olan lipitler (örneğin fosfolipitler) çözelti içinde, hidrokarbon kuyruklarını biraraya getirerek suyu dışarı atarlar, bu arada iyonik kafaları ise sulu ortama yerleşmeye çalışır. Bu etkileşmeler, sulu kısımdan lipit hidrokarbon kuyruklarının uzak tutulduğu, devamlı bir çift tabakalı yapı düzeni oluşturur (1,2).

I.1.1. Hücre zarı lipitleri :

Çift tabakanın her iki tarafındaki lipit molekülleri en azından bazı hücrelerde o şekilde yerleşme gösterirler ki, çift tabaka içinde hızla lateral olarak yer değiştirebilir ve birçok biyolojik zarlara yumuşak bir yağ akışkanlığı kazandırır (1,2,3). Lipitler ayrıca zarlar içinde özel bölgeler teşkil edecek şekilde toplanabilir veya zarsal proteinlerle birleşerek "bağlı lipit" veya lipoprotein komplekslerini oluştururlar (3). Buna ek olarak bazı zarsal lipitler donmuş jel şeklinde, sıvı lipitlerden ayrı olarak bulunabilirler. Bu değişik haldeki lipit bölgelerinin hücre zarlarını özel bölgelere organize etmekte yararlı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte lipit moleküllerinin çoğu sıvı halde olup, zar düzlemi içinde kolayca difüzlenebilirler (1,2,3,4).

I.1.2. Zarsal Proteinler :

Zarsal proteinler temel olarak iki tiptirler. Zar içinde hidrofobik etkileşmeler ile stabilize edilenler ve zar üstünde hidrofilik etkileşmeler ile stabilize edilenler. Birinci gruptaki proteinler, integre zarsal proteinler (1) olarak tanımlanır ve çoğunlukla metabolit ve iyon transportunda görev yaparlar. Integre zarsal proteinler (ve glikoproteinler) globuler, bimodal proteinler olup, zarın hem hidrofobik hem de hidrofilik

kısımları ile etkileşmeye girerler (1,3). Kısaca, amino asit dizilişlerine ve üç boyutlu kıvrılmalarına bağlı olarak sıvı haldeki, lipit çift tabakasına değişik derinliklerde, gömülmüşlerdir. Bazı integre proteinler ve glikoproteinlerin hem zar dışında hem de zarın sitoplazmik yüzünde uzantıları vardır.

Periferik zar proteinleri (1) olarak tanımlanan ikinci grup proteinler, biyolojik zarların temel yapısı için mutlaka gerekli olmayan, birçok değişik görevler yüklenirler. Periferik zar proteinleri, sıklıkla integre zar proteinleri ve glikolipitler ile, yüksek tuz derişimlerinde ve şelatör ajanların varlığında bozulan iyonik etkileşimlerde bulunurlar (1).

Hücre zarı en basit şekilde, integre zar proteinlerinin sıvı bir lipit çift tabakası içinde mozaik taşları gibi yerleştiği iki boyutlu bir çözelti olarak düşünülebilir. Zar mimarisinin bu şekilde kavranması zarın fonksiyonu açısından iki önemli açıklamayı mümkün kılmaktadır. Birincisi bu şekilde bir düzenleme zar bileşkekelerinin asimetric bir şekilde organize olmasını ve bir kısmının özellikle zarın iç tarafında bir kısmının da zarın dış tarafında yerleşmesini mümkün kılmaktadır (1). Örneğin zar glikoproteinleri ve glikolipitler, karbonhidrat kuyrukları hücre zarının dışına gelecek şekilde yerleşirler ve antikorlar, hormonlar, lektinler, virüsler ve diğer ajanlar için özgül reseptör rolü oynarlar (1,3). Zar asimetrisinin devamlılığı, bileşkekelerin sürekli olarak zarın bir tarafından diğer bir tarafına rotasyonunu önler. Bu tip zar organizasyonun ikinci önemli özelliği, zar içindeki moleküllerin zar düzlemi içinde lateral olarak kolayca yer değiştirmelerine olanak vermesidir.

Hücre yüzeyine özgül, düzenlemelerin olması hücre kontaktı ve tanınması yönünden ve hücrenin yerinin doku içindeki diğer hücreler tarafından bilinmesi açısından önem taşır. Ayrıca, hücre yüzeyi birleşmelerinin topografik olarak yeniden düzenlenmesi, mitojenler, serum faktörleri, hor-

monlar, lektinler ve antikorlar gibi değişik çevresel uyarılara bir cevap olarak da gerçekleşir.

İntegre zar proteinlerinin, lateral hareketliliğinin mikrotübüller ve mikrofilamentler gibi integre proteinlere bağlı gibi görünen, sitoplazmik iskelet elemanları tarafından kontrol edildiği gittikçe destek kazanan bir görüştür (1,5,6,7).

Mikrotübüller, dış çapı 25, iç çapı ise 15 nm olan tübüler yapılardır. Özellikle tubulin denilen bir protein subünitinden oluşan bu yapılara, hücrelerin çoğunda hem çekirdek hem de sitoplazmada rastlanır (1). Sitoplazmik mikrotübüller hızlı tersinir bir birleşme - ayrışma (assembly - disassembly) halindedirler. Bu olayın kontrolünde, açık olmamakla birlikte, kalsiyum iyonları ve çembersel nükleotidlerin rolü olduğu saptanmıştır (8). Mikrotübüller, basınçta ve düşük sıcaklıkta ayrışırlar ve tekrar birleşmeleri Colchicine ve Vinblastine gibi bazı bitki alkaloidleri tarafından inhibe edilir (8).

Mikrotübüller sıklıkla diğer bir sitoplazmik iskelet elemanı olan mikrofilament'lerle beraber bulunurlar. Mikrofilamentler 6-8 nm çapında çift sarmal olarak bulunan ince iplikimsi yapılar olup, kümeler veya tabakalar halinde sıklıkla zarın iç yüzüne bitişik olarak bulunurlar (6). Mikrotübüller ve mikrofilamentler gerçek hücre zarı bileşenleri değildirler fakat hücre hareketini ve bazı hücre yüzeyi reseptörlerinin dağılımını kontrol etmeleri onların bir şekilde zara bağlı olduklarını ve dolayısıyla bir anlamda hücre zarı elemanı olarak ele alınmalarını gerektirir.

I.1.3. Hücre yüzeyi deęişikliklerinin kontrolü :

Çok değerlikli ligand'ların hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma-

ları sonucunda reseptör-ligand kompleksleri ya dağınık ya da kümeler halinde bulunurlar. Bazı durumlarda bu kümecikler birleşip bir araya gelerek daha büyük bölgeleri oluştururlar. Bazı özel bölgelerde kümelerin bir araya gelmesi neticesi reseptör-ligand kompleksleri endositozla hücre içine alınırlar. Bu özellikleri gösteren çok değerli ligandlar, antikorlar ve lenktinlerdir (3,5,10,11). Antikorların lenfoid hücrelerin yüzeyindeki immunoglobulin (Ig) reseptörlerine bağlanmaları, kümeleşmeye ve antikor-Ig komplekslerinin ya endositozuna ya da hücre yüzeyinden dökülmelerine yol açar (3,10,11). Yüzey Ig reseptörlerinin kümeleşmesi, zara bağlı sitoplazmik iskelet sistemine etki eden Cytochalasin B (bir mantar metaboliti) gibi ajanlar tarafından inhibe edilir hatta geriye çevrilir. Benzer şekilde hücre metabolik mekanizmanın blokajı da bu bölgelerin ("cap") oluşumunu inhibe eder. Bu sonuçlar ligandların uyardığı kümeleşme ve özgür bölgelerin oluşmasında ("cap" oluşması) mikrofilamentlerin aktif bir rol oynadığını gösterir. Concanavalin A gibi bir lektinin lenfosit yüzeyine bağlanması, yüzey Ig'lerinin anti-Ig tarafından kümeleşmeye ve "cap" oluşumuna gitmesini inhibe eder (6,7). Anti-Ig'nin uyardığı ve Con A tarafından inhibe edilen cap oluşumu olayı, mikrotübül fonksiyonunu bozan Colchicine ve Vinblastine gibi ajanlar tarafından ortadan kaldırılır. Bununla birlikte Con A lenfositlere düşük derecelerde (0-5°C) bağlanmışsa dahi kendi reseptörleri ile "cap" oluşumunu uyarabilir (6,7). Görünüşte çelişkili gibi görünen bu sonuçlar hem Con A reseptörlerinin hem de yüzey Ig reseptörlerinin onları bir anlamda hücreye demirleyen mikrotübül sistemi ile ilişkide olmaları ile açıklanabilir.

Mikrotübül bozucu ajanların veya mikrotübül depolimerizasyonuna yol açan şartların varlığında (örneğin düşük sıcaklık gibi) bu demirleme bozulmakta ve hem anti-Ig hem de Con A "cap" oluşumuna yol açmaktadır (6,7). Bütün lenfoid hücrelerde "cap" oluşumu olayı gözlenir, fakat Colchicine'nin eklenmesi bu durumu dramatik olarak arttırır.

I.2. LENFOSİT HAKKINDA GENEL BİLGİ :

Periferik kandaki lenfositler genellikle küçük lenfositler olup, 10 mikron veya daha küçük çaptadırlar bununla birlikte daha büyüklerine de rastlanır.

Boyanmış hücrede (Wright boyası ile) çekirdek menekşe renginde olup yoğun kromatin aggregatları içerir. Çekirdek, genellikle yuvarlak olup kenarı keskin bir şekilde, gök mavisi boyanan sitoplazmada kolayca seçilir. Nükleoluslar rutin tekniklerle görülmezler. Sitoplazma ya çekirdeğin etrafında geniş bir hale teşkil eder ya da seçilmeyecek kadar azdır.

Küçük lenfositler, *in vitro* olarak, phytohemagglutinin (PHA) gibi özgül olmayan bir mitojen tarafından veya antijen gibi özgül bir uyarıcı tarafından uyarıldıklarında, transforme lenfosit adını verdiğimiz büyük blast hücresi benzeri hücrelere dönüşürler (11). Benzer hücreler *in vivo* olarak da antijenik uyarılmayı takiben görülürler (13,14). Morfolojik olarak bu hücreler büyük lenfositlere benzer, çapları 10-20 mikron arasında değişir ve biçimsiz şekiller görüntüleyebilirler. Çekirdek genellikle büyüktür ve bir veya daha fazla sayıda nükleolus içerir. Sitoplazma boldur ve şiddetle bazofiliktir. Endoplazmik retikülüm PHA ile uyarılmış hücrelerde çok belirgin olmamakla beraber, Pokeweed mitojeni (PWM) gibi diğer ajanlarla uyarılmış hücrelerde belirgindirler.

Sitoplazmada değişik sayıda ribozom ve poliribozomlar, genişlemiş bir Golgi cisimciği, artmış sayıda mitokondriler ve lizozomlar, lipid damlacıkları ve vaküoller bulunur.

I.2.1. T ve B hücreleri :

Antikor yapımını üstlenen, farklılaşmış lenfositler B hücreleri

(Bursa bağımlı, veya kemik iliği bağımlı) olarak, hücre sel tip bağışıklıkta görev alan hücreler ise T hücreleri (timusa bağımlı hücreler) olarak tanımlanmaktadır.

Laboratuvar da, T ve B hücreleri en fazla, ayırtettirici yüzey özelliklerine göre tanınırlar (15,16,17,18). Böylece B hücreleri zara bağılı immunoglobülin (Ig) ile karakterize olup immünofluoresans veya diğer tekniklerle tanınırlar (16,17).

Periferik kandaki lenfositlerin % 10 ile 20 si zara bağılı Ig içerir (17). Burada IgM en büyük immünoglobülin sınıfını oluşturur (zar immunoglobülinlerinin yarısı veya 2/3 ü). Gerisini ise IgG oluşturur. IgA, IgD ve IgE'ye lenfosit zarında nadiren rastlanır (16).

B lenfositlerinde kompleman-C₃ için de reseptörler olmakla beraber Ig "marker" (işareti) taşıyan lenfositlerin ancak yarısında bu gösterilebilir (16). Bir diğer yararlı ayırtettirici özellik de, B lenfositlerde F_C kısmı için reseptör bulunmasıdır. Bu reseptör en iyi, agregatlar teşkil eden gamaglobülinlerin hücre yüzeyine alınması ile gösterilir (16,17).

T hücreleri, kolayca gösterilebilen, yüzey immünoglobulinleri, F_C reseptörleri veya kompleman reseptörleri içermezler. En kolaylıkla ve en emin bir şekilde koyun eritrositleri ile rozet yapmaları ile tanınırlar. Bu özellikleri T hücrelerinin, antikor olmayan ve koyun eritrositleri gibi hücreler için özgül olan bir reseptör taşımalarına bağılıdır (15,16,17). Ortalama olarak periferik lenfositlerin % 69-82'si böyle rozetler meydana getirir (16). B hücreleri ise koyun eritrositleri ile rozet meydana getirmeyenler (15). B ve T hücreleri "scanning" elektron mikroskopunda da farklılık gösterirler. T hücreleri oldukça düz bir satıh görüntülerlerken, B hücrelerinin dış satıhları mikrovilluslarla kaplıdır (19).

İnsanlarda dolayan lenfositlerin büyük bir kısmı, % 90'ı uzun ömürlüdür. Bu hücrelerin ortalama hayat süreleri (intermitotik süre) 4.4 sene olarak hesaplanmış olup (20), bazı hücreler için 20 seneyi bile geçmektedir (21,22).

Lenfositlerin ana fonksiyonu, bağışıklığın gerçekleştirilmesidir. Oldukça karışık bir olay olan bu durum, B lenfositleri tarafından özgül immunoglobulinlerin (antikorların) sentez edilmesi ve T lenfositleri tarafından da hücre sel tip bağışıklığın sağlanması ile oluşturulur.

Lenfositlerin doğması ve özgül bir görev için programlanması oldukça karışık ve tamamiyle açıklanmamış bir olaylar zinciridir. Bununla birlikte bu mekanizmayı genel bir şekilde açıklamaya çalıştığımız zaman lenfoid organları, santral (kemik iliği ve timus) ve periferik (dalak ve lenf nodu) olarak sınıflamamızda yarar vardır.

Santral lenfoid organlar, periferik lenfoid dokuların hücrelerini sağlarlar. Timus, lenf nodlarının "parakortikal alanlarını" ve dalağın "beyaz pulpasını" hücreyle doldurur ve bu sahalar, gecikmiş aşırı duyarlılık (hipersensivite) reaksiyonu, homograft atılımı, graft versus host hastalığı ve bazı tip antikör cevaplarının yardımcı fonksiyonlarında rol alan hücre sel tip bağışıklığı gerçekleştirir. Bursa veya insandaki eş değeri (kemik iliği ve fetal karaciğer) ise lenf nodlarının meduller kordonlarını hücreyle doldurur ve bu hücreler antikör üretimini gerçekleştirir.

Santral lenfoid organlar, öncül (prekürsör) hücreleri sağlamalarının yanı sıra, bağışık özgürlük kazanmış hücrelerin olgunlaşmasını sağlayan humoral maddeleri de salgırlarlar.

Kemik iliği, lenfosit dönüşümünün çok yüksek olduğu bir organdır. Kobaylarda yapılan çalışmalar, kemik iliğindeki tüm küçük lenfositlerin

her üç günde bir yenilendiğini göstermiştir (23,24).

Kemik iliğindeki lenfositlerin birçoğunun kaderi ve fonksiyonu bilinmemekle beraber, kemik iliğinden gelen hücreler,

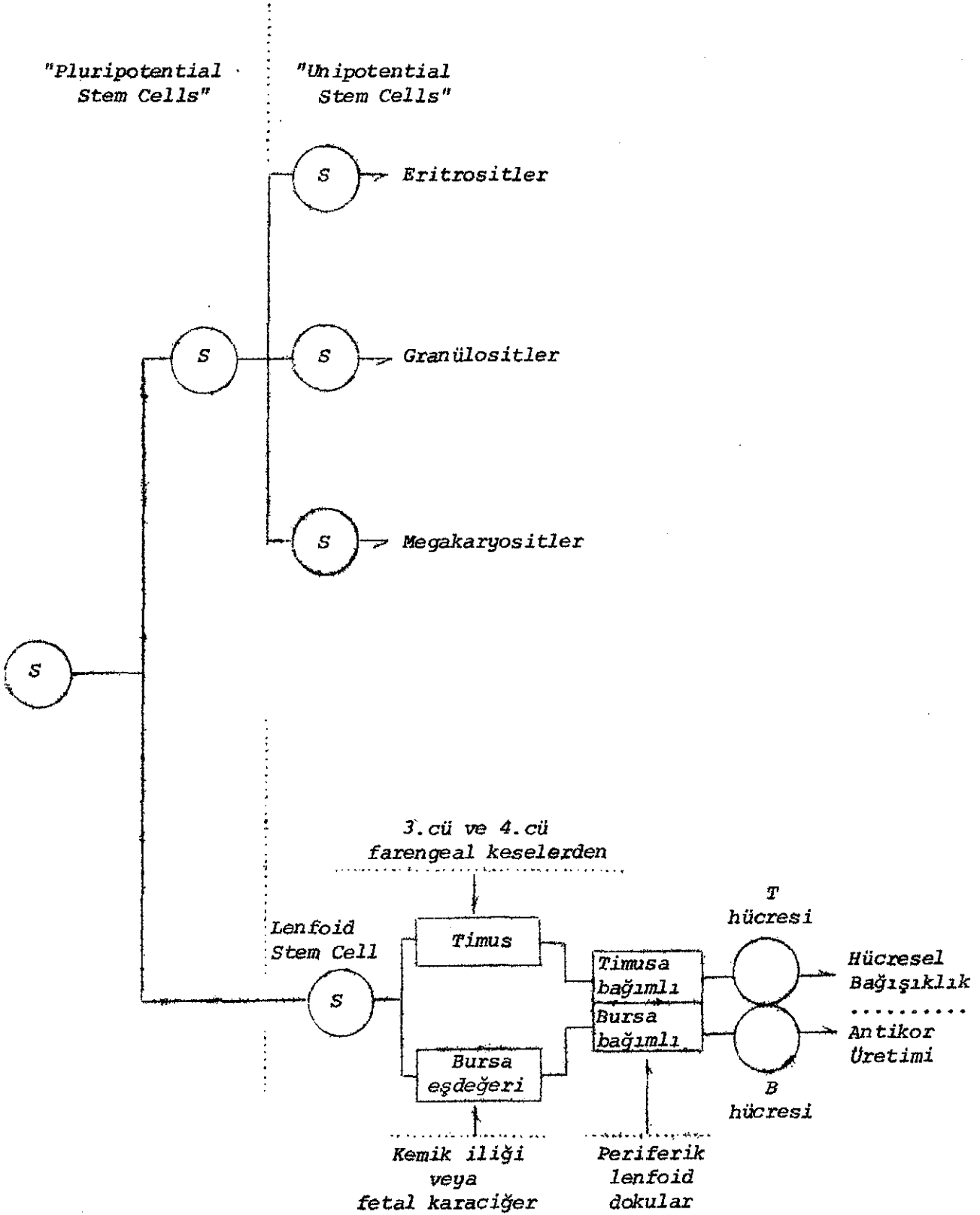
- 1- "Pluripotential stem cells" (yüksek farklılaşma potansiyeline sahip başlangıç hücreler) olarak (25) fonksiyon gösterirler (Tablo 1).
- 2- Diğerleri, lenfoid "Stem cells" olarak rol oynar ve timusa, bursa'ya veya memeli eşdeğerine giderek özel bir tip bağışıklık fonksiyonunda görev alırlar.
- 3- Bazıları periferik lenfoid dokulara göç eder ve orada antikor oluşturan hücrelerin (B hücrelerinin) kaynağını oluşturur (26).
- 4- Kemik iliği lenfositlerinin çok büyük bir kısmı, açıkça anlaşılan bir fonksiyon göstermeden gene oldukları yerde tahrip edilirler.

Timusa bağımlı lenfositler, kemik iliği veya fetal karaciğer gibi hematopoetik organlardan gelir ve timus epitelini ile yakın etkileşme sonucu T hücrelerine farklılaşırlar (27). Lenf nodlarının veya torasik duktusunun hücreleri, normalde, pek timusu ziyaret etmezler (28).

Timus bağ dokusu ile, lobüllere ayrılmış, kan dokusundan çok zengin bir organdır. Lobüllerin hemen septalarla ilişkide olan kısmı, korteks, daha iç kısımları ise medulladır. Hem korteks hem de medullada lenfositler, bir epitel hücreler ağı üzerindedirler. Timus korteksi de tıpkı kemik iliği gibi yüksek bir mitotik endeks gösterir. Buna karşılık medulla'daki lenfositlerin mitotik aktivitesi çok düşüktür. Timus lenfositlerinin küçük bir kısmı, lenf nodları veya dalaktaki timusa bağımlı alanlara göç ederek, hücrel bağışıklıkta rol oynarlar veya antikor üretimini düzenleyen T hücreleri olarak programlanırlar (helper, supressor, killer cells).

Tablo 1. Hematolojik ve lenfoid sistemlerin gelişmesi.

S = Stem cell



I.3. ERİTROİD MATÜRASYON, ERİTROSİT VE ERİTROSİT ZARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER :

I.3.1. Eritroid Matürasyon :

Eritroid hücreler gözönüne alındığında onları, gerek öncül olsunlar gerekse olgun, tek bir bütünün bir bileşenleri olan, dağınık halde bulunan ve "erythron" adı verilen bir organ olarak düşünebiliriz (29). Erythron öncül ilkel normoblastlardan bir seri değişmeler sonucu çekirdeksiz özgül kırmızı hücrelerin ortaya çıktığı bir organ modelidir.

"Stem cells" → çekirdekli → kemik iliği → Dolaşımdaki (30).
eritrositler retikulositleri eritrositler
 $5 \times 10^7 / \text{kg}$ $5 \times 10^9 / \text{kg}$ $3.3 \times 10^9 / \text{kg}$ $330 \times 10^9 / \text{kg}$

Morfolojik olarak tanınabilen, en az olgunlaşmış, eritrosit öncül hücre pronormoblast olup, bunu olgunlaşma sırasına göre bazofilik normoblast, polikromatofilik normoblast, ortokromatik normoblast, retikulosit ve olgun eritrosit izler. Olgunlaşmanın bazofilikten asidofiliğe doğru gitmesi, bazofilik RNA'nın azalmasına ve asidofilik Hb'nin artmasına bağlıdır.

Bu arada çekirdek piknotik dejenerasyona uğrar ve atılır (31). Hemoglobin sentezi ilk olarak bazofilik normoblast devresinde başlar, polikromatofilik devrede maksimuma ulaşır ve çekirdeğin kaybından sonra retikulosit devresinde de devam eder.

I.3.2. Olgun eritrosit :

Olgun eritrosit organizmanın en özgül hücrelerinden biridir. Çekirdek, mitokondri ve ribozom gibi sitoplazmik organelleri yoktur. Proteinin % 95 inden fazlası hemoglobindir. Bikonkav disk şeklindeki eritrositin normal çapı 7.2-7.9 μm arasındadır (32). Bununla beraber dar damarlardan

geçerken şeklini değiştirebildiği sinematografik olarak gösterilmiştir (33). Eritrositler 4 µm çapındaki damarlardan rahatça geçebilmektedir.

I.3.3. Eritrosit Zarı :

Eritrosit zarı hakkında bilinenlerin çoğu, hemolizden sonra, hücreler patlatılarak elde edilen ghostlar sayesinde olmaktadır. Ghost'lar dikkatli hazırlandığı takdirde hiç hemoglobin bulanışı olmadan hazırlanabilir (34, 35). 100 ml eritrositten 230-300 mg ghost elde edilebilir. Böyle bir ghost karışımı, % 40-50 protein, % 35-45 lipit, % 7-15 karbonhidrat içerir (34, 36). Olgun eritrositteki bütün lipitler eritrosit zarında bulunur (37). Eritrositin nötral lipitleri hemen tamamen, serbest esterleşmemiş kolesteroldür (38). Eritrosit zarının fosfolipitleri dört sınıf bileşenden oluşmaktadır : Fosfotidilkolin (lecithin), fosfotidiletanolamin, sfingomyelin ve fosfotidilserin. Bu lipitlerin her birine iki, sadece, sfingomyeline tek yağ asit yan zinciri takılıdır. Eser miktarlarda, tek yağ asiti zinciri taşıyan fosfolipitlere (lysolecithin) veya yağ asitinin bir vinyl-eterle yer değiştirdiği (plazmalogens)'lere rastlanır.

Glikolipitler total lipitlerin büyük bir kısmını oluşturmamakla birlikte biyolojik önemleri oldukça fazladır. En belli başlı eritrosit glikolipit'i globosit'tir. Ayrıca eser miktarlarda fukoz içeren ceramid-glikolipitler de mevcuttur. Bunların antijenik özellikleri A, B, H ve Lewis kan gruplarına uymaktadır (39). Olgun eritrosit lipitleri sentezleyemez. Bu yüzden eritrositteki lipit kaybı plazma'dan karşılanır. Kolesterolle lecithin plazma lipoproteinlerinden eritrosite transfer edilir. Burada hız ayarlayıcı kademe plazma kolesterolünü esterleştiren bir enzim olan lecithin-kolesterol acyltransferaz'dır (40). Eritrosit proteinlerin % 20 sini spektirin oluşturur (41). Karbohidrat veya lipit grupları içermedi-

ğinden, elektroforez, ultrasantrifugasyon ve immunodiffüzyonda homojen olarak bulunur. 140 000 molekül ağırlığında monomerlerden oluşur. Glutamik asit ve sisteinden zengindir. Ca^{+2} varlığında lifimsi, suda erimez polimerler oluşturur. Zarın iç yüzeyinde bulunur. Spektirinden sonra en iyi incelenmiş eritrosit zarı proteini bir glikoprotein olan "glycofhorin"dir. Zar proteinlerinin % 10 unu oluşturur (42). 55 000 molekül ağırlığındaki monomerler 550 000 molekül ağırlıkta agregatlar oluşturabilir. Molekülün % 60'ı karbohidrattır. Zarın sialikasidinin büyük kısmı ve heksoz ve heksozaminlerin de yarısı glikoforin üzerindedir. Zarın dış yüzünde bulunur. Glikoforin zarın karakteristik negatif yükünü verir. Ayrıca A, B, M ve N özgül kan grup antijenlerini ve influenza virusu için, "phytohemagglutinin" ve "Wheat germ agglutinin" için özgül reseptörler taşır.

Diğer zarsal proteinler zara bağlı enzimlerdir. Bunlar gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (43), aldolaz (43), 3 fosfogliserat kinaz (43), adenil kinaz (43), cAMP bağımlı protein kinaz (39), ATPaz, kolinesteraz (37), ve tiroid hormonunu deiyodinize eden bir enzim olarak sıralanabilirler.

Eritrosit zarı hakkındaki bilgiler giderek arttıkça, eritrosit zarının daha önceleri düşünüldüğü kadar basit bir yapı olmadığı anlaşılmaktadır. Örneğin, 1973'te Roth (46) eritrosit yüzeyinde peptid hormon reseptörlerinin varlığını göstermiştir.

Rasmussen ve arkadaşları (47), vazoaktif hormonlar, epinefrin, prostaglandin E_2 ve E_1 in yıkanmış insan eritrositlerinde hücrenin deformasyonunu, ozmotik frajiliteyi, zar yapısının ana görünüşünü ve hücrenin hacmini değiştirdiğini göstermişlerdir. Bu değişiklikler, adenil-siklaz-cAMP kontrol sistemiyle olmamakta, fakat zar yüzeyi altındaki sitoplazmik iskeletin Ca^{+2} 'a bağımlı değişmesi ile gerçekleşmektedir (47). PGE_1 ve PGE_2

nin etkileri çok özgül ve zıt olmakta PGE_1 hücre volümünü azaltmakta, PGE_2 ise arttırmaktadır (47).

I.4. K-562 HÜCRELERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER :

Son yıllarda, lenfoblastoid orijinli olan birçok doku-kültürü hücreleri geliştirilmiştir. Bu hücre tiplerinin çoğu B hücresi klonlarını (tek hücreden üreyen hücre topluluğu) temsil etmekte ve EBV (Epstein Barr virus) genomunu taşımaktadırlar.

Bu hücrelerin alışılmış kültür ortamlarındaki üreme kolaylıkları, bunların orijinal tümör hücre popülasyonunu ne ölçüde temsil ettikleri kuşkusunu doğurmaktadır (48).

K-562 hücrelerinin orijinal tümöral hücreleri ne ölçüde temsil ettikleri çok ilginç bir konudur. Bu hücreler ilk olarak 1973 yılında, Lozzio ve Lozzio tarafından, blastik krizdeki kronik myeloid lösemili bir hastanın plevral mayiinden üretilmeye başlanmıştır (49).

Kültür hücrelerin Philadelphia kromozomu taşıdığı (kronik myeloid löseminin işareti) ve bunun yanı sıra immünglobulin üretmediği, EBV genomu içermediği, B ve T hücrelerine benzemediği Lozzio ve Lozzio ve Klein ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (49,53).

Böylelikle K-562, bugüne kadar bilinen tek malign, myeloid orijinli hücre kültürü olmaktadır. Bu çok kolay üreyebilen malign hücreler, aynı zamanda normal insan lenfositlerinin sitolitik etkilerinin çalışmasında da (killer cell assay) çok uygun bir hedef teşkil ediyorlardı (50).

Bununla birlikte, devam eden çalışmalar K-562 nin orijininin kuşku duyulmasına yol açmıştır. Greaves ve arkadaşları 1977'de, kronik myeloid

lösemideki blastik krizin, akut lenfoblastik lösemiye benzeyen immatür klonları oluşturabileceğini bildirmiştir (51).

Andersson ve arkadaşları (52), 1979 da K-562 lerin, zar glikoprotein yapılarının eritrosit glikoprotein yapılarına benzerlik gösterdiğini ve dolayısıyla bu hücrelerin, ne lenfoid ne de myeloid olmadığını aksine eritroid bir hücre klonundan geldiğini ileri sürmüşlerdir.

Rutherford ve arkadaşları (54), 1979 da, K-562 hücrelerini 0.1 nM hemin ile aktive ederek embriyolojik hemoglobin sentez ettirmişlerdir. Andersson ve arkadaşları (55) yine 1979 da K-562 hücrelerini sodyum butirat ile farklılaşmaya zorladıkları zaman (4 gün 1 mM Na butyrate) hücrelerde benzidin pozitif lekeler görmüşlerdir. İmmunolojik ve elektroforetik olarak uyarılmış hücrelerde, spektrin ve glikoforin A sentezlendiğini gösterilmiş ve ortamda eritrosit benzeri eozinofilik partiküllerin ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Son olarak, Haziran 1981 de Schulman ve arkadaşları (56), yayınladıkları ilginç bir çalışmada lenfoblastoid hücre kültürünü : Raji (B hücresi - lenfoblastoid orijinli) ve Molt (T- hücresi - lenfoblastoid orijinli) ve K-562 hücrelerini ve tavşan retikülositlerini, radyoaktif işaretli transferin ve transferine bağlı demirin hücreler tarafından alınması yönünden incelemişler ve hücrelerin hepsinin retikülositlere benzer oranlarda transferin ve transferine bağlı demir bağladığını göstermişlerdir.

Raji, Molt, K-562 hücrelerinin, transferinin reseptör sayıları ve affiniteleri retikülosite benzerlik gösteriyorlardı. Buna karşılık retikülositlerde alınan radyoaktif demirin % 90 ını hem içine sokulurken, Raji, Molt ve K-562 de alınan demirin ancak % 10 u hem içine sokuluyordu. Retikülositlerde, fazla hem varlığında, demirin transferinden alınmasının inhibe

olmasına karşılık her iki lenteblastoid hücre ve K-562 lerde bu inhibisyon gözlenmemektedir. Yani retikülositler demiri transferinden, diğer hücrelere benzemeyen bir mekanizmayla alıyorlardı (56). K-562 lerin de, diğer iki lenfoblastoid hücre tipi gibi bu mekanizmaya sahip olmaması ilgi çekiciydi ve eritroid orijinine gölge düşürüyordu.

I.5. LEKTİNLER HAKKINDA GENEL BİLGİ :

İlk olarak Stillmark (57) tarafından bulunan ve Sumner (58) tarafından saflaştırılan, alyuvarları ve bazı hücreleri aglutine etme özelliğine sahip proteinlere, doğada özellikle baklagillerin tohumları da rastlanılmaktadır. Bununla birlikte aglutine etme özelliğine sahip proteinlerin, bazı bitkilerin kök ve yaprakları da (59,60), bazı aşağı sınıf omurgalılarda (61) ve diğer bazı organizmalarda da bulunduğu gösterilmesi üzerine, Byod bu proteinlere lektin adını vermiştir (60). Çeşitli kan gruplarına olan özgüllükleri, kan gruplarının sınıflandırılmasında ve tanınmasında; mitojenik özellikleri, lenfositlerin mitojenik transformasyonlarının incelenmesinde; hücre yüzeylerinde bazı şekerlere özgül olarak bağlanabilmeleri de hücre yüzey yapısını araştırmada, lektinleri önemli bir araç haline getirmektedir. Çeşitli lektinler izole edilmiş ve saflaştırılmış olmakla beraber, Concanavalin A bunlar içinde özellikleri en fazla bilinendir.

I.5.1. Concanavalin A :

Concanavalin, Canavalia Ensiformis bitkisinden, ilk kez 1916 yılında, Jones ve Johns tarafından saf olarak elde edilmiş bir lektindir (62-65). Concanavalin A'nın biyolojik aktivitesinin olup olmadığı en çok, 2x seri seyreltmelerle, eritrositlere karşı hemaglutinasyon aktivitesini takip ederek incelenmektedir (66). Con A, aglutinasyon ve presipitasyon deneyle-

rinde maksimum aktiviteyi, pH: 6-7 arasında olduğu zaman göstermektedir (58,65). Bu pH aralığında Con A tetramer yapıdadır (72,73). Gene bu pH aralığında Con A molekülü β konformasyonunda bulunmakta, α -heliks kısımlar bulunmamaktadır (70).

Sıcaklığın da Con A molekülünün biyolojik etkinliği ile çok yakın bir ilişkisi vardır. Düşük sıcaklıklarda ($0-4^{\circ}\text{C}$ gibi) Con A hücrelere bağlanmakla beraber 20 veya 37°C 'da yaptığından daha az aglutinasyon yapar (74,75). 40°C 'ın üzerindeki sıcaklıklarda, Con A'nın bağlanma bölgelerinin bu sıcaklıktan etkilendiği görülmüş ve bu şekilde bağlanma olayının hidrojen bağı içerdiği anlaşılmıştır (76). Con A molekülü yüksek derişimdeki üre, guanidin hidroklorid, formamid ve 1.1.3.3.-tetrametil üre gibi denatüre edici ajanların etkisi altında oluşan, konformasyonundaki tersinmez değişikliklere bağlı olarak, sakkarit bağlama özelliğini kaybetmektedir (77).

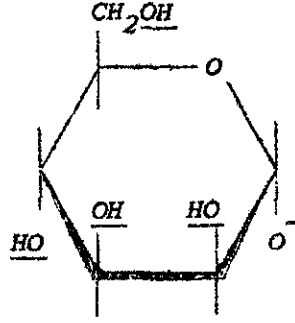
Summer ve Howell (67), Con A molekülünün biyolojik etkinliği için Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ve Mg^{+2} tuzlarının gerektiğini göstermişlerdir.

Con A molekülündeki, lizinlerin ϵ -amino gruplarının tamamen asetillenmesi ve asetik anhidrit asetilasyonu sırasında tirozinlerin fenol gruplarının % 30'unun asetillenmesinin biyolojik aktiviteyi etkilemediği görülmüştür (78).

Con A molekülü, $40 \times 39 \times 42 \text{ \AA}$ boyutlarında, çok sıkı katlanmış bir elipsoit şeklindedir. Bu yapı her biri 4 alt birimden oluşan bir tetramerdir. Con A protomerinde diğer birçok lektinin aksine hiç karbohidrat bulunmamaktadır (79,80,81).

Con A molekülü, her alt biriminde, bir Ca^{+2} iyonu, bir Mn^{+2} iyonu ve bir de mannoz-, glukoz-, veya fruktoz- sakkarit bağlanma bölgesi içer-

mektedir (68,69) (Şekil 2). Elektron rezonans (70), circular dichroism, elektron paramagnetik rezonans (71), yöntemleriyle yapılan araştırmalar, sakkarit bağlama bölgesi ile iyon bölgelerinin ilişkisini; bu iyonlarla yapılan diğer çalışmalar (83) ve x-ışını kristalografik analizleri (84) ile NMR spektroskopisi çalışmaları (85) sonucunda Con A sakkarit bağlama bölgesinin en çok α -D-mannopiranozit ile uygunluk gösterdiği anlaşılmaktadır.



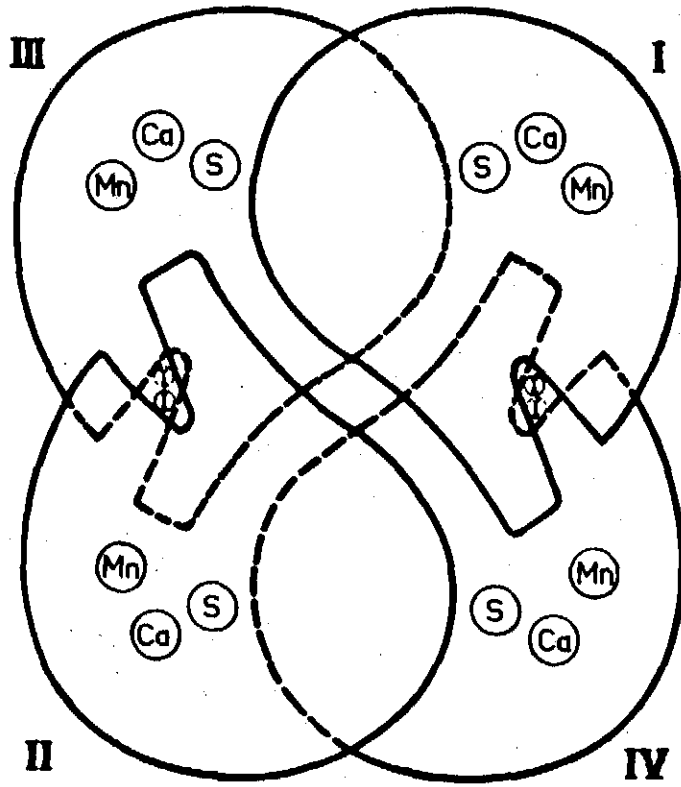
Şekil 1 : α -D-Mannopiranozid biriminin yapısı. Altı çizgili hidroksil grupları bağlanmadan sorumlu olan hidroksil gruplarıdır.

α -D-Mannopiranozid'in C_3 , C_4 ve C_6 pozisyonlarındaki -OH grupları bağlanmadan sorumludurlar. Buralarda yapılan değişiklikler (deoksi veya o-metil eter gibi) Con A molekülü ile bağlanmayı tamamen engellemektedir (86).

Özellikle hücre yüzeyi çalışmalarında çok kullanılan, Con A'nın bir çok türevleri geliştirilmiştir (fluorosein, ferritin, hemosiyanin ve peroksidaz ile konjuge Con A türevleri ve H^3 asetilasyon, ^{14}C suksilasyon, ^{125}I iyodinasyon ve ^{63}Ni - ile elde edilen radyoaktif Con A türevleri) (87,88, 89,90).

I.6. ZAR YAPISININ İNCELENMESİNDE FLUORESAN LİGANDLAR :

Fluoresans, bir molekülün enerji soğurarak daha yüksek enerjili duruma geçmesi ve bunu hemen izleyerek kademeli bir düşüş ile en düşük enerjili duruma geçerken ışık yayması (emisyonu) olarak tanımlanabilir. Yayılacak



ŞEKİL 2: Con A tetramerinin şematik çizimi. Dört alt birim kalın çizgilerle gösterilmiştir. Ca^{++} , Mn^{++} , α -(O-iyodofenil)-D-glukopiranozit ve özgül sakkarit bağlama bölgeleri sırasıyla Ca, Mn, β -IPGlc ve S olarak gösterilmiştir. Roman rakamları her bir alt birimi ifade etmektedir.

(Becker, J.W., Reeke, G.N., Jr., Wang, J.L., Cunningham, B.A. ve Edelman, G.M., J. Biol. Chem., 250, 1513 (1975).

ışığın dalga boyu ve şiddeti hem molekülün kimyasal özelliğine hem de içinde bulunduğu çevreye şiddetle bağlıdır.

Fluoresan ligand olarak kullanılacak moleküllerin emisyon özellikleri çevreye bağımlılıkları açısından kolaylıkla değerlendirilebilir olmalıdır. Proteinlerin konformasyon analizlerinde kullanılan fluoresan ligandlar yanında zar yapısındaki değişiklikleri ölçmede kullanılan fluoresan ligandlar vardır (91). Bunların en iyi tanımlanmış olanları pyren sulfonat (92), auroramin O (93), ethidium bromür (94), atebrin ve akridin oranj (95) ile 1-anilinonaftalen - 8 - sulfonikası (ANS) ve analoglarıdır (96).

ANS ve analogları için maksimum quantum verimleri ve değişik polariteli ortamlardaki maksimum emisyon dalga boyları araştırılmıştır (96). Bu bileşikler içinde buldukları çevrenin polaritesi hakkında detaylı bilgi edinmede en geçerli ligandlar olarak değerlendirilmekte ve değişik zarlar için yapılan ölçümlerde öncelikle kullanılmaktadırlar (97-102).

Bu ligandları hem emisyon spektrumu hem de quantum verimi, bağlandığı ortamın polar oluşu ile şiddetle değişim gösterir. Su gibi polar bir ortandan heksan gibi tamamen apolar bir ortama geçişte ANS'nin quantum verimi 0.004 den 0.98'e yükselir. Zara bağlanan ANS miktarı ve quantum verimi zarın polaritesi hakkında bilgi verirken bağlı ANS lerin yakınlarında bulunan triptofanlara (akseptör moleküllere) enerji aktarması ANS ile (donör) triptofanlar (akseptör) arası uzaklığın ölçülmesine olanak verir (103).

I.7. NORMAL HÜCRELERDE VE TÜMÖRAL TRANSFORMASYON GÖSTEREN HÜCRELERDE,
LEKTİN RESEPTÖRLERİNİN SAYI VE KİNETİKLERİ VE LEKTİN-HÜCRE
ETKİLEŞMESİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER :

Çeşitli araştırmacılar tarafından, gerek tümör hücrelerinin gerekse normal hücrelerin içerdiği lektin reseptörlerinin sayısı ve bunların bağlanma kinetikleri hakkında birbiri ile çelişen görüşler ileri sürülmektedir (104-111). Bir çalışmada sıçan T lenfositlerindeki Con A reseptör sayısı 3.8×10^6 /hücre (104), bir diğer çalışmada ise 2.6×10^6 /hücre (105) olarak rapor edilmiştir. Bazı çalışmalarda periferik insan B lenfositlerindeki reseptör sayısı 1.12×10^6 /hücre olarak gösterilmiş (106,107), bir çalışmada ise periferik lenfositlerin Con A molekülü ile 12 saatlik bir inkübasyonu sonucu transforme oldukları ve reseptör sayısının 5.8×10^6 /hücreye yükseldiği gösterilmiştir (107). Başka bir çalışmada ise insan eritrositleri için reseptör sayısı 2.2×10^6 /hücre olarak rapor edilmiştir (109).

Fluoresan mikroskobu ve elektron mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda lektin reseptörlerinin dağılımı ve mobilitesi konusunda daha detaylı bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonucu transforme hücrelerde, hücre yüzeyi reseptörlerinin normal hücrelere göre daha toplanmış (clustered) halde bulunduğu gözlenmiştir (112). Daha sonra yapılan çalışmalar, transforme hücrelerde gözlenen lektin bağlama bölgelerinin toplanmasının lektin ile indüklenen bir olay olduğunu göstermiştir.

Bazı araştırmacılar, periferik insan lenfositlerinde Con A'nın indüklediği, Con A reseptörlerinin "capping" olayını, "Con A horseradish peroksidaz" ve elektron mikroskobu kullanarak incelemişler ve $4^{\circ}C$ 'da tüm hücre çeperinde görülen "Con A horseradish peroksidazın", sıcaklık $37^{\circ}C$ 'a yükseldiğinde "cap" oluşturarak endositozla içeriye alındığını göstermişlerdir. Araştırmacılar bu olayın yalnızca düşük Con A derişimlerinde,

serbest Con A varlığında, Ca^{+2} ve Mg^{+2} varlığında, veya Colchicine, Vinblastine ile etkileşerek olduğunu rapor etmişlerdir (113).

Con A'nın T ve B lenfoblastoit hücre kültürlerini aglutine etme özelliğinin farklı olduğu ve bu özelliğin yüzey sialyl transferaz aktivitesi ile ilişkili olduğu, sialyl transferaz aktivitesi yüksek bulunan B lenfoblastoid hücrelerde aglutinasyonun T lenfoblastoid hücrelere nazaran daha yüksek olduğu gösterilmiştir (114).

Sıçan B lenfositlerinde, antiimmünglobülinin indüklediği "capping" Colchicine ve Vinblastine tarafından engellenmemekte fakat dağılımı gelişigüzel bir hal almaktadır. Burada Con A hücrelere bağlandığı zaman "cap" oluşumunun durduğu ve böylece reseptör mobilitesini sağlayan yapıların Con A bağlanması ile etkilendiği gösterilmiştir (115).

Lenfositlerin, Con A gibi bazı lektinlerle 10-24 saatlik ön inkübasyon sonucu uyarılması lenfositlerde birtakım olaylara yol açmaktadır. Bunlar şöylece sıralanabilir : a) yüzey reseptörlerinin yeniden dağılımı (116), b) iyon transportunun uyarılması (117,118), c) amino asit transportunda artma olması (119), d) ve muhtemelen zarsal lysolesithin-açıltransferazın uyarılmasına bağlı olarak (120), plazma zarı lipid içeriğinin dramatik olarak artması (121).

Ayrıca Con A'nın tavşan timosit plazma zarı "turnover"ını da arttırdığı ve bu artışın özellikle 55 000 moleküler ağırlıklı bir protein için belirgin olduğu gösterilmiştir (122).

Bazı araştırmacılar ise lektinle aktive olmuş insan T lenfositlerinde 130 000 molekül ağırlığında bir glikoprotein ortaya çıktığını söylemişlerdir (123).

Kimura ve arkadaşları (124), sıçan T lenfositlerinde, hücreler yalnız uyarıldığı zaman ortaya çıkan B orijinli hücrelerde bulunmayan, T145 adını verdikleri bir glikoprotein varlığını rapor etmişlerdir.

I.8. A M A Ç :

Bu çalışmada insan periferik T ve özellikle B lenfositlerinin bazı yüzey özelliklerinin araştırılması amaçlandı. Bu hücrelerin zarsal özellikleri, Con A reseptör sayı ve afinitelerinin saptanması, hücre zarı glikoproteinlerinin elektroforetik görünümü ve bunlardan hangilerinin Con A reseptörü olarak davrandığının ortaya konması şeklinde araştırıldı. Aynı zamanda lösemili bir hastadan devamlı hücre kültürü haline getirilmiş K-562 hücrelerinin aynı yüzey özellikleri gerek B lenfositleri ve gerekse eritrositler ile karşılaştırıldı. Bulgular, orijini kesin olarak belli olmayan K-562 hücrelerinin yüzey özelliklerinden yararlanılarak, normal diferensiasyon ve malign transformasyonda hücre yüzeyinin rolü gözönüne alınarak tartışıldı.

II. ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER

II.1. ARAÇ ve GEREÇLER

Concanavalin A (Grade IV), α MM, adenozin difosfat, dithiotreitol, Sigma firmasından (ABD), ³H-asetik anhidrit, Amersham firmasından (İngiltere), Sefadeks türleri Pharmacia firmasından (İsveç), PPO, POPOP, naftalen, metanol, BDH firmasından (İngiltere), dioksan, etilen glikol, Merck firmasından (F.Almanya), hyamin hidroksit, Packard Instrument firmasından (ABD), Eagle's Minimal Essential Medium, fetal dana serumu, Difco firmasından (ABD), fluoresein-Concanavalin A, Sigma firmasından (ABD), anti IgM, fluoresein konjuge anti IgM, Behringwerke firmasından (F.Almanya), dekstran, Baxter firmasından (ABD), metil selüloz, Fisher Scientific Company firmasından (ABD), hypaque (Urografin) Schering firmasından (F.Almanya), sığır serumu albumini, Armour Pharmaceutical Company firmasından (ABD), K-562 hücreleri, G. Klein, Karolinska Enstitüsü (İsveç)'den temin edildi.

Kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta idi.

Sıvı sintilaasyon sayacı, Packard Tri-carb Model 3004 (ABD), Spektrofotometre Beckman (R) (Model-25), Santrifüjler, International Equipment Co. Model K-2 (ABD), Hettich AHT 5200 (F.Almanya), Sorvall SS 33 (ABD), Etüv Memmert (ABD), Işık mikroskobu Seitz Wetzler (F.Almanya).

Fraksiyon toplayıcısı LKB 700 ultralog, LKB (İsveç), hücre kültürü şişeleri Kimax (ABD), hemaglutinasyon plakları Cooke Microtiter System (İngiltere), Spektrofluorometre Aminco Bowman (ABD).

II.2. YÖNTEMLER

II.2.1. Hücreler :

Bu çalışmada sağlıklı gönüllülerden alınan periferik insan kanı lenfositleri kullanıldı. Periferik venden alınan kan, pıhtılaşmayı önlemek için ya 1/10 oranında EDTA (disodyum etilen-diamin tetraasetik asit, % 0.9 NaCl içinde % 2'lik olarak hazırlandı ve pH 7.4'e ayarlandı) ile karıştırıldı, ya da 2-4 mm çapındaki cam bilyeler ile defibrine edildi. Bundan sonra 1/5 oranındaki % 6 dekstran ile veya 1/4 oranındaki metil selüloz ile (her ikisi de % 0.9'luk NaCl içinde) karıştırılıp 1 saat inkübe edildi. Heriki durumda da süpernatant eritrosit tabakasının hemen üzerine kadar alındı. Uygun tamponda $4-5 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde çözüldü. Uygun tamponu bulmak için altı değişik tampon denendi. Hücrelerin santrifüjsüz (1 xg'de) % 6'lık dekstran ve % 1'lik metil selülozda çöktürülmeleri Tablo III'de karşılaştırıldı. Tampon tiplerinin karşılaştırılması ise Tablo II'de gösterildi. Hücre süspansiyonu Ficoll-Hypaque gradyeniine Pasteur pipetiyle ve gradyeni dalgalandırmamaya çok dikkat ederek, kenardan sızdırılarak yayıldı. Uygun Ficoll-Hypaque yöntemini belirlemek için altı değişik teknik denendi, Tablo IV'de kıyaslandı. Bütün yöntemlerde gradyenin yoğunluğu 1.075-1.079 gm/ml olarak ayarlandı. Santrifüjden sonra ara tabaka (Ficoll üstü tabaka veya "interface" bir Pasteur pipetiyle dikkatle alındı. Bu hücreler koyun eritrositleri ile (koyun kanı % 2'lik EDTA ile alınıp Alsever solüsyonunda 4°C'da saklandı ve en geç iki hafta içinde kullanıldı) önce 37°C'da bir süre inkübe edildi, düşük devirde 5 dakika santrifüj edildi ve 4°C'da uygun bir süre inkübe edildi. Uygun rozet yönteminin belirlenmesi için iki ayrı yöntem, Tablo V'de gösterildiği şekilde denendi (15,16). Oluşan rozetler soğuk PBS (fosfat tamponlu saline) ile 1/1 oranında sulandırıldıktan sonra gene uygun bir Ficoll-Hypaque gradyeniine (Tablo IV) yayıldı. Bu santrifüjden sonra ara tabaka ve çökelti ayrı ayrı alındı, çökelti önce

EDTA ile 37°C'da 15 dakika inkübe edildi, sonra da hipotonik şoklarla koyun eritrositleri patlatılarak (hücreler önce 20 saniye % 2 EDTA içeren distile su içinde çözüldüler ve bu süre sonunda eşit hacimde % 1.8 NaCl ile karıştırıldılar, saf T lenfositleri elde edildi. Ara tabaka ise bir ke-re daha Ficoll-Hypaque üzerine yayıldı ve santrifüj edilip yüksek saflıkta B lenfositleri elde edildi.

II.2.2. Hücre Kültürleri :

Bu çalışmada kullanılan K-562 hücreleri RPMI 1640 ortamında üretildi-ler. Hücre kültürlerinin üremesi için vasıta % 10 oranında fetal dana se-rumu, 100 ünite penisillin ve 100 µg/ml streptomisin konuldu. Suspansiyon kültürü halinde üreyen hücreler kendi metabolik CO₂ leri ile üremeye bira-kıldı, daha sonra santrifüj tüplerine alınarak 8 dakika 1200 x g'de santri-füj edildi ve 3 kez PBS ile yıkandı. Sayım ve tripan mavisi dışlama yönte-mi ile canlılık testi yapılan hücreler deneye alındı. Yapılan canlılık testlerinde kullanılan hücrelerin yaklaşık % 90 ının canlı olduğu saptandı.

II.2.3. Protein tayinleri :

Con A ve türevleri için protein tayinleri 280 nm'de absorban ölçümü ile yapıldı. Con A için molar ekstinksiyon katsayısı olarak 1.14 kullanılı-dı (124). Diğer protein tayinleri Lowry yöntemine göre yapıldı (125).

II.2.4. Radyoaktivite sayımları :

Radyoaktivite sayımları 5 ml Bray çözeltisinde Packard Tri-Carb sıvı sintillasyon cihazında yapıldı. Aletin okuma verimi trityum için % 49 ola-rak bulundu.

II.2.5. Dioksan'ın peroksitlerden arındırılması (126) :

Bray çözeltisinde kullanılan dioksan'ın sayım sonuçlarını yükselten peroksitlerden arındırmak için dioksan 2 saat sodyum üzerinden geri soğutucuda kaynatıldıktan sonra yine sodyum üzerinden distillendi.

II.2.6. Bray sayım çözeltisinin hazırlanması (127) :

4 gm PPO, 200 mg POPOP, 60 gm naftalen, 100 ml metanol, 20 ml etilen glikol karıştırıldı ve dioksan ile bir litreye tamamlandı.

II.2.7. ³H-Con A'nın hazırlanması (128) :

Con A 10 mg/ml derişimde 10 mM fosfat tamponu içeren serum fizyolojikte (PBS) çözüldü. Ortama son derişim 60 mM olacak şekilde α -metil manno-piranozid katıldı ve 60 dakika süre ile 0°C'da bekletildi. Karışımın pH sı katı Na₂CO₃ ile 8.85'e getirildi. Özgül etkinliği 500 μ Ci/mol olan ³H-asetik anhidrit sodyum üzerinden distillenmiş dioksanda çözüldü. 5 μ Ci ³H/mg Con A olacak şekilde karışıma katıldı ve 90 dakika süre ile 0°C'da inkübe edildi. Bu karışım 90 x 1.5 cm boyutlarındaki PBS ile dengelenmiş Sefadex G-25 veya G-50 kolonuna uygulandı. Kolon 4 ml/saat akış hızında PBS ile elüe edildi. 1.5 ml olarak toplanan fraksiyonlarda protein ve radyoaktivite tayinleri yapıldı. Birleştirilen aktif fraksiyonlar 1/1000 x 3 oranında PBS'ye karşı 48 saat süre ile 4°C'da diyaliz edildi ve hemaglutinasyon aktivitesine bakıldı.

II.2.8. Mikrohemaglutinasyon (129) :

Defibrine kandan ayrılmış ve serum fizyolojik ile 3 kez 1/10 oranında yıkanmış insan, koyun ve tavşan eritrositlerinden % 1.5 luk süspansiyon

hazırlandı. Con A Dulbecco PBS ile seyreltildi ve eritrositlerle U tipi hemaglutinasyon plaklarında 1 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. 2x dilüsyonlarla hemaglutinasyon aktivitesi gösteren en düşük Con A derişimi saptandı.

II.2.9. Mikrofüj tekniği ile bağlanma deneyi (109) :

Kandan hazırlanan veya kültür ortamından alınan ve üç kez PBS ile yıkanan hücreler ($0.5-1.5 \times 10^6$ /ml) 1.5 ml'lik plastik tüplerde Ca^{+2} , Mn^{+2} , PBS ve 3H -Con A ($0.5-250 \mu g/ml$) ile 1 saat $0^\circ C$ 'da inkübe edildi. Kontrol tüplerine 60 mM αMM konuldu. İnkübasyon sonunda hücreler 9 dakika 850 xg de santrifüj edildi. Süpernatandan serbest lektin derişimini saptamak için örnek alındı. Süpernatandan döküldükten sonra dipte bulunan hücreler 50 λ PBS ile kaldırılıp, 350 λ % 2.5'luk BSA bulunan 1 ml'lik plastik tüplerin üzerine yayıldı. Ayrıca inkübasyon tüpleri iki kez daha 50 λ PBS ile yıkanarak bunlar da albuminli tüplere ilave edilerek, 9 dakika 850 xg'de santrifüj edildi. Süpernatandan alınan örnekler hem hücrelerin serbest lektinden ne ölçüde temizlendiğini hem de hücrelerin sağlam olup olmadıklarının anlaşılmasında kullanıldı. Çökelek ise hyamin hidroksit ile çözünürleştirilerek sayım şişelerine aktarıldı.

II.2.10. Asosiyasyon sabiti (K_a) ve reseptör sayısı (N)'nin hesaplanması :

Reseptör - ligand ilişkisi :



olarak ifade edilecek olursa

$$K_a = \frac{(RL)}{(R)(L)} \dots\dots\dots (2)$$

burada ;

K_a : Asosiyasyon sabiti (L) : Serbest ligand derişimi
(R) : Serbest reseptör derişimi (RL) : Reseptör-ligand kompleksi

Scatchard'ın (130) ifadesine göre,

$$\frac{(L)_b}{(L)_f} = -K_a (L)_b - K_a (R) \dots\dots\dots (3)$$

burada ;

- (L)_b : bağlı ligand derişimi
- (L)_f : serbest ligand derişimi
- (R) : toplam reseptör derişimi
- K_a : asosiasyon sabiti

Eğer,

- B : bağlı Con A
- F : serbest Con A
- N : Con A reseptörlerinin sayısı denilecek olursa

(3) numaralı denklem

$$\frac{B}{F} = -K_a B - K_a N \dots\dots\dots (4)$$

haline gelecektir.

(4) numaralı ifadeden faydalanarak B/F'ye karşı B çizilecek olursa, elde edilecek doğrunun eğimi (-K_a), x-ksenini kestiği noktada N olacaktır.

Radyoaktivite sayımları ile çizilmiş örnek bir grafikte,

$$\frac{Sbd}{\text{Özgül etkinlik (Sbd/ } \mu\text{g Con A) X Mol. ağırlık (Con A)}} = \mu\text{M Con A (bağlı)}$$
$$\frac{\mu\text{M Con A (bağlı) x } 6.02 \times 10^{23} \text{ (Avogadro sayısı)}}{\text{Deneyde kullanılan hücre sayısı}} = N \text{ (reseptör / hücre sayısı)}$$

Aynı şekilde radyoaktivite sayımları ile çizilmiş bir grafikte ;

$$\text{Eğim} = \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0} = \frac{y}{x'} = -K_a$$

Özgül etkinlik (sbd/ μg Con A)

$$-K_a = \frac{y}{x'} \times 10^{-3} \times 10^{-6}$$

Mol.ağırlık (Con A)

$$K_a (M^{-1}) = \frac{y}{x'} \times 10^3 \times \text{Mol. ağırlık Con A olarak hesaplanır.}$$

II.2.11. 5'-Nükleotidaz enzim aktivitesinin ölçülmesi (131-133) :

5'-Nükleotidaz enzim aktivitesi, 0.5 ml lik çözelti karışımında, 50 mM glycine-HCl (pH 7.5), 0.2 μg sodyum dodecyl sülfat/ μg protein, 3 mM adenozin-5'-monofosfat ve 5-20 μg protein içeren hücre suspansiyonu olacak şekilde hazırlanıp, tayin edildi. Reaksiyon 60 dakika, 37^o C'da sürdürülüp, 0.5 ml % 10'luk perklorik asit katılması ile durduruldu. Çöken protein santrifügasyonla uzaklaştırılarak, süpernatanda 0 ve 60 dakikalarda inorganik fosfat tayini yapıldı.

Inorganik fosfat tayini 300 μl örnek üzerine, 700 μl tayin karışımını konularak yapıldı. Tayin karışımı % 10 luk askorbik asit (1 kısım); % 0.42 lik amonyum molibdat (6 kısım) dan oluşmakta idi. Hazırlanan tayin ortamı 30^o C da 1 saat inkübe edildi ve 820 nm de spektrofotometrede okundu. Standart eğri, inorganik fosfat çözeltisi olarak Na₂HPO₄ (0.015 mM - 0.6 mM) kullanılarak çizildi.

Con A bağlanmasının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini saptamak için gerek B lenfositleri gerekse K-562 hücreleri 200 μg Con A / 10⁶ hücre

olacak şekilde soğuk Con A ile bir saat 0°C da inkübe edildiler ve yukarıda belirtilen yöntemle, total hücre suspansiyonundan 5'-Nükleotidaz aktivitesi bakılarak, Con A lı ve Con A sız hücreler arasındaki aktivite farkı irdelendi.

II.2.12. Hücre zarlarının fluoresein Con A ve Fluoresein anti IgM ile etkileşmelerinin fluoresan mikroskobu ile incelenmesi :

B lenfositleri fluoresein Con A ile bağlanmaya alındı (0°C da 60 dakika). Mikrofüj tekniği ile yapılan bağlama sonucu hücre çökeleği lam üzerine yayılarak lamel ile kapatıldı ve korunması için kenarlar yapıştırıldı. Fluoresan mikroskop ile incelendi. Aynı işlem fluoresein anti IgM ile tekrarlandı. Ayrıca B hücreleri anti-IgM (fluoreseinsiz) ile 30 dakika 0°C da inkübasyona uğrattıldıktan sonra fluoresein-Con A ile bağlanma yapıldı ve fluoresan mikroskop için yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlandı. Anlatılan işlemler K-562 hücreleri için aynıyla tekrar edildi.

II.2.13. Fluorometrik Tayinler (134) :

2.4 ml PBS içeren fluorometre küvetine 5 µl, 5 mM ANS (1 anilinonaf-talene - 8 sulfonat Mg⁺² tuzu) katıldı; emisyon dalga boyu 500 nM ye ayarlanarak eksitasyon spekturumu saptandı. 350 nM de bulunan maksimum eksitasyona ayarlanan alette bu kez maksimum emisyon dalga boyu 515 nM olarak bulundu. Aynı işlemler hücreler varlığında da tekrarlanarak emisyon maksimumunda sapma olmadığı saptandı.

ANS bağlama bölgelerinin polaritesi için ;

$$Q = \frac{0.4 \times F \text{ maks.}}{F \text{ etanol}}$$

bağıntısından yararlanıldı. Burada Q , kuantum verimi, F_{maks} (PBS deki maksimum flouresans), F_{etanol} (mutlak etanoldeki flouresans), 0.4 ANS nin etanoldeki quantum verimidir. Buna bağlı olarak 0.4 değerinde düşme, ortam polaritesinin azalma derecesi ile orantılıdır. F_{max} 'ın saptanması için 2.4 ml PBS içeren fluorometre küvetine 5 ml 5 mm ANS varlığında ve yokluğunda, yaklaşık 5×10^5 hücre/10 λ lık hücre suspansiyonları katıldı ve fluoresans saptandı. Düzeltilmiş fluoresans ANS varlığında elde edilen değerlerden ANS yokluğunda elde edilen ve ışık saçılımına ait değerlerin çıkarılması ile elde edildi (F_0). $1/F_0$ değerleri $1/hücre$ değerlerine karşı grafiklenerek sıfıra ekstrapole edildi ve F_{maks} saptandı. ANS bağlanma bölgelerinin sayı ve affinitelerinin saptanması için yaklaşık 4×10^6 hücre içeren 2.5 ml PBS üzerine değişik derişimlerde ANS katıldı ve fluoresans değerleri saptandı (F). Aynı işlem hücre yokluğunda yalnız ANS ile tekrarlanarak elde edilen değerler (F_0) düzeltme için kullanıldı. Bağlı ANS miktarı

$$(ANS) \text{ bağılı} = \frac{(F - F_0) \times l}{F_{maks}}$$

bağıntısı kullanılarak hesaplandı. Bu değerler ortama konulan toplam ANS derişiminden çıkarılarak serbest ANS miktarları bulundu.

$(ANS)_{bağılı} / (ANS)_{serbest}$ değerleri $(ANS)_{bağılı}$ değerlerine karşı grafiklenerek elde edilen Scatchard doğrularında K affinite sabiti ve N reseptör sayıları hesaplandı. Bağlı ANS ile zardaki triptofanlar arasındaki enerji transferi aracılığı ile zardaki triptofanlar ve ANS arası mesafeler hesaplandı. Yaklaşık 5×10^6 hücre içeren 2.5 ml lik suspansiyonun önce 290 nm'de absorpsiyonu ölçüldü (A_1), aynı örneğin fluoresansı 290 nm ile eksite edilerek 335 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü (F_1). Bundan sonra ANS (10 μ l, 5 mm) katılarak tekrar fluoresans F_2 ve absorpsiyon (A_2) ölçüldü. Enerji transferinin verimi F_1 / F_2 olarak alındı. F_1 ve F_2 "iç filtre etkileri" için düzeltildi (134). Bu düzeltme için;

$$K(A) = \frac{2.3 A \Delta y}{T^{\frac{y_1}{y_2}} - T^{\frac{y_2}{y_1}}}$$

bağıntısı ile elde edilen değerler kullanıldı. Burada A absorpsiyon, T transmittans, y_1 kuvvet ile emisyon sliti arasındaki uzaklık, Δy emisyon slit açıklığıdır ($\Delta y = y_2 - y_1$). Enerji transferinin verimi;

$$T = 1 - \frac{F_2}{F_1} \text{ dir.}$$

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1}{T} - 1} \text{ bağıntısı ile triptofan ve ANS arası uzaklık (R) hesaplanabilir. Burada } R_0 \text{ ANS için } 23.3 \text{ \AA} \text{ d\u00fcr}$$

(134). Değişik ANS derişimlerinde hesaplanan K değerleri ANS derişimine karşı grafiklenerek sıfıra ekstrapolasyonu ile limit değeri elde edildi.

II.2.14. Plazma zarlarının ayrılması (135) :

B veya T lenfositleri veya K-562 hücreleri buldukları ortam içinde santrifüj edildiler ve süpernatant atılarak çökelek halindeki hücreler, hacimlerinin 20 misli, 10 mM sodyum azid, 15 mM sodyum iodoasetat içeren 10 mM Tris-HCl pH 8 (Tris tamponu)'da tekrar süspansiyon haline getirildiler. Hücreler bu ortamda 5 dakika şişmeye bırakılıp, daha sonra teflon homogenizatör ile 8-10 kez homogenize edildiler.

Hücreler patlatılıp, homogenize edildikten hemen sonra hücre homogenatındaki çekirdekleri stabilize etmek için 0.1 hacim 30 mM $MgCl_2$ ve 100 mM NaCl eklendi. Bütünlüğünü koruyan hücreler ile çekirdekler 30 saniye süren 1000 x g'lik bir santrifügasyonla çöktürüldüler. Çökelek hacminin 4 misli 3 mM $MgCl_2$ ve 10 mM NaCl içeren Tris tamponunda tekrar süspansiyon haline getirilip 10 saniye 1000 x g'de tekrar santrifüj edildi. Süpernatantlar birleştirildi ve 2.5 ml'lik kısımlar halinde, 15 ml'lik sukrozun (% 30 luk w/w) 5 ml'lik (% 45 lik w/w) sukroz üzerine yayılmasıyla hazırlanmış

sukroz gradyeni üzerine Pasteur pipetiyle yayıldı. Gradyenler Sorval süper santrifüjde 4°C'da 7000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Plazma zarı ghost'ları hafif beyazımsı opak bir tabaka halinde % 30-45 interfazında gözlendi ve kalın bir lomber ponksiyon iğnesi ile alındı. Bu zarsal süspansiyon 10 mM azid içeren Tris tamponu ile 1:4 oranında dilüe edilip 5 dakika 7000 x g'de santrifüj edildi. Çökelek 2 ml Tris tamponunda süspansiyon haline getirilip 3 ml % 45 sukroz üzerine 7 ml % 30 sukroz yayılmasıyla hazırlanan (her ikisi de Tris tamponunda) gradyen üzerine yayılıp yukarıdaki gibi santrifüj edildi. % 30-45 interfazı alındı, yukarıdaki gibi santrifüjasyonla toplandı ve tekrar süspansiyon haline getirildi. Eritrosit Ghostları ise normal insan kanından Dodge ve arkadaşlarının (34) yöntemi ile hazırlanmıştı. -20°C de saklanan ghostlar 3 x 50 ml PBS ile yıkandı ve yaklaşık 2 mg/ml protein derişimine sulandırılarak kullanıldı.

II.2.15. Hücre zarındaki majör polipeptidlerin elektroforetik analizi (136) :

Stok solüsyonların formülleri, tamponlar ve jeller :

A- Stok solüsyonları :

Konsantre AkBis	10 x tampon (pH 7.4)
Akrilamid (40 g)	1.0 M Tris (40 ml)
Bis (1.5 g)	2.0 M sodyum asetat (10 ml)
H ₂ O ile 100 ml'e	0.2 M EDTA (10 ml)
	asetik asitle pH'yı 7.4'e H ₂ O ile 100 ml'e
20 % (w/w) SDS	
1.5 % (w/v) amonyum persulfat	
0.5 (v/v) TEMED	

B- Elektroforez tamponu (1 litre için),

10 x tampon (100 ml)
20 % SDS (50 ml)
H ₂ O (850 ml)

C- Jeller (10 ml'lik solüsyonda 5.6 % akrilamid),

Konsantre AkBis (1.4 ml)
10 x tampon (1.0 ml)
20 % SDS (0.5 ml)
H₂O (5.6 ml)
1.5 % amonyum persulfat (1.0 ml)
0.5 % TEMED (0.5 ml)

SDS'li poliakrilamide jel elektroforezi :

Stok solüsyonlar yukarıda belirtilen oranlarda ve sırada karıştırıldılar ve 10 cm uzunluğunda 7 mm dış çapındaki cam tüplere (daha önceden kromik asite batırılarak veya sıcak SDS'de yıkanarak temizlenmiş) döküldü. Her tüp 85 mm yüksekliğe kadar doldurulduktan sonra üzerlerine üst tabaka (overlay) olarak, 0.1 % SDS, 0.15 % amonyum persulfat ve 0.05 % TEMED karışımı konuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (aşağı yukarı 1 saat oda sıcaklığında) üst tabaka yıkandı ve yerine 0.5 ml elektroforez tamponu konuldu. Daha sonra jeller 12 saat beklemeye bırakıldı. Hücre süspansiyonları 40-50 µg protein/100 µl olacak şekilde ayarlanıp, 10 µl 20 % SDS, 20 µl 400 mM DTT (dithiothreitol), 20 µl 10 mM EDTA, 10 µl 0.1 % bromfenol blue ve 40 µl 45 % sukroz olacak şekilde karıştırılıp 200 µl'ye tamamlandı. Disülfid bağlarının kopmasını temin etmek için karışımlar 37^o C'da 15 dakika inkübe edildiler. Her karışım birer jel üzerine uygulandı. Her elektrod tankına 400 ml tampon konuldu ve elektroforeze 7-8 V/cm ve akım 8 mA/tüp olacak şekilde ortalama 2 saatlik bir süre devam edildi. Öncü boyanın yeri çini mürekkebi ile işaretlendi.

II.2.16. SDS li, poliakrilamid jellerin, H³ Concanavalin A ile işaretlenmesi :

% 25 isopropil alkol ve % 10 asetik asit ile tesbit edildikten sonra üç kez hacimlerinin 3 katı PBS ile dengelendiler. PBS içinde Ca⁺⁺, Mn⁺⁺ ve

125 γ /cc ^3H Con A içeren 10 ml çözelti ile 1 saat inkübe edildiler ve daha sonra % 10 asetik asit ile yıkandılar. Yıkama, alınan örneklerde radyo-aktivite ölçümleri 100 sbd nin altına düşünceye dek sürdürüldü. Daha sonra jeller yaklaşık 1,5 mm lik kesitlere bölündü ve jel parçaları Bray içinde sayıldı.

I I I . B U L G U L A R

III.1. LENFOSİT İZOLASYONU :

İnsan kanından, B ve T lenfositlerinin izolasyonunda, altı değişik tip tampon, hücrelerin en az agglutinasyon yapması, hücre morfolojisinin en uygun şekilde korunması ve rozet oluşturmadaki verim açısından denendi. Tablo 2'de görüldüğü gibi, en az agglutinasyon yapma ve hücre morfolojisinin en uygun şekilde korunması yönünden, % 0.5 BSA içeren PBS tercih edildi. Rozet oluşmasındaki verim açısından ise % 25 AB serumu içeren Dulbecco'nun PBS'si en uygun tampon olarak belirlendi (Tablo II).

Kan alındıktan sonra lökositlerin eritrosit kümesinden ayrılmasında dekstran ve metil selüloz karşılaştırıldığında metil selülozun daha yüksek verimde lökosit ayrılmasını sağladığı saptandı (Tablo III).

Altı değişik tip Ficoll-Hypaque (F.H.) yönteminin uygulanması sonucunda, ilk Ficoll kademesinde, en yüksek mononükleer hücre elde edilmesi ve granülosit kontaminasyonun en az olması yönünden F.H.3., rozetlerin ayrılmasındaki verim yönünden ise F.H.6. en uygun Ficoll gradyeni tipleri olarak belirlendiler (Tablo IV).

İki değişik tip T rozet yöntemi karşılaştırıldı (Tablo V). Bach'a göre modifiye edilmiş olan T-rozet yöntemi verim yönünden daha değerli bulunarak tercih edildi.

TABLO II : TAMPON TIPLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.

	EN AZ AGGLUTİNASYON YAPMA YÖNÜNDEN	HÜCRE MORFOLOJİSİNİN EN UYGUN ŞEKİLDE KORUNMASI YÖNÜNDEN	ROZET OLUŞMASINDAKİ VERİM AÇISINDAN
HBSS	Orta	Orta	İyi
PBS	İyi	Orta	Orta
Dulbecco'nun PBS'i	Orta	Orta	İyi
% 0.5 BSA içeren PBS	En iyi	En iyi	İyi
% 2 FCS içeren DPBS	Orta	İyi	İyi
% 25 AB serumu içeren Dulbecco PBS'i	Orta	İyi	En iyi

Kısaltmalar : HBSS : Hank'ın dengeli tuz çözeltisi
PBS : Fosfat tamponlu serum fizyolojik
BSA : Sığır serum albumini
FCS : Fetal dana serumu

TABLO III : HÜCRELERİN 1 x g 'de ÇÖKMESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.

	% 0.1 metil selüloz içeren Jondall'ın Ficoll-Hypaque karışımına yayılıp, 30 dakika, 4°C'da santrifüj edildikten sonra Ficoll üstü tabakası
5 cc kan + 0.5 cc EDTA % 2 + 1 cc % 6 dekstran	12.75 x 10 ⁶ lökosit : % 88'i mononükleer, % 12'si granülosit ve yaygın trombosit
5 cc kan + 0.5 cc EDTA % 2 + 1.25 cc % 1 metil selüloz	17.70 x 10 ⁶ lökosit : % 90'ı mononükleer, % 10'u granülosit, trombositler nisbeten daha seyrek.

TABLO IV : FICOLL GRADYENİ TIPLERİ.

KULLANILAN FICOLL GRADYENİ	HAZIRLANIŞI VE METOD	İLK FICOLL SONUCU DURUM	HÜCRE SAYISI YÖNÜNDE VERİM	ROZETLERİN AYRILMASIN-DAKI VERİM
Bobrove ve arkadaşları'nın Ficoll gradyeni (143) : F.H.1	15 kısım % 25 lik (% 75 Hypaque M) ve 24 kısım % 9 luk Ficoll (su içinde) karıştırılır. 20°C'da, 35 dakika, 400 x g'de santrifüj edilir.	% 70 mononükleer hücre, % 30 granülosit	Orta	Orta
Jondall'dan modifiye (144): F.H.2 (isopaque yerine hypaque kullanıldı)	40 kısım hypaque solusyonu (20 ml hypaque + 25 ml su), 96 kısım % 9 luk Ficoll (su içinde) ile karıştırılır. 4°C'da, 850 x g'de, 30 dakika santrifüj edilir.	% 65 mononükleer hücre, % 35 granülosit	İyi	Orta (ara tabakada önemli ölçüde rozet kalıyor)
F.H.3. (% 0.1 metil selüloz içeren F.H.2)	Aynen (F.H.2) gibi hazırlanıp içine 1/10 oranında % 1 metil selüloz katılır. 4°C'da, 850 x g'de, 30 dakika santrifüj edilir.	% 98 mononükleer hücre, % 2 granülosit	En iyi	İyi
F.H.4. Böyum'dan modifiye (138) (isopaque yerine hypaque kullanıldı)	10 kısım % 32.8 lik hypaque ile 24 kısım % 8 lik Ficoll solusyonu karıştırılır. 4°C'da, 400 x g'de, 40 dakika santrifüj edilir.	% 67 mononükleer hücre, % 32 granülosit, % 1 eritrosit	İyi	İyi
F.H.5 (aynen F.H.4 gibi)	Aynen (F.H.4) deki gibi hazırlanır. 20°C'da, 800 x g'de, 15 dakika santrifüj edilir.	" "	İyi	İyi
F.H.6 (% 0.1 metil selüloz içeren F.H.4)	Aynen (F.H.4) gibi hazırlanıp içine 1/10 oranında metil selüloz katılır. 20°C'da, 800 x g'de 15 dakika santrifüj edilir.	% 85 mononükleer hücre, % 15 granülosit	İyi	En iyi

TABLO V : T-ROZET YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.

Bentwich'e göre (16)	Bach'a göre modifiye edilmiş (15)
1. Millilitrede 5×10^6 hücre içeren lenfosit süspansiyonu alınır.	1. % 0.5 BSA içeren PBS içindeki lenfosit süspansiyonu alınır.
2. Eşit miktarda % 0.5 lik koyun eritrositleri (HBSS) içinde ve 1/10 oranda, ısı ile inaktive edilmiş ve koyun eritrositleriyle karşılaştırılmış AB serumu ile karıştırılır.	2. 30 misli kadar, % 25 AB serumu içeren DPBS'i içindeki koyun eritrositleri ile karıştırılır. (AB serumu ısı ile inaktive edilmiş ve koyun eritrositleri ile karşılaştırılmıştır).
3. 37°C 'da 5 dakika inkübe edilir.	3. 37°C 'da 30 dakika inkübe edilir.
4. 22°C 'da $200 \times \text{g}$ 'de 5 dakika santrifüj edilir.	4. $200 \times \text{g}$ 'de 5 dakika santrifüj edilir.
5. 4°C 'da 1 saat inkübe edilir.	5. 4°C 'da 2 saat inkübe edilir.
6. Pellet hafifçe kaldırılır.	6. Pellet hafifçe kaldırılır.
7. Neticede rozet yapan lenfositler % 40-60 arasında değişir.	7. Neticede rozet yapan lenfositler % 60-80 arasında değişir.

III.1.1. Lenfosit izolasyonunda saptanan yöntem :

- 1) Periferik insan kanı 1/10 oranında % 2'lik EDTA ile alınıp % 1 lik metil selüloz ile karıştırılır ve 1 saat inkübe edilir.
- 2) Süpermatan alınıp % 0.5 BSA'lı PBS'de yıkanarak, aynı ortam içinde, 3 ml hacimde 1 ml F.H.3. üzerine yayılır, bu arada hücre süspansiyonunun içine 0.3 ml ADP solüsyonu konur.
- 3) 4^o C'da, 850 g'de, 30 dakika santrifüj edilir.
- 4) Ara tabaka (Interface) dikkatle alınır ve % 0.5 BSA'lı PBS'de yıkanır (1 ml kandan yaklaşık 2×10^6 , % 98 saflıkta mononükleer hücre elde edilir.
- 5) Hücreler yaklaşık 30 misli (% 25 AB insan serumu içeren Dulbecco'-nun PBS'si içinde bulunan) koyun eritrositleri ile karıştırılır.
- 6) 37^o C'da, 30 dakika inkübe edilir.
- 7) 20^o C'da, 200 x g'de, 5 dakika santrifüj edilir.
- 8) 4^o C'da, 2 saat inkübe edilir.
- 9) Oluşan rozetler çok hafifçe kaldırılır, 2 misli % 0.5 BSA'lı PBS ile sulandırılır ve 1/3 oranındaki F.H.6. üzerine dikkatle yayılır.
- 10) 20^o C'da, 800 x g'de, 15 dakika santrifüj edilir.
- 11) Ara tabaka alınır. Burası yaklaşık % 75 B lenfositlerdir. Bir kez daha rozet yapılıp ve Ficoll üzerine yayılırsa ara tabakadaki B lenfosit oranı % 90-95'e çıkar.
- 12) Çökelti ise, koyun eritrositlerini, rozet yaptıkları T lenfositlerinden ayırmak için 37^o C'da 1/10 EDTA ile 15 dakika inkübe edilir. Sonra koyun eritrositleri hipotonik şoklarla patlatılarak, saf T lenfositleri elde edilir.

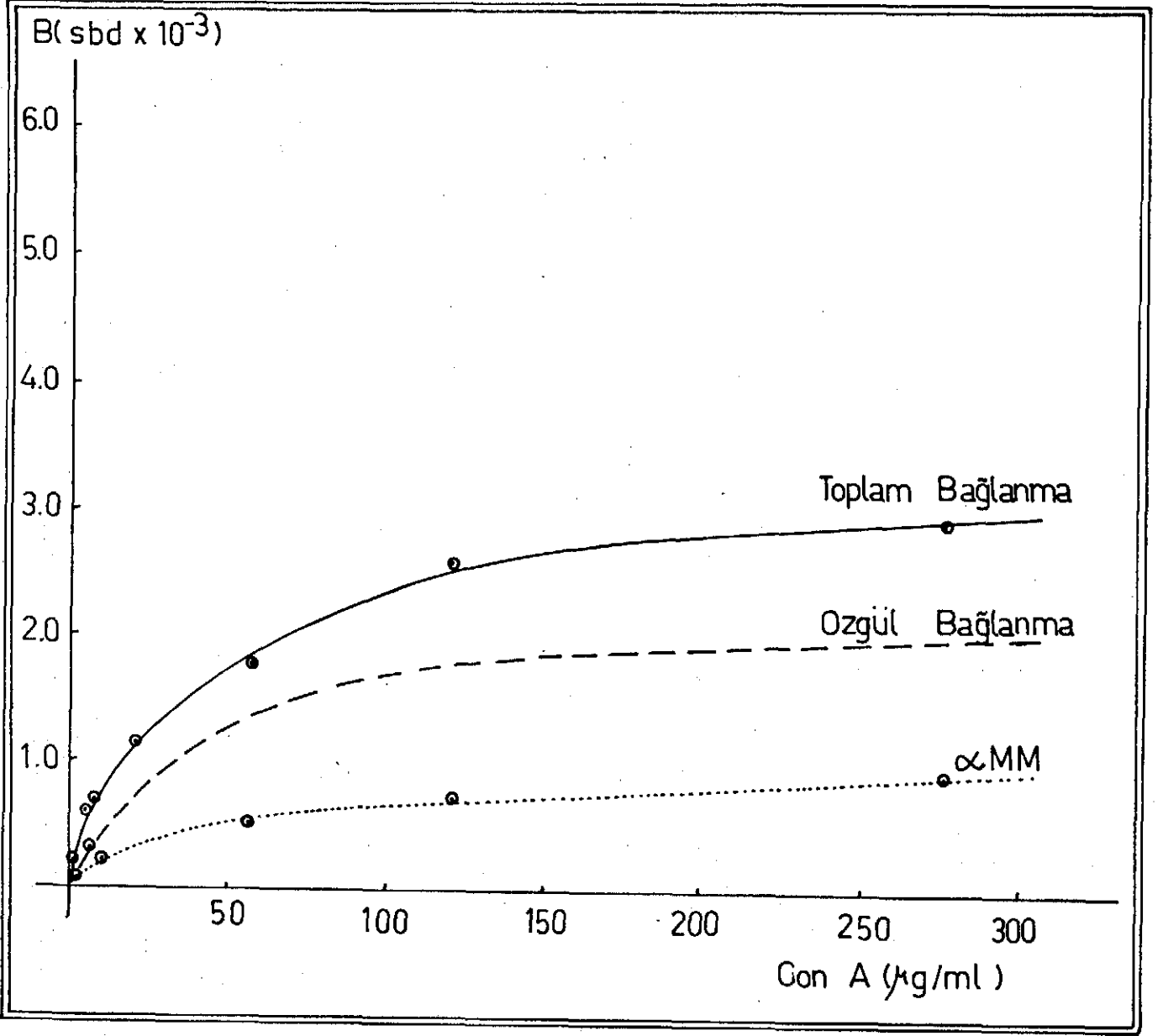
13) Birinci kademedede oluşan çökelti 3 misli % 0.5 BSA'lı PBS içinde 1/5 oranında % 6 dekstranla karıştırılıp 37°C'da 1 saat inkübe edilir ve süpernatant alınıp F.H.3. 'e yayılır ve çökelti hipotonik şoklara tabi tutulursa, eritrositler patlatılarak granülositler elde edilebilir.

III.2. ³H-CONCAVALİN İLE, HÜCRELERDE CON A RESEPTÖR SAYILARININ VE AFFİNİTELERİNİN İNCELENMESİ :

T lenfositlerinin, Concanavalin A bağlama eğrisi Şekil 3'de, Scatchard doğrusu ise Şekil 4'de görülmektedir. Bağlanma eğrisinde toplam bağlanma ile, QMM içeren kontrollerin verdiği bağlanma ayrı ayrı gösterilmiştir. Bunların arasındaki fark özgül bağlanmayı vermektedir.

Ayrı ayrı yapılan 6 deneyin Scatchard analizlerinin incelenmesi sonucunda K_a ve N ortalamaları sırasıyla $8.14 \pm 0.69 \times 10^6 M^{-1}$ ve $2.84 \pm 0.51 \times 10^6$ reseptör/hücre bulunmuştur (Şekil 3,4).

İnsan periferik B lenfositlerinin Concanavalin A bağlama eğrisi Şekil 5'te, Scatchard doğrusu ise Şekil 6'da görülmektedir. Gene burada da, bağlanma eğrisinde toplam bağlanma ile, QMM içeren kontrollerin verdiği bağlanma ayrı ayrı gösterilmiş ve bunların arasındaki fark özgül bağlanma olarak alınmıştır. Şekil 6'dan görüleceği gibi, bağlanma 2 fazlıdır. Ayrı ayrı yapılan 7 deneyin Scatchard analizlerinin incelenmesi sonucunda hücre başına düşük afiniteli, ($K_{a1} = 1.28 \pm 0.36 \times 10^6 M^{-1}$), $4.55 \pm 1.35 \times 10^6$ reseptör ve yüksek afiniteli ($K_{a2} = 22.33 \pm 4.28 \times 10^6 M^{-1}$), $0.61 \pm 0.16 \times 10^6$ reseptör bulunmuştur.



ŞEKİL 3 : T lenfositleri için bağlanma eğrisi.

Absis : ³H-Con A (µg/ml)

Ordinat : Bağlanan ³H-Con A (sbd x 10⁻³)

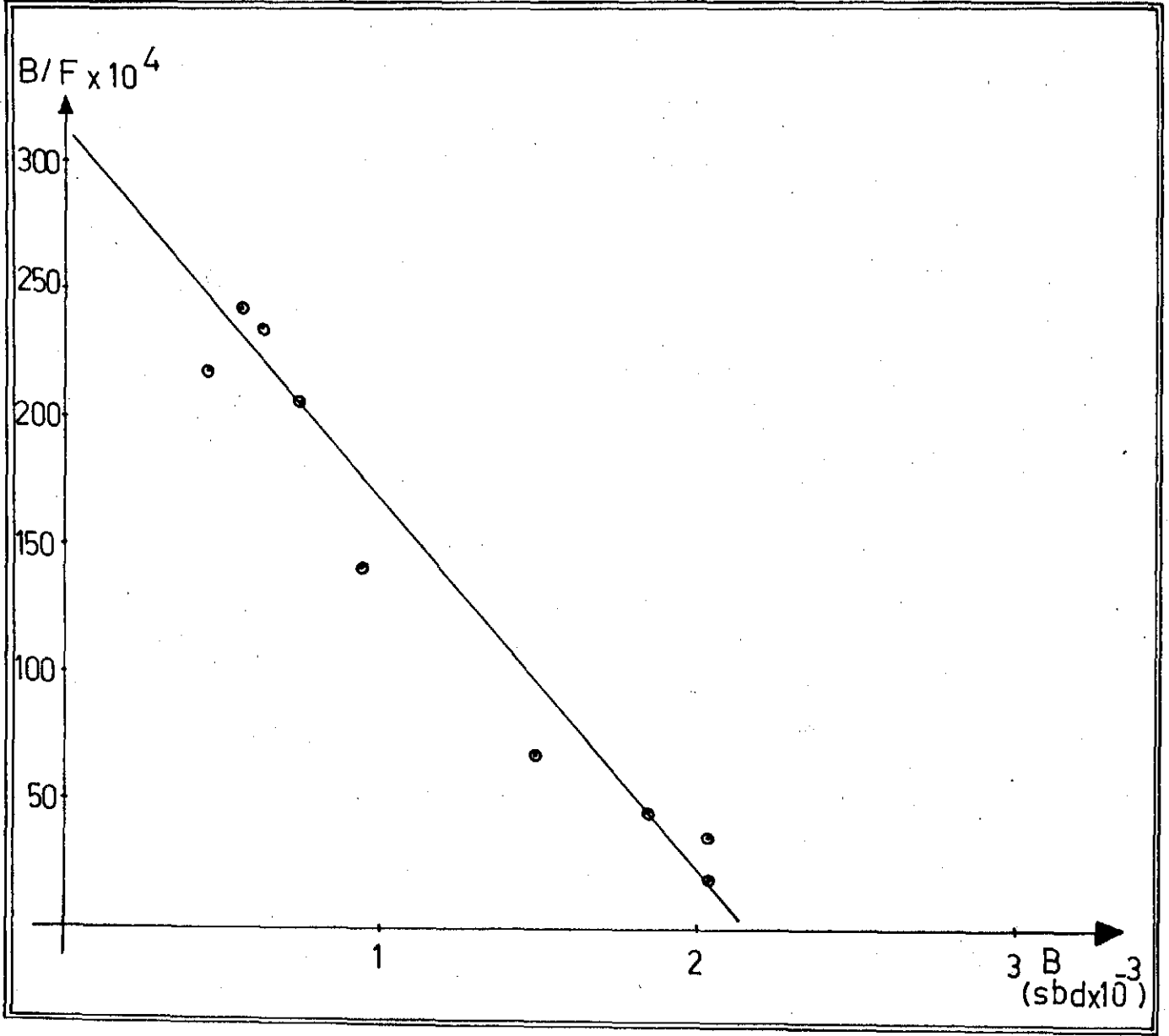
Hücre : Normal insan T lenfositleri (1 x 10⁶)

³H-Con A : 1-275 µg/ml

αMM (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

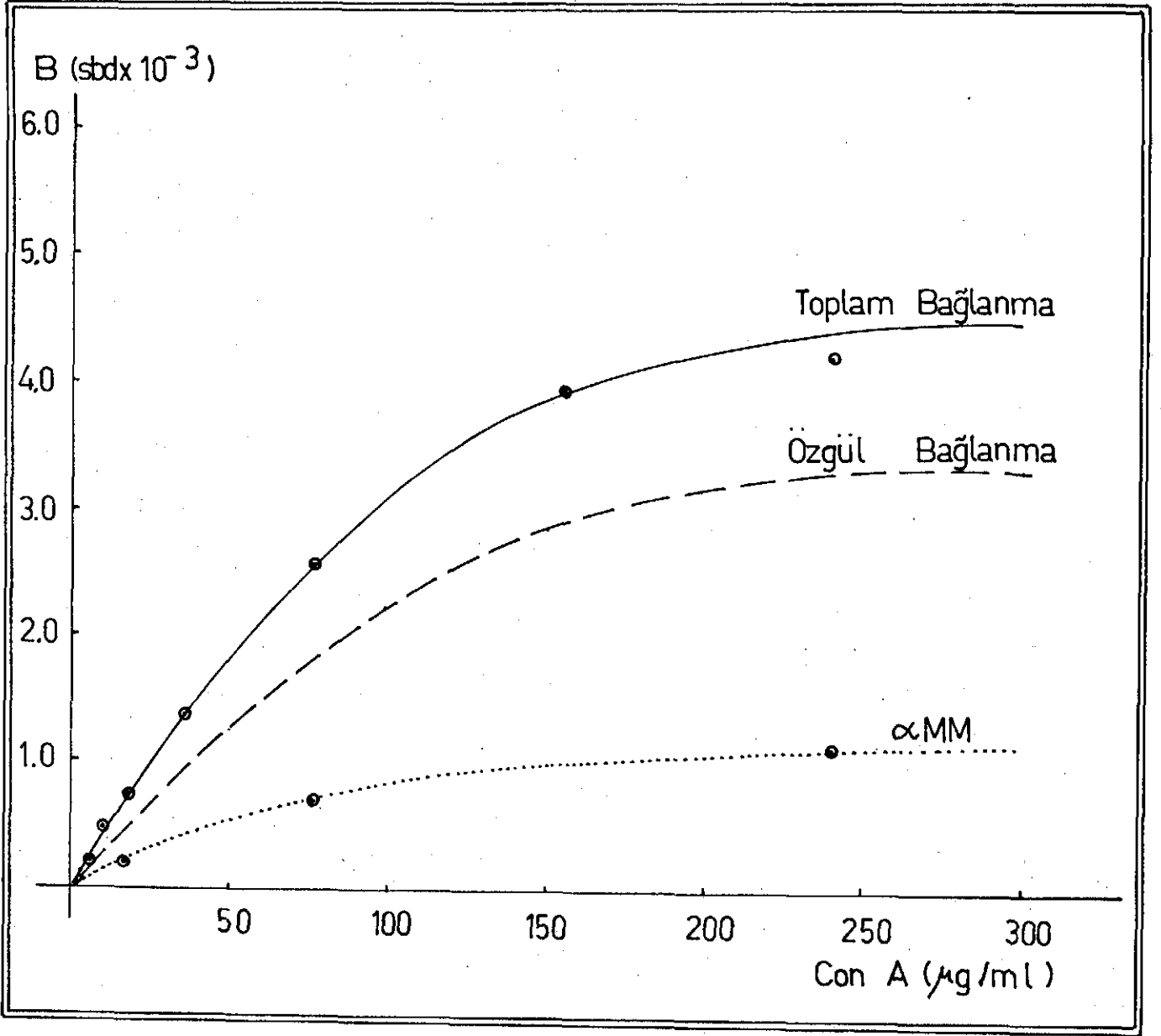
İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 4 : İnsan T lenfositlerinin Scatchard doğrusu.

Absis : Bağlı $H\text{-Con A}$ (sbd x 10^{-3})

Ordinat : Bağlı/serbest $H\text{-Con A}$



ŞEKİL 5 : B lenfositlerinin bağlanma eğrisi.

Absis : $^3\text{H-Con A}$ ($\mu\text{g/ml}$)

Ordinat : Bağlanan $^3\text{H-Con A}$ ($\text{sbd} \times 10^{-3}$)

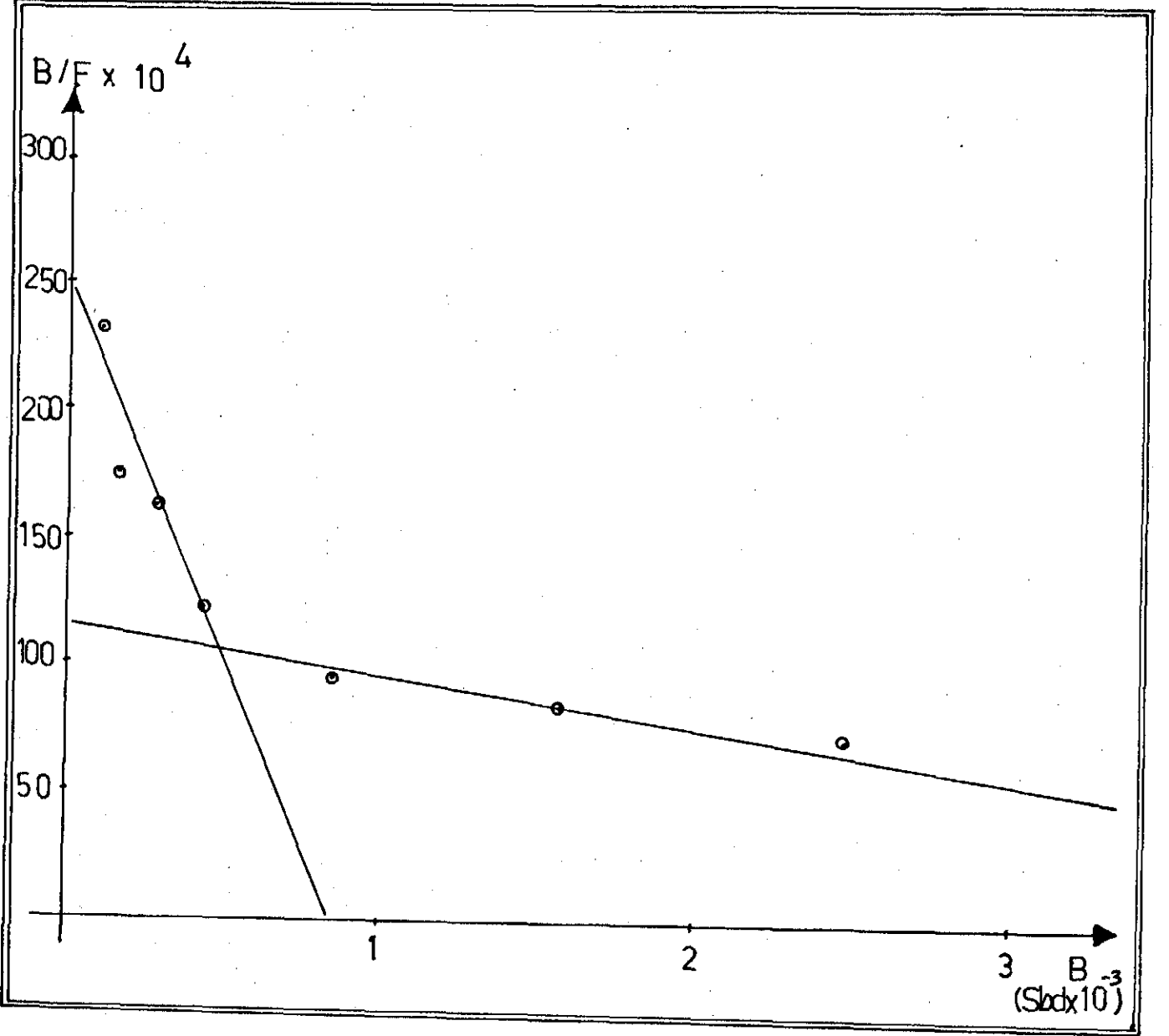
Hücre : Periferik insan B lenfositleri ($1 \times 10^6/\text{ml}$)

$^3\text{H Con A}$: 1-240 $\mu\text{g/ml}$

αMM kontrol : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika

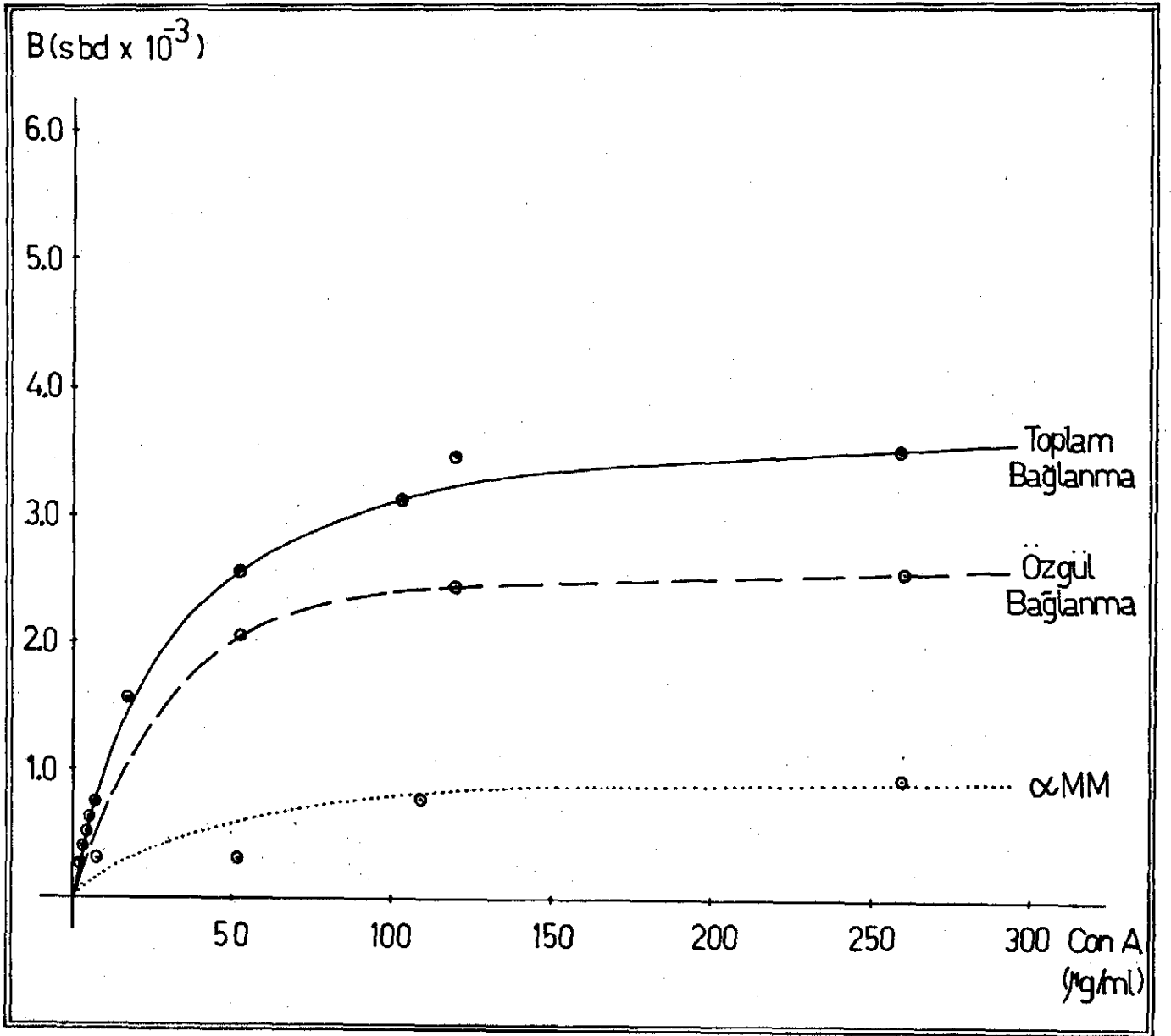


ŞEKİL 6 : B lenfositlerinin Scatchard doğrusu.

Absis : Bağlı ³H-Con A (sbd x 10⁻³)

Ordinat : Bağlı/serbest ³H-Con A

K-562 hücrelerinin Con A bağlanma eğrisi Şekil 7'de, Scatchard doğrusu ise Şekil 8'de görülmektedir. Burada da, bağlanma eğrisinde toplam bağlanma ile, oMM içeren kontrolların verdiği bağlanma ayrı ayrı gösterilmiş ve bunların arasındaki fark özgül bağlanma olarak alınmıştır. Şekil 8'den görüleceği gibi, bağlanma burada da 2 fazlıdır. Ayrı ayrı yapılan 3 deneyin Scatchard analizlerinin incelenmesi sonucunda hücre başına düşük afiniteli, ($Ka_1 = 2.12 \pm 0.98 \times 10^6 M^{-1}$), $5.90 \pm 1.45 \times 10^6$ reseptör; ikinci fazda ise yüksek afiniteli ($Ka_2 = 31.11 \pm 4.34 \times 10^6 M^{-1}$), $0.96 \pm 0.12 \times 10^6$ reseptör bulunmuştur.



ŞEKİL 7 : K-562 hücrelerinin bağlanma eğrisi.

Absis : $^3\text{H-Con A}$ ($\mu\text{g/ml}$)

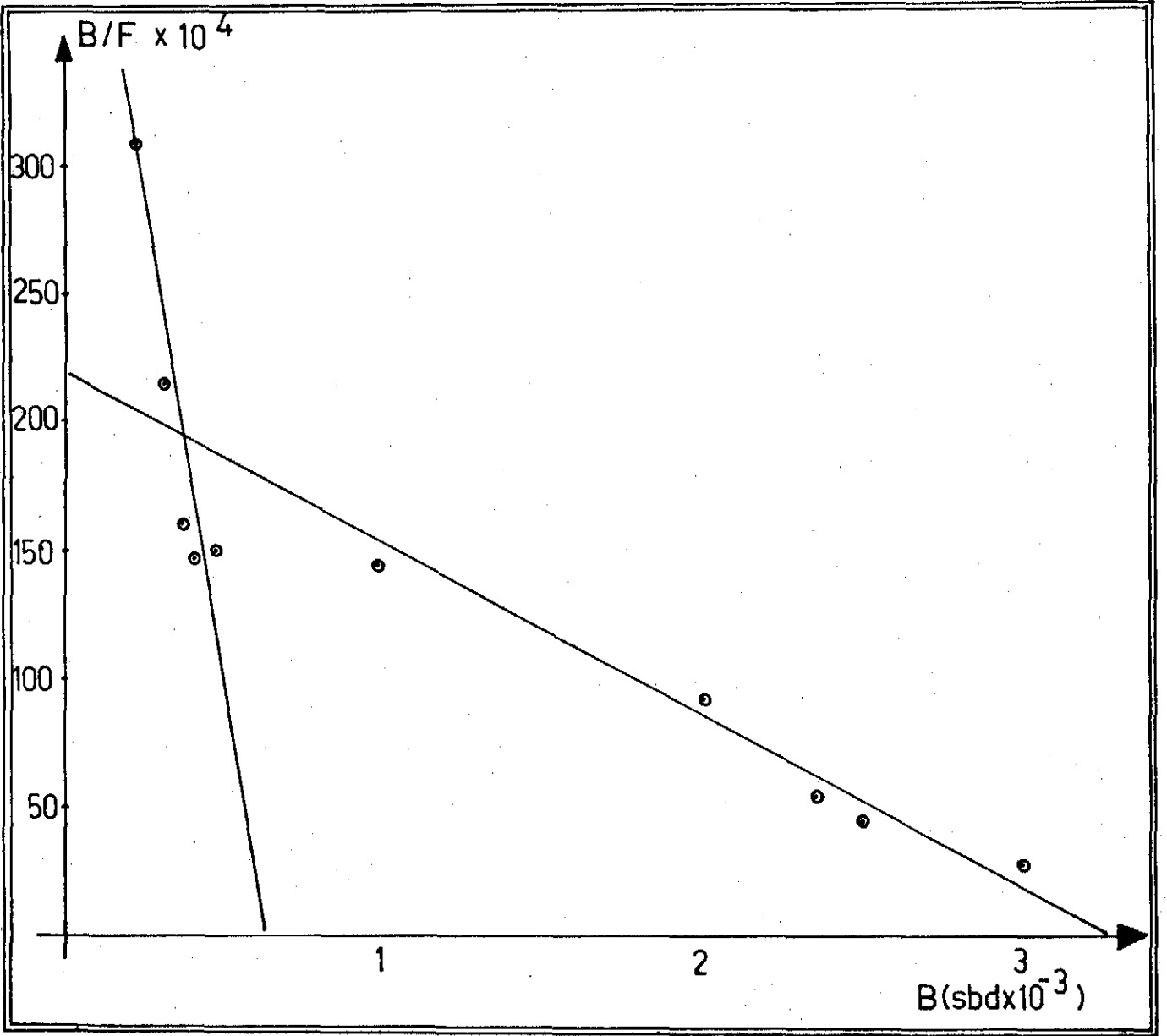
Ordinat : Bağlanan $^3\text{H-Con A}$ ($\text{sbd} \times 10^{-3}$)

Hücre : K-562 hücreleri (1-260 $\mu\text{g/ml}$)

αMM (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı: 60 dakika

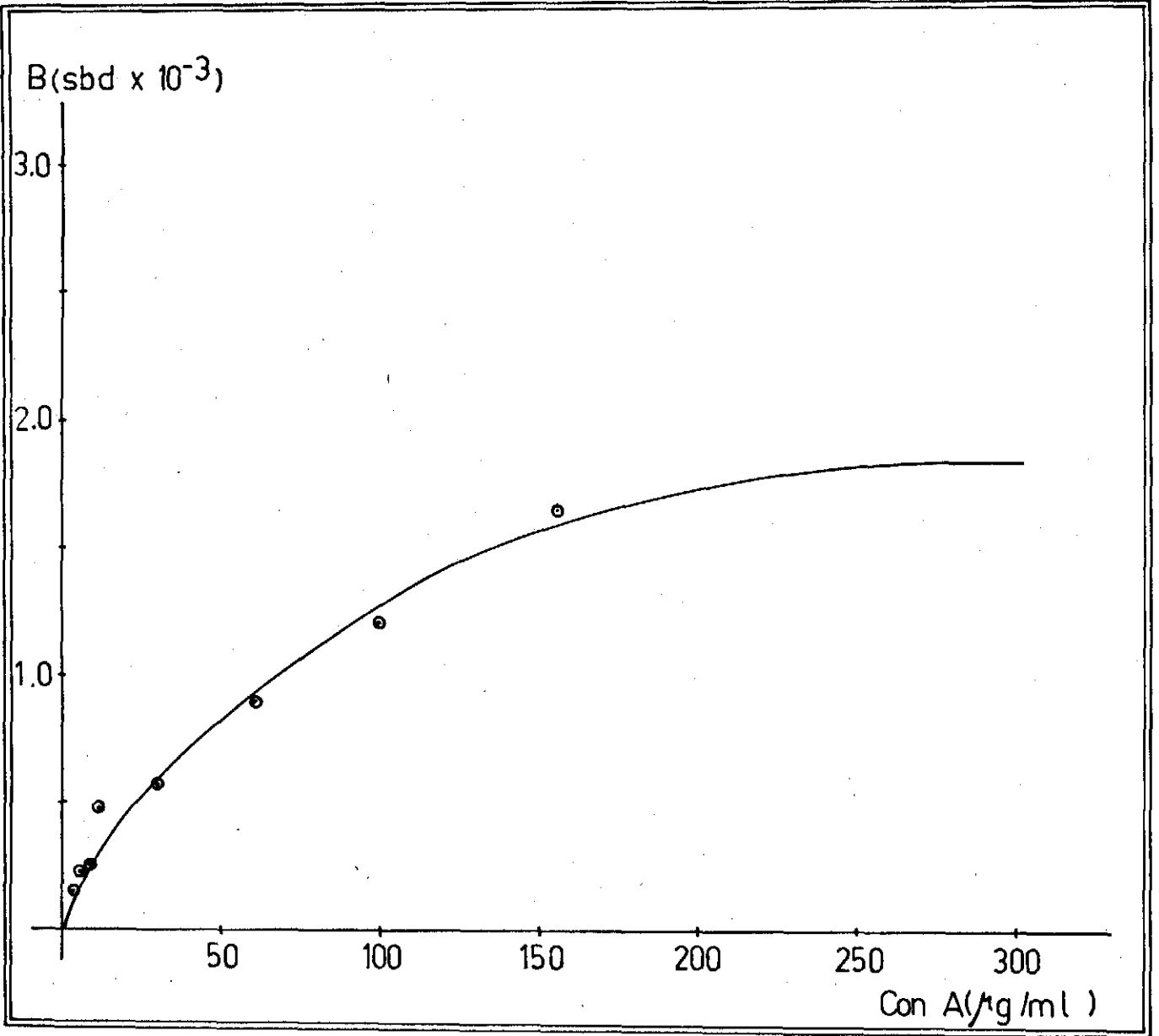


ŞEKİL 8 : K-562 hücrelerinin Scatchard doğrusu.

Absis : Bağlı $^3\text{H-Con A}$ ($\text{sbd} \times 10^{-3}$)

Ordinat : Bağlı/serbest $^3\text{H-Con A}$

İnsan eritrositlerinin Con A bağlanma eğrisi Şekil 9'da, Scatchard doğrusu ise Şekil 10'da görülmektedir. Bağlanma eğrisinde yalnızca özgül bağlanma gösterilmiştir. Şekil 10 da, Scatchard doğrusundan görüleceği üzere bağlanma burada da 2 fazlıdır. Yapılan deneyde, düşük afiniteli ($K_{a1} = 0.74 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) 8.10×10^6 reseptör/hücre ve yüksek afiniteli ($K_{a2} = 29.47 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), 1.73×10^6 reseptör/hücre bulunmuştur.



ŞEKİL 9 : İnsan eritrositlerinin Con A bağlanma eğrisi.

Absis : ³H-Con A (µg/ml)

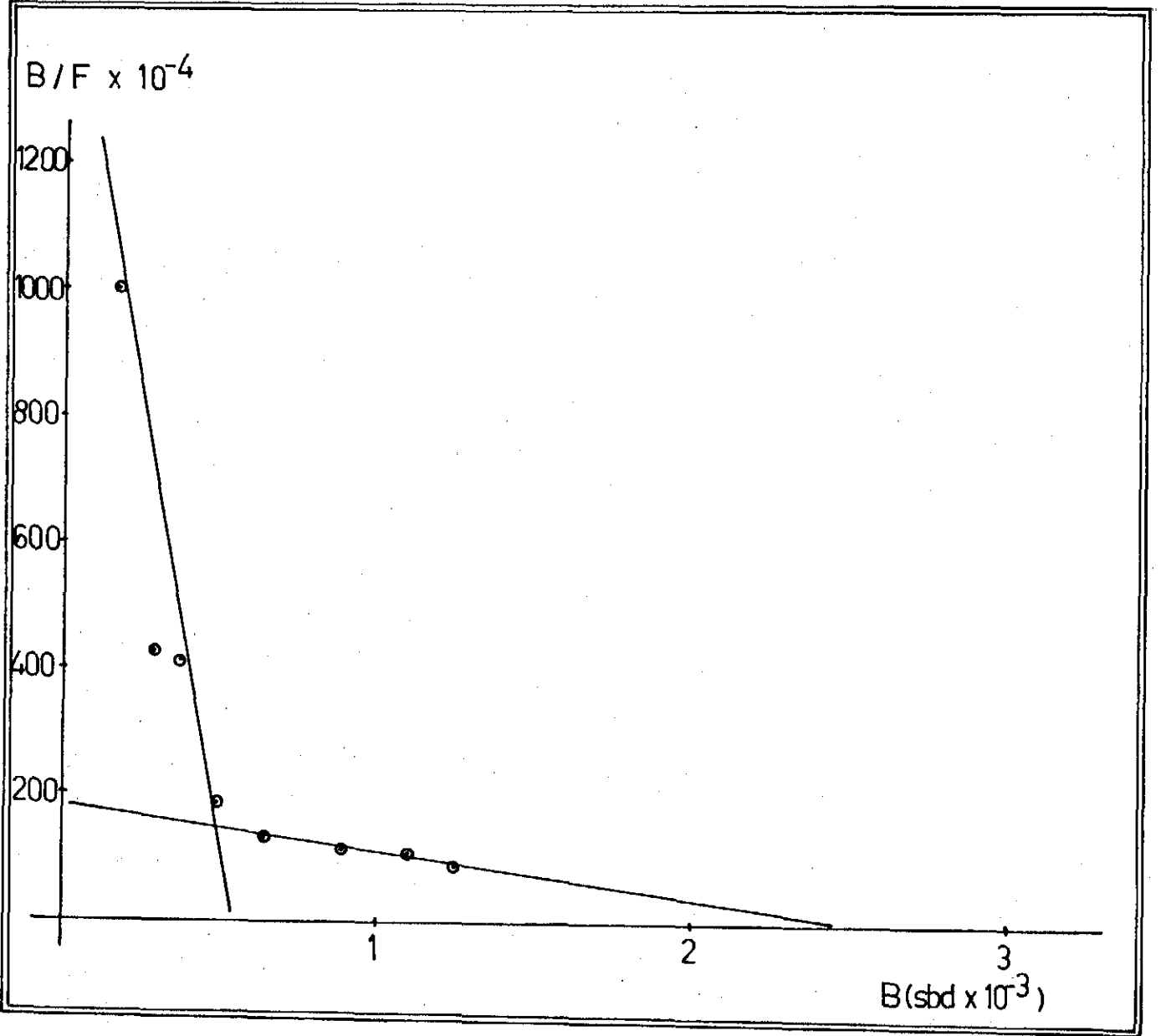
Ordinat : Bağlanan ³H-Con A (sbd x 10⁻³)

Hücre : İnsan eritrositleri (1.8 x 10⁶/ml)

³H-Con A : 1-160 µg/ml

αMM (kontrol) : 60 mM

İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 10 : İnsan eritrositlerinin Scatchard doğrusu.

Absis : Bağlı 3 H-Con A ($\text{sbd} \times 10^3$)

Ordinat : Bağlı/serbest 3 H-Con A

Tablo VI'da, periferik insan T lenfositleri, B lenfositleri, K-562 hücreleri ve insan eritrositlerinin, Con A reseptör sayı ve affinitelerinin genel dökümü görülmektedir.

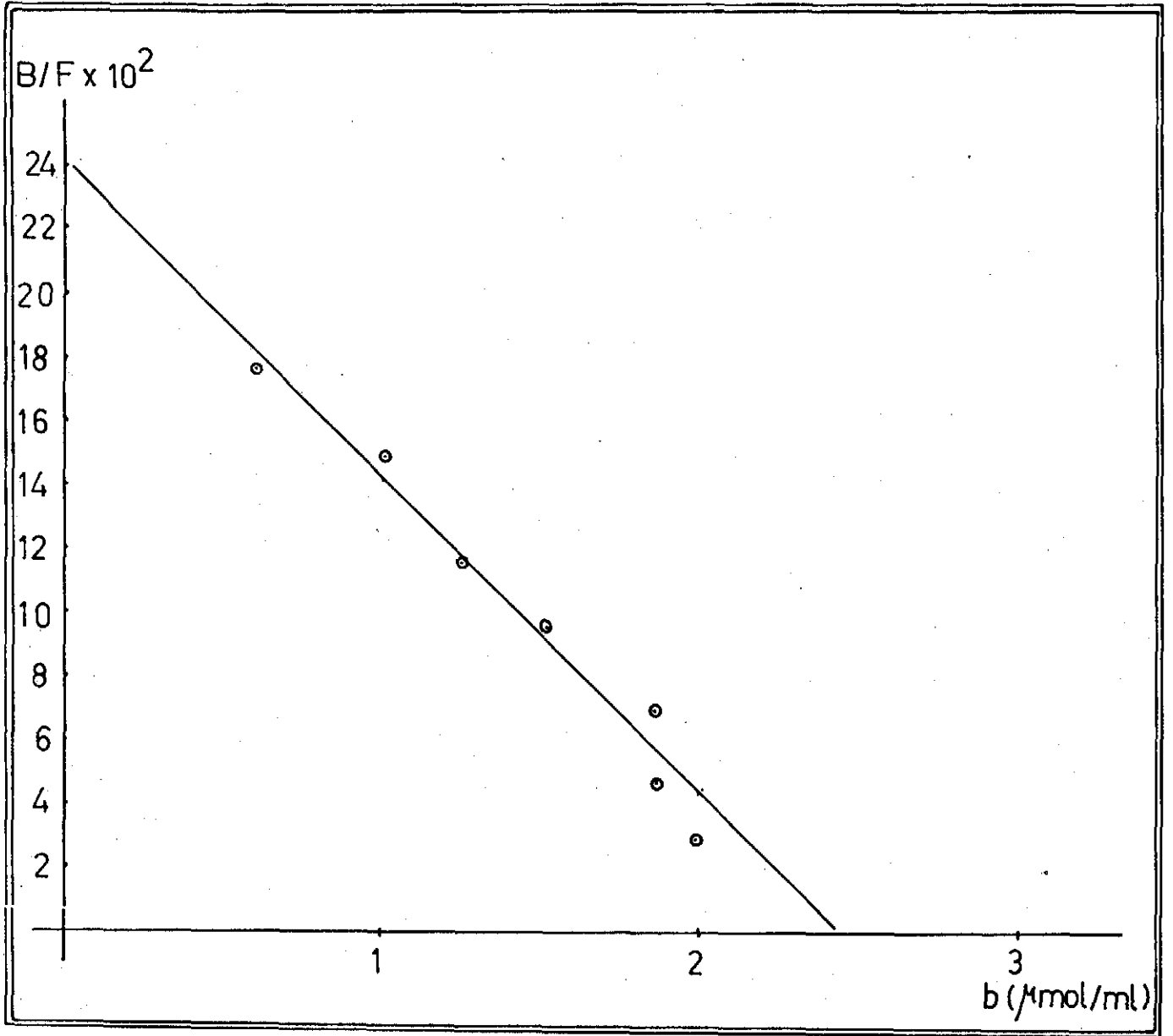
TABLO VI : CON A RESEPTÖR AFİNİTE VE SAYILARININ KARŞILAŞTIRILMASI.

	$10^{-6} \times K_a$ (M^{-1})	$10^{-6} \times N$ (Reseptör/hücre)
T lenfositleri n = 6	$K_a = 8.14 \pm 0.69$	$N = 2.84 \pm 0.51$
B lenfositleri n = 7	$K_{a1} = 1.28 \pm 0.36$ $K_{a2} = 22.33 \pm 4.28$	$N_1 = 4.55 \pm 1.35$ $N_2 = 0.61 \pm 0.16$
K-562 hücreleri n = 3	$K_{a1} = 2.12 \pm 0.98$ $K_{a2} = 31.11 \pm 4.34$	$N_1 = 5.90 \pm 1.45$ $N_2 = 0.96 \pm 0.12$
Eritrositler n = 1	$K_{a1} = 0.74$ $K_{a2} = 29.47$	$N_1 = 8.10$ $N_2 = 1.73$

Tablo VI'nın incelenmesi ile görüleceği gibi T lenfositleri yaklaşık tek tip ve üç milyon adet reseptör içermektedir. İncelenen diğer hücre türlerinde ise en az iki farklı reseptör bulunmuştur. Yüksek afiniteli ve düşük afiniteli olarak tanımlanan bu reseptörler afiniteleri ve sayıları yönünden karşılaştırıldığında K-562 hücrelerinin gerek matür eritrositlerinden gerekse T ve B lenfositlerinden farklı olduğu görülmektedir.

III.3. HÜCRELERDE, ANS-BAĞLANMA YERLERİNİN SAYI VE AFİNİTELERİNİN İNCELENMESİ :

Şekil 11'de K-562 hücrelerinin ANS bağlanma doğrusu görülmektedir. Aynı yapılan 5 deneyin ortalaması olarak $K_a = 10.72 \pm 0.76 \times 10^4 M^{-1}$; bağlanma yeri sayısı ise $N = 13.95 \pm 2.16 \times 10^8$ /hücre, bulunmuştur.

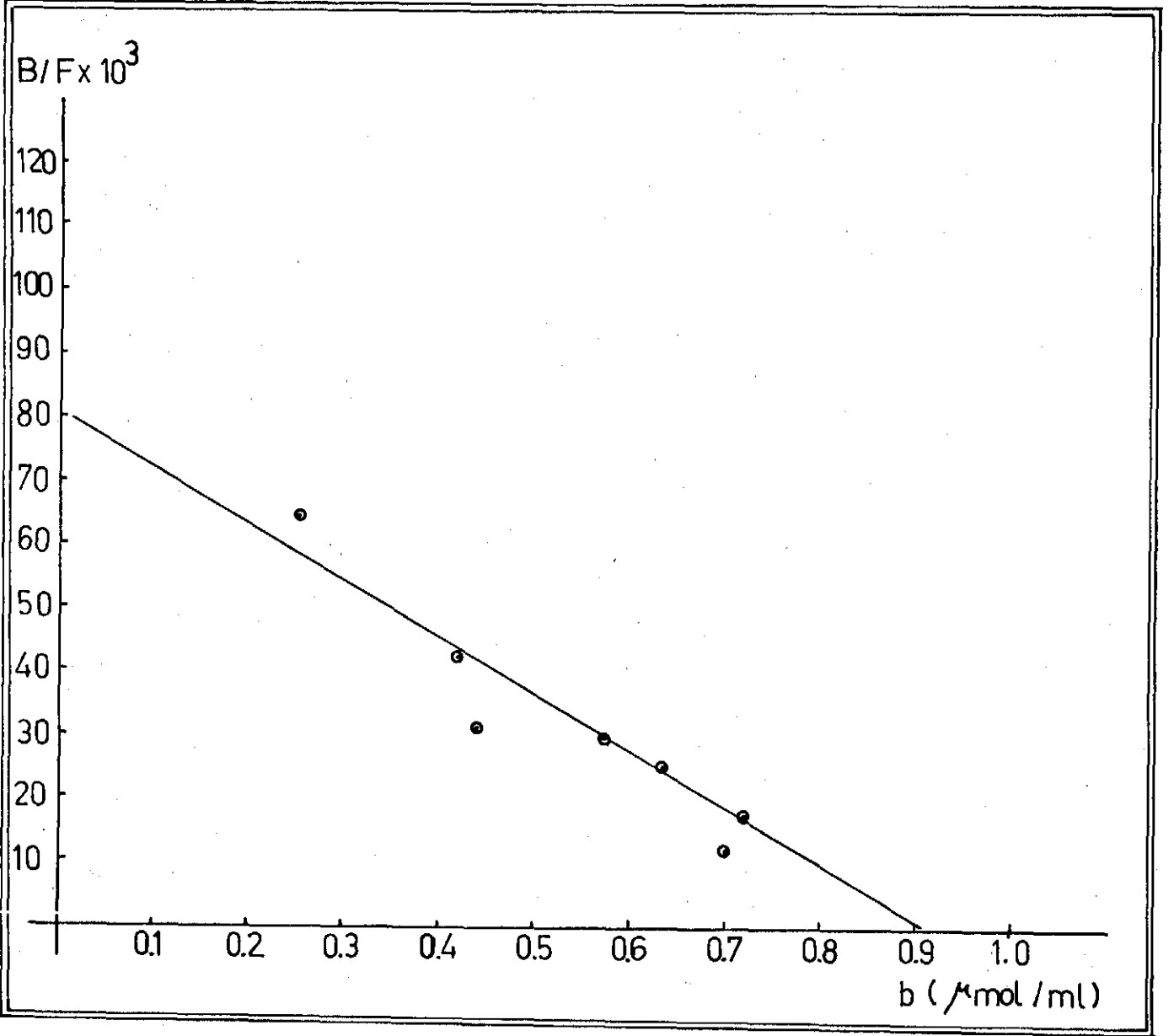


ŞEKİL 11 : K-562 hücrelerinin ANS bağlaması.

Absis : Bağlanan ANS (μmol/ml)

Ordinat : Bağlı/serbest ANS

Şekil 12'de periferik insan B lenfositlerinin ANS bağlanma doğrusu gösterilmektedir. ANS nin bağlanma yeri ayrı ayrı yapılan 3 deneyde hücre başına $1.97 \pm 0.46 \times 10^8 M^{-1}$ ve bunun afinitesi de $K_a = 8.56 \pm 0.12 \times 10^4$ olarak bulunmuştur.

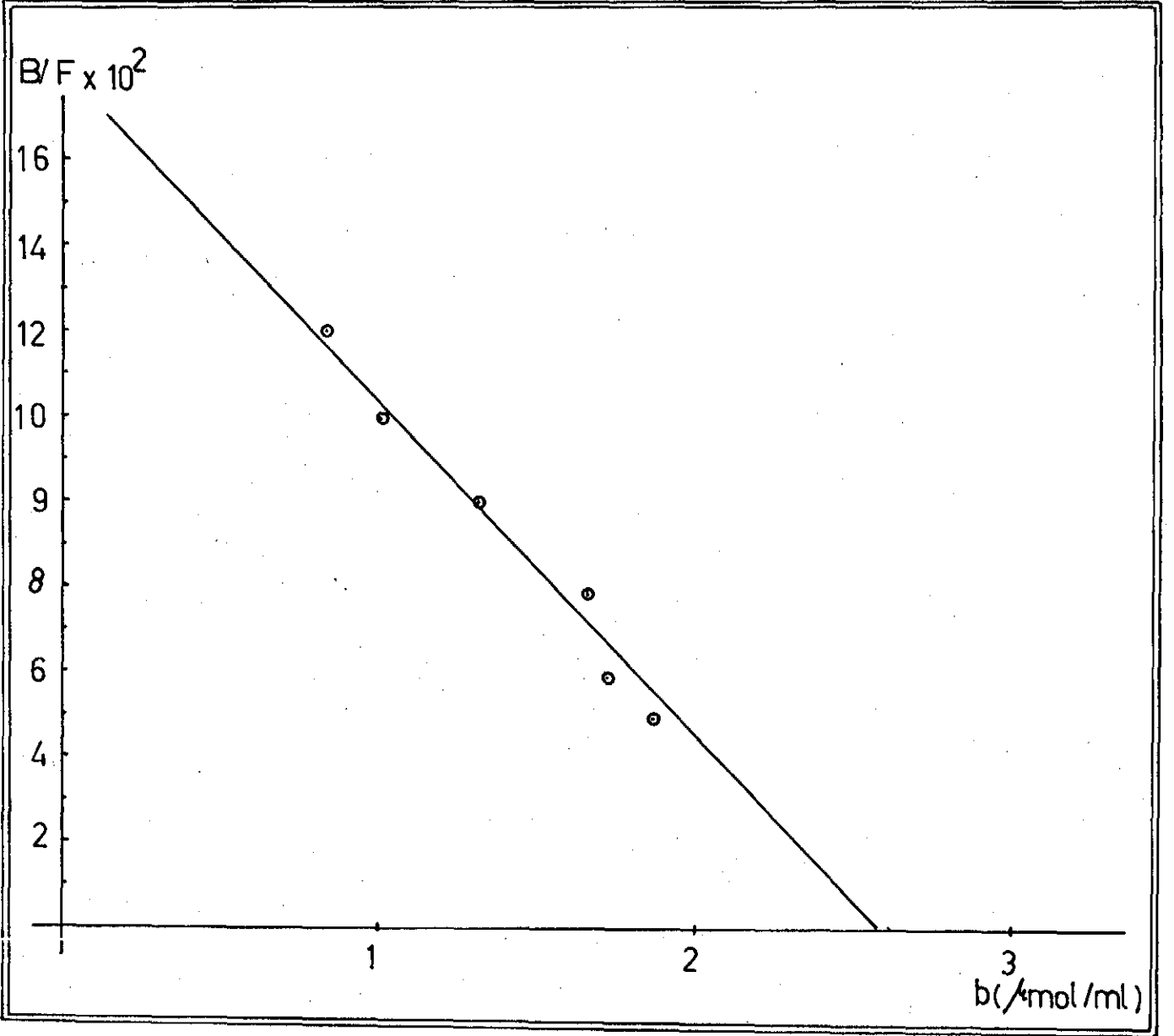


ŞEKİL 12 : Periferik insan B lenfositlerinin ANS bağlanması.

Absis : Bağlanan ANS (µmol/ml)

Ordinat : Bağlı/serbest ANS

Şekil 13'te, hemoglobin bulaşığı olmayan, PBS içindeki, eritrosit ghostları ile ANS nin bağlanma doğrusu gösterilmiştir. ANS nin eritrosit "ghost"larına bağlanma afinitesi $K_a = 6.25 \times 10^4$ olarak, ghost partikülü başına ANS bağlanma yeri ise 4.54×10^8 olarak bulunmuştur.



ŞEKİL 13 : Eritrosit "ghost"larının ANS bağlanması.

Absis : Bağlanan ANS (µmol/ml)

Ordinat : Bağlı/serbest ANS

TABLO VII : ANS BAĞLANMA YERLERİNİN AFİNİTE VE SAYILARININ KARŞILAŞTIRILMASI.

	$10^{-4} \times K_a$ (M^{-1})	$10^{-8} \times N$ (bağlanma yeri / hücre)*
K-562 hücreleri n = 5	10.72 ± 0.76	13.95 ± 2.16
B lenfositleri n = 3	8.56 ± 0.12	1.97 ± 0.46
Eritrosit 'ghost'ları n = 1	6.25	4.54

* : Eritrosit ghost'ları için bu değer 'ghost' vezikülü başına olarak hesaplanmıştır.

Periferik B insan lenfositleri, K-562 hücreleri ve insan eritrositlerinin ANS bağlanma sayı ve afiniteleri Tablo VII'de topluca görülmektedir. Hücre türleri arasındaki en önemli farkın bağlanan ANS sayısı açısından olduğu göze çarpmaktadır.

III.4. HÜCRELERDE ANS BAĞLANMA YERLERİ İLE TRİPTOFAN MOLEKÜLLERİ
ARASINDAKİ UZAKLIĞIN (r) NİN İNCELENMESİ

K-562 hücreleri ile 3 farklı ANS derişiminde yapılan 5 deney sonucunda, $r = 26.82 \pm 0.45 \text{ \AA}$ ve eritrosit "ghost"ları ile 3 farklı derişimde yapılan 2 deney sonucunda $r = 29.98 \pm 1.45 \text{ \AA}$ olarak bulunmuştur. B lenfositleri ile 3 farklı derişimde yapılan 3 deney sonucunda $r = 30.07 \pm 0.40 \text{ \AA}$ bulunmuştur. Bu değerler topluca, Tablo VIII'de gösterilmektedir. K-562 hücrelerinde triptofan uzaklığının yaklaşık 3.5 \AA daha az olduğu ve bu hücrelerin bu açıdan da B lenfositleri ve eritrositlerden farklı olduğu tablodan anlaşılmaktadır.

TABLO VIII : ANS BAĞLANMA YERİ VE TRİPTOFAN MOLEKÜLLERİ ARASINDAKİ
UZAKLIKLARIN KARŞILAŞTIRILMASI.

	Eritrosit 'Ghostları'	K-562 hücreleri	B lenfositleri
	n = 2	n = 5	n = 3
r (\AA)	29.98 ± 1.45	26.82 ± 0.45	30.07 ± 0.40

n = deney sayısı

III.5. CON A BAĞLANMASININ, HÜCRELERİN, ZARSAL 5' NÜKLEOTİDAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Con A'nın B lenfositleri ve K-562 hücrelerine bağlanmasının tümüyle hücre zarının bir enzimi olan 5' nükleotidazın aktivitesini ne şekilde etkilediği Tablo IX'da gösterilmiştir. Con A bağlanmasını izleyerek B lenfositlerinde yaklaşık 2 kat, K-562 hücrelerinde ise yaklaşık 4 kat bir inhibisyon gözlenmiştir. Soğuk Con A kullanılarak yapılan bu deneylerde bağlanma 0°C da gerçekleştirilmiş olduğundan "capping" olmadığı kabul edilmiştir.

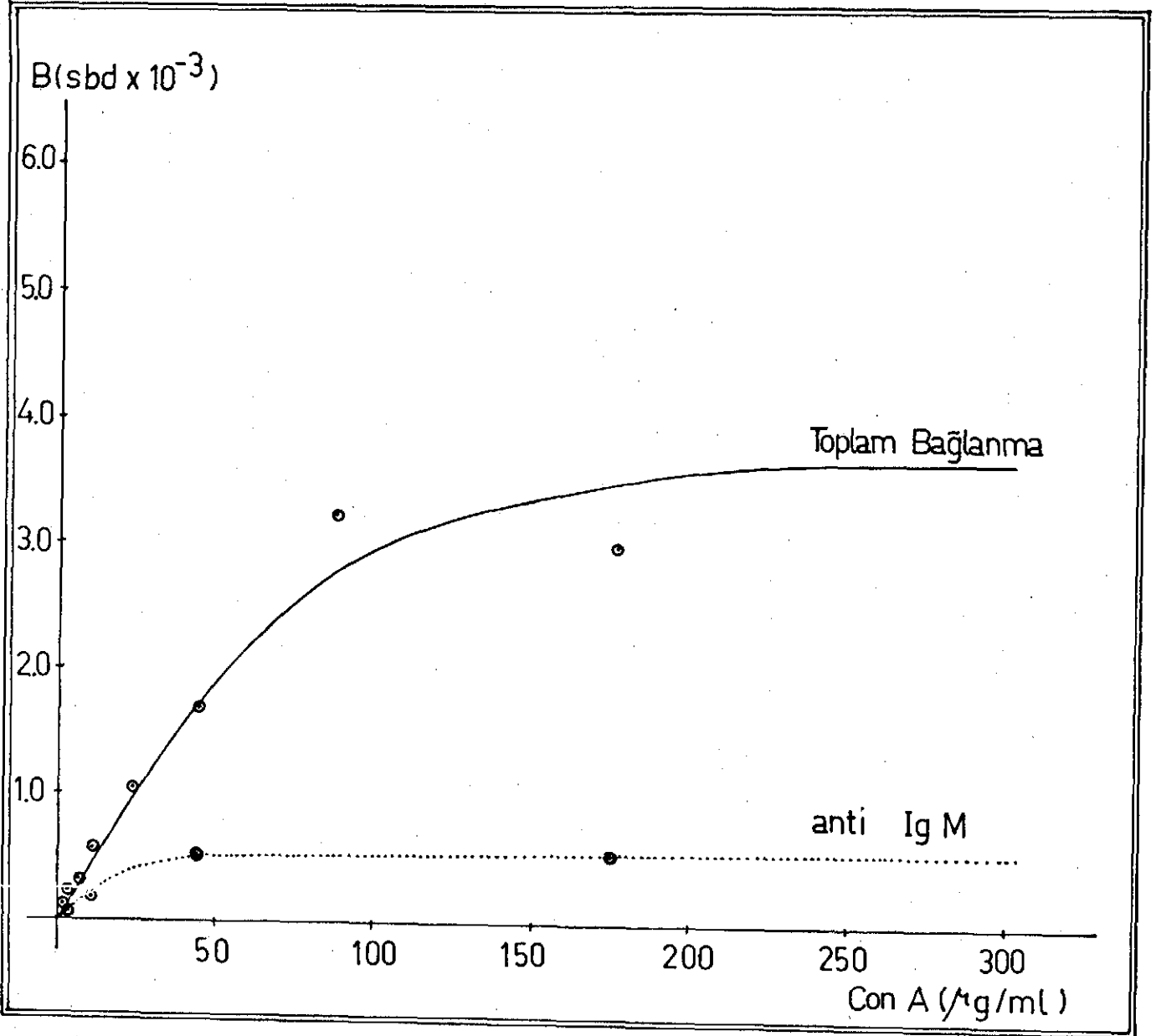
Tablo IX'da, Con A bağlanmasının 5' nükleotidaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Con A bağlanan hücreler, 200 µgm Con A/10⁶ hücre olacak şekilde 1 saat 0°C'da inkübe edildiler.

TABLO IX : 5' NÜKLEOTİDAZ AKTİVİTESİ.

5' nükleotidaz enzim aktivitesi (nmole P _i /mg protein/60 dakika)		
	Con A bağlanmamış hücreler	Con A bağlanmış hücreler
B lenfositleri	1053	525
K-562 hücreleri	292	76.9

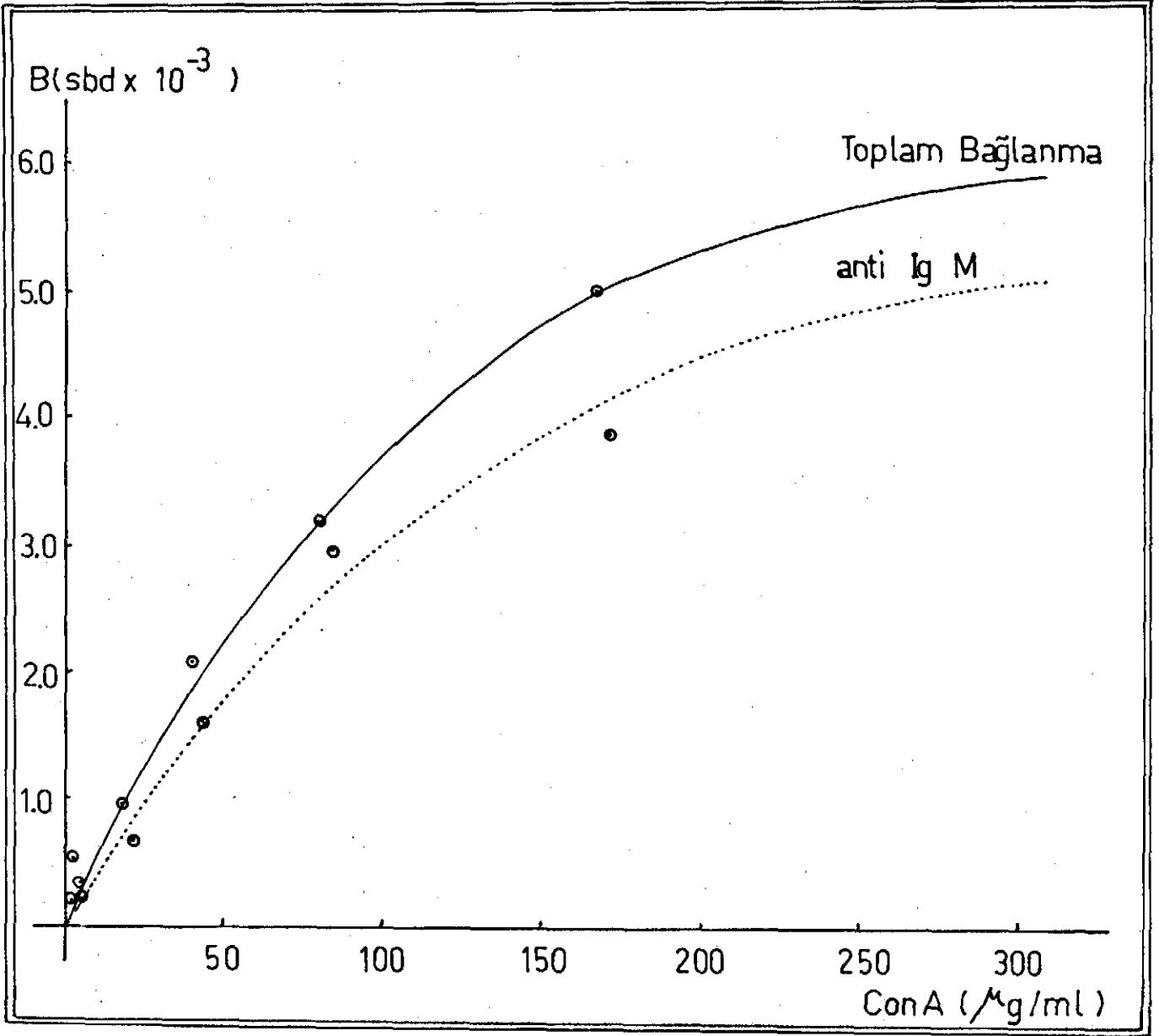
III.6. HÜCRELERİN ANTI IgM ile BAĞLANDIKTAN SONRA ³H-CON A BAĞLANMALARININ İNCELENMESİ

Anti IgM nin B lenfositleri ve K-562 hücrelerinin Con A bağlamaları üzerine etkisi Şekil 14 ve 15'de gösterilmiştir. Anti IgM ile ön inkübasyona uğratılmış B lenfositlerinin pratik olarak hiç Con A molekülü bağlamadığı K-562 hücrelerinin ise Con A bağlanmasını ancak yaklaşık % 15 oranında azalttığı görülmektedir. Kullanılan hücrelerin ön inkübasyona dayanıklı olduğu ve normal morfolojide buldukları toplam bağlanma kontrolleri ile saptanmıştır.



ŞEKİL 14 : B lenfositlerinin anti IgM kontrollü bağlanma eğrisi.

Absis : ³H-Con A (µg/ml)
Ordinat : Bağlanan ³H Con A (sbd x 10⁻³)
Hücre : Periferik insan B lenfositleri (1 x 10⁶/ml)
³H-Con A : 1-175 µg/ml
Anti IgM : 135 µg/ml (tavşandan hazırlanmış)
Sıcaklık : 0°C
İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 15 : K-562 hücrelerinin anti IgM kontrollu bağlanma eğrisi.

Absis : $^3\text{H-Con A}$ ($\mu\text{g/ml}$)

Ordinat : Bağlanan $^3\text{H-Con A}$ ($\text{sbd} \times 10^{-3}$)

Hücre : K-562 hücreleri ($1 \times 10^6/\text{ml}$)

$^3\text{H-Con A}$: 1-175 $\mu\text{g/ml}$

Anti IgM : 135 $\mu\text{g/ml}$ (tavşandan hazırlanmış)

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika

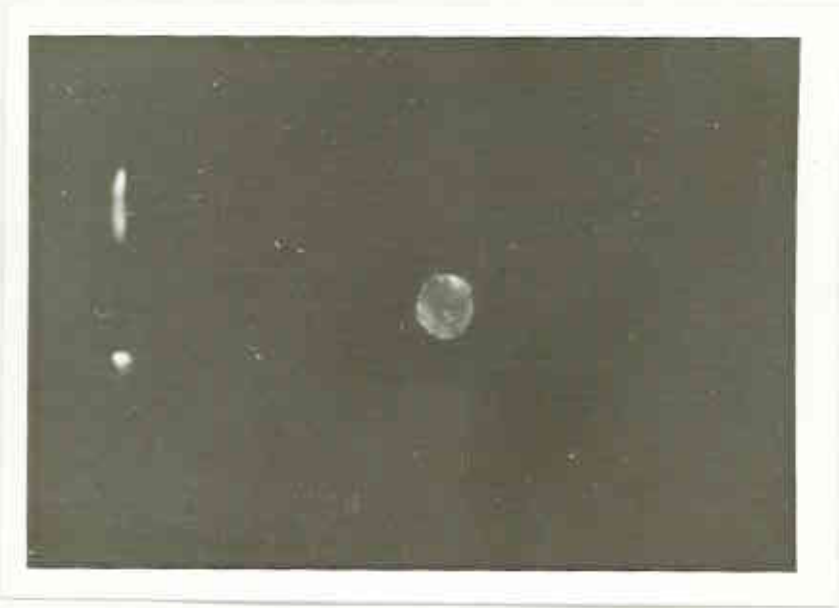
III.7. B LENFOSİTLERİ VE K-562 HÜCRELERİNİN FLUORESAN MİKROSKOPTA İNCELENMESİ

Şekil 16 A'da B lenfositlerinin fluoreseinli anti-IgM ile bağlanmalarının fluoresan mikroskopta çekilen resimleri görülmektedir. K-562 hücreleri bu yöntemle görülür bir fluoresans vermemektedir. Şekil 16 B'de ise B lenfositlerinin fluoreseinli Con A bağlandığında verdikleri fluoresans görülmektedir.

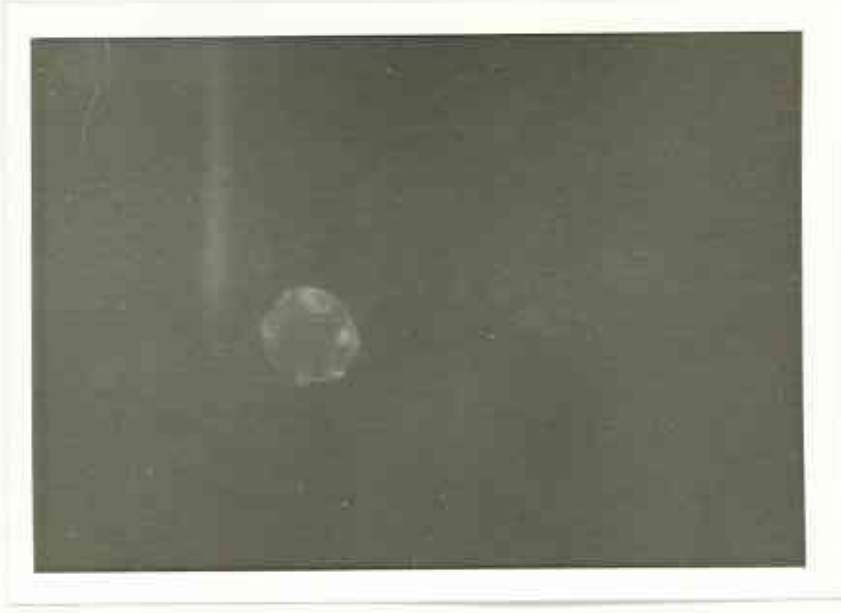
Şekil 17 A'da K-562 hücrelerinin fluoreseinli Con A ile verdikleri bağlanma görülmektedir. Şekil 17 B'de ise daha önce anti-IgM bağlamış hücrelerin fluoreseinli Con A yı bağlamaları gösterilmiştir. Bu yöntemle de B lenfositleri gözlenebilir bir fluoresans vermemişlerdir.



ŞEKİL 16 A : B lenfositlerinin, fluoreseinli Anti-IgM ile bağlanması.



ŞEKİL 16 B : B lenfositlerinin fluoreseinli Con A ile bağlanması.



ŞEKİL 17 A : K-562 hücrelerinin fluoreseinli Con A ile bağlanması.

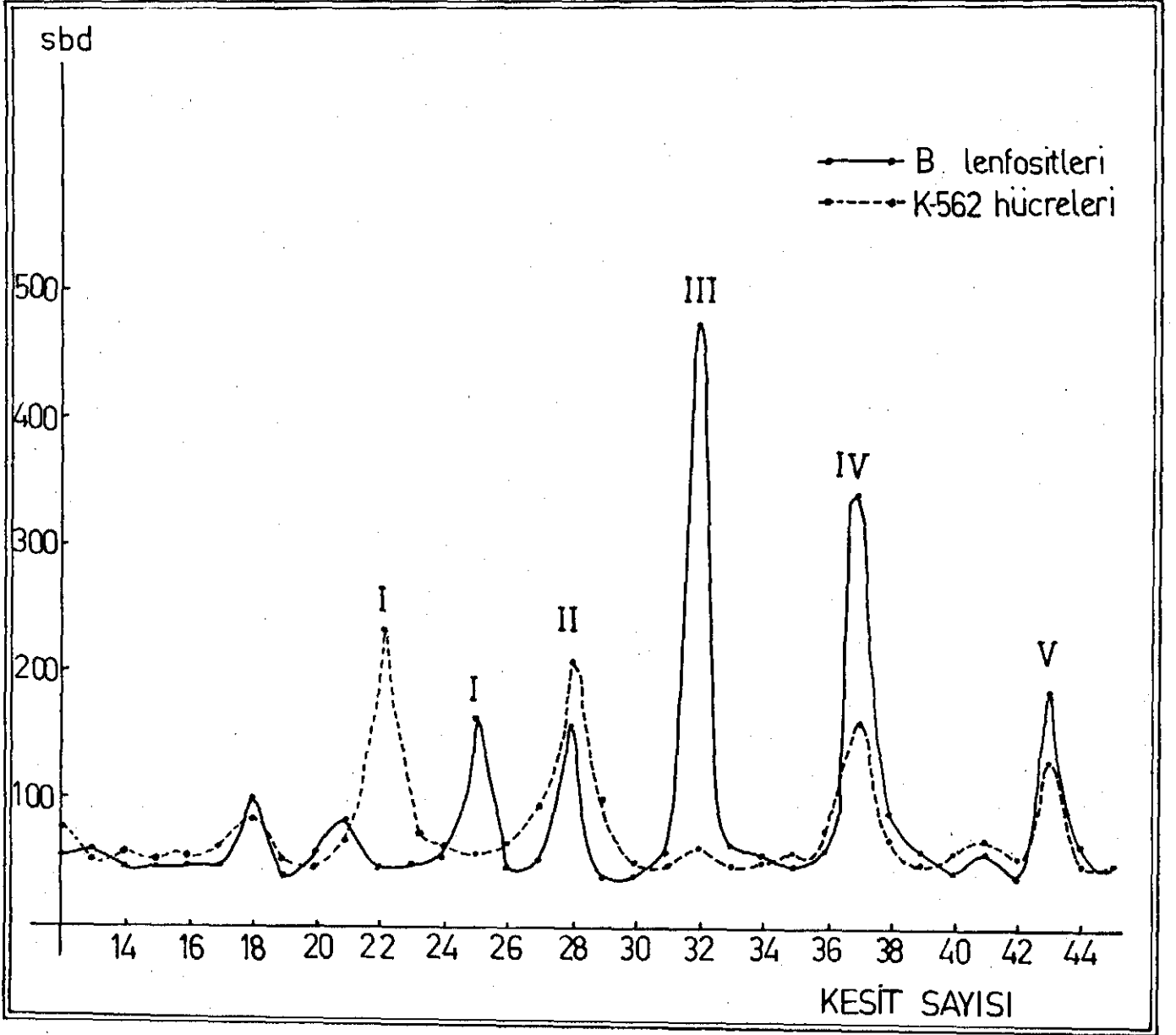


ŞEKİL 17 B : Daha önce anti IgM bağlamış K-562 hücrelerinin fluoreseinli Con A ile bağlanması.

III.8. SDS Li POLIAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ YAPILAN, B LENFOSİTLERİ ve K-562 HÜCRELERİ ZARLARININ İNCELENMESİ

Şekil 18 de B lenfositleri ile K-562 hücrelerinin izole zarlarının SDS-poliakrilamid elektroforez sonuçları görülmektedir. Elektroforez sonucunda jeller ³H-Con A ile bağlanmaya bırakılmış ve jel kesitlerinin radyoaktivitesi kesit sayısına karşı grafiklenmiştir. Çeşitli yıkama kademelerinde olası kayıplar gözönüne alınarak bağlanan Con A miktarı verilememektedir. Şekilde görüldüğü gibi B lenfositleri için 5 ana bağlanma bölgesi söz konusudur. Bunun yanında 3 tane daha düşük bağlanma gösteren glikopeptid görülmektedir. K-562 hücrelerinde ise, 3 tanesi elektroforetik olarak lenfosit ile aynı mobilitede 4 glikopeptid bulunmuştur.

Şekil 18'de B lenfositleri ve K-562 hücreleri, zarları izole edip, SDS li poliakrilamid jel elektroforezine konulduktan sonra, ³H-Con A ile bağlanma sonucu, ³H Con A bağlayan bölgeler gösterilmektedir.



ŞEKİL 18 : B lenfositleri ve K-562 hücrelerinin zar proteinlerinin $^3\text{H-Con A}$ bağlanmaları yönünden karşılaştırılması.

Absis : 1.5 mm lik kesitler halinde hazırlanan jel parçalarının sırası.

Ordinat : Her jel parçacığına bağlı $^3\text{H-Con A}$ (sbd).

T A R T I Ş M A

Periferik insan kanından T ve B lenfositlerinin ve granülositlerin izolasyonunda önerdiğimiz bir dizi yöntemin, daha önce literatürde yer alan yöntemlerle birçok ortak noktaları olmakla birlikte (15,16,137-144), yöntemlerimiz şu yönlerden üstünlük sağlamaktadır : 1- Az miktarda insan kanından yüksek verimde, saflıkta ve canlılıkta hücreler elde edilmiştir (Tripan mavisi dışlama yöntemiyle elde edilen bütün hücreler en az % 90 canlılıkta bulunmuşlardır). 2- Yöntemimizde çok az Ficoll-Hypaque solüsyonu kullanılmaktadır (diğer yöntemlerin 1/12'si kadar). 3- Elde edilen hücreler en uygun morfolojide ve membran çalışmaları yönünden en uygun durumda bulunmaktadırlar. 4- Ficoll-Hypaque solüsyonuna % 0.1 oranında katılan metil selüloz, gradyenin lenfositleri ayırma potansiyelini arttırmaktadır (Tablo IV). 5- Benzer şekilde kanın 1 x g'de bekletilerek lökositlerin ayrıştırılması sırasında da metil selüloz dekstran'a nazaran üstünlük sağlamaktadır (Tablo III). Bu durum muhtemelen metil selüloz jelinin eritrositlere ve granülositlere karşı gösterdiği bir afinite ile açıklanabilir. 6- Rozetlerin oluşturulmasında, Tablo V'den de görüleceği gibi, a) koyun eritrositlerinin lenfositlerin 30 katı olması, b) rozet ortamında % 25 AB Rh- insan serumunun bulunması, c) 37°C'da 30 dakika inkübasyon ve 4°C da 2 saat inkübasyon, rozet verimini belirgin derecede arttırıcı işlemlerdir (15). 7- İlk Ficoll-Hypaque gradyeni sırasında hücre süspansiyonunun içine 1/10 oranında ADP solüsyonunun (20 µg/100 ml) katılması, trombositlerin kümeleşmesini sağlayarak trombosit kontaminasyonunu minimuma indir-

mektedir. 8- Kan alınması sırasında defibrinasyon gerçi monosit ve trombosit kontaminasyonunu çok azaltmakla beraber (137,138), ilk gradyen sonucunda eritrosit kontaminasyonu çok artmakta ve daha önemlisi mononükleer hücre verimi çok düşmektedir. Bu nedenle kanın serum fizyolojik içindeki % 2'lik EDTA ile alınması tercih edilmiştir.

Concanavalin A hücre yüzeyinin yapısı açısından normal ve transforme hücrelerin karşılaştırılmasında pek çok araştırmacı tarafından özgül bir ligand olarak kullanılmıştır. Hücre yüzeyi glikoproteinlerini reseptör olarak gören Con A pek çok değişik hücre türünde reseptör sayı ve afinitelerini saptamada kullanılabilir. Bu amaçla kullanılmak üzere Con A, değişik yöntemlerle işaretlenmişse de hem dayanıklı türevler elde edilmesi hem de sonuçların tekrarlanabilirliği açısından ³H-asetil türevi en uygun türev olarak seçilmiştir (145-148). Kullanılan işaretleme yöntemi yüksek özgül etkinlikte ³H-asetil Con A elde edilmesini sağlamıştır (111). Ayrıca bu yöntemle elde edilen ³H-asetil Con A'nın biyolojik aktivitesi nativ Con A ile tamamen eşit bulunmuştur (111).

Bu çalışmada kullanılan bağlanma yöntemi özgül olmayan bağlanmayı minimuma indirdiği ve endositozun duyarlı bir şekilde ölçülmesine olanak verdiği için seçilmiştir. Kullanılan albüminli mikrofüj yöntemi, kısalığına (hücrelerin canlılığının korunması açısından önemlidir), yıkama ve santrifügasyon işlemlerinin en az da tutulmasına (ligand-reseptör ilişkisini bozan fiziksel güçlerin en az da tutulması açısından) ve albümin tabakasının bulunmasına (patlamış hücrelerin ayrılması açısından) bağlı üstünlükler taşır. Albümin fraksiyonunda sayımın yüksek bulunması hücrelerin hasar gördüğünü veya reseptör-ligand ilişkisinin bozulduğunu göstermektedir. Çabuk süzme yöntemi bazı yönlerden albüminli mikrofüj yöntemine üstünlük sağlar gibi görünmekteyse de, yaptığımız ön çalışmalarda, özellikle Con A'nın 0.22 ve 0.45 mikron çapındaki milipore filtrelere büyük ölçüde bağlandığı

görülmüş (bildirilmemiş sonuçlar) ve bu yöntem benimsenmemiştir. Bağlanma deneylerinin 0-4°C aralığında yapılması, zar akışkanlığının azalması ile reseptör çevresini etkilemekte ise de, bu tip deneylerin yorumlanmasını güçleştiren endositozu büyük ölçüde engellediğinden yararlıdır. Ayrıca lenfosit yüzeyinde lektinlerin bağlanması ile gözlenen reseptörlerin bir araya toplanması (capping) de bu sıcaklıkta azalır, bu da daha sağlıklı afinite (K_2), reseptör sayıları (N) saptanmasına olanak verir.

Reseptörlerin sayısı, afinite ve heterojenliğinin ölçülmesinde en çok kullanılan yöntem Scatchard yöntemidir (130). Ortama konan ligandın % 10 veya daha fazlasının bağlanmasında, bağlanmanın artışı ligand derişimine doğrusal olarak bağımlıdır. Bu durumda Scatchard analizi sonsuz sayıda reseptör varlığını gösterecek şekilde yatay bir doğru verir. Bu çalışmada kullanılan derişimlerde bağlanma daima ortama konan toplam serbest lektinin % 2 sinden az olmuştur. Bu yüzden de Scatchard analizi ile elde edilen afinite ve reseptör sayısı sağlıklıdır. Bu analizde önemli bir diğer nokta da, işaretli ligandın afinitesinin, işaretlenmemiş olandan farklı olmasıdır. Bu da doğrusal olmayan Scatchard eğrilerinin elde edilmesine neden olur. Bu çalışmada kullanılan işaretli Con A'nın biyolojik aktivitesi nativ Con A ile tamamen aynı olduğundan elde edilen heterojenitenin kesin olarak reseptör heterojenitesine bağlı olduğu söylenebilir. Bu çalışmada elde edilen önemli afinite değişiklikleri en düşük doygunluk noktalarında gözlemlendiğinden yöntemin en güvenilir bölgesine düşmektedir (149,150).

Hücre zarının yapısında genellikle hidrofilik bölgeleri oluşturan protein ve glikoproteinlerin yanında, büyük ölçüde hidrofobik bir matriks oluşturan fosfolipitlerin dağılımı da bazı dolaylı yöntemlerle incelenebilir. Bu çalışmada hidrofilik ve hidrofobik ortamlarda farklı fluoeresans gösteren ANS bu amaçla seçilmiştir. Herhangi bir zarın ANS bağlayan bölgelerinin çokluğu, zarın hidrofobisitesinin yüksekliği ile doğru orantı-

lıdır. ANS ile yapılan bağlanma deneylerinde, ANS bağlanmasının sıklığı (K_2) saptanırken, Scatchard yönteminin kullanılması, bağlanma bölgeleri için şu iki varsayımı kabul eder : 1) Tüm bağlanma yerleri hücrelerin bağlanma özellikleri bakımından aynıdır. 2) Bölgeler birbirinden bağımsız olarak ANS,bağlar (134). Zarda hidrofobik bölgelere bağlanmış ANS, zar proteinlerinin triptofanları ile enerji alışverişine girdiğinde, enerji aktarımı için uygun uzaklık hesaplanabilir. Bu uzaklık ANS için bağlanma bölgesinin sayısı ve afinitesi ile karşılaştırıldığında zar yüzeyinde ortalama protein dağılımı hakkında fikir verebilir. Yanlız bu tip hesaplamalarda elde edilen uzaklıkların çok değişik gruplar altında toplanabilecek değerlerin bir ortalaması olduğu gözönüne alınmalıdır.

Değişik hücre türlerinin yüzey özelliklerinin incelenmesinde hem hidrofob lipit matriksin, hem de hidrofil bölgelerden bir kısmını oluşturan glikoprotein reseptörlerin birlikte incelenmesi, zarın topografisi hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlayabilir. Bu çalışmada da bu tür bir yaklaşım amaçlanmış olup gerek T ve B lenfositleri gibi, farklılaşmasını tamamlamış lenfoid karakterli hücrelerin gerekse eritrositler gibi eritroid kaynaklı olgun hücrelerle, gene eritroid kaynaklı olduğu sanılan farklılaşmasını tamamlamamış malign hücreler olan K-562 hücrelerinin yüzey özellikleri incelenmiştir.

Tablo VI, VII ve VIII'in birlikte incelenmesi, B lenfositleri için, 2 tür Con A reseptörü bulunduğu ve hidrofobik bölgelerin, oldukça az sayıda fakat yüksek hidrofobisitede olduğunu ortaya koyar. Daha önce değişik memeli lenfositleri ile yapılan çalışmalarda tek tür reseptör tanımlanmıştı (104-107).

T lenfositleri ise tek tip Con A reseptörü bulundurmaktadır. T ve B lenfositlerinin Con A bağladıktan sonra mitoz için uyarılmalarının farklı

mekanizmalar ile gerçekleştiği bilinmektedir (105,107). Bu hücrelerde Con A reseptörlerinin sayı ve afinitelerinin bu derece farklı oluşu, reseptöre bağlanmadan sonra gerçekleşecek olayların farklılığını vurgular.

Yukarıda adı geçen parametreler, eritrositler için gözönüne alındığında bu hücrelerin daha yüksek sayıda yüksek afiniteli ve düşük afiniteli glikoprotein reseptörler içerdiği, aynı zamanda bu hücrelerden hazırlanmış "ghost"ların oldukça yüksek sayıda hidrofobik bölgeler bulundurduğu anlaşıldı. Eritrositlerde bol miktarda bulunan hemoglobinin ANS fluoresansını baskılaması hidrofobik bölgelerin saptanmasında intakt hücre yerine "ghost"ların kullanılması gereğini doğurmuştur. Bugüne kadar yapılmış çeşitli araştırmalarda, gerek yüzey proteinleri, gerekse fosfolipit görünümüleri olarak "ghost"ların intakt eritrositin iyi bir temsilcisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu yüzden bu çalışmada "ghost"lar için elde edilen değerlerin intakt eritrositler için geçerli olduğu kabul edilmiştir. Eritrositler ile daha önce yapılan çalışmalarda sadece toplam reseptör sayısı bildirilmiş ve afiniteleri saptanmamıştır (108-110).

Eritroid kaynaklı malign hücreler olan K-562 hücreleri incelenen diğer tüm hücrelerden oldukça farklı görülmektedir. Bu hücreler bol miktarda glikoprotein reseptör içermeleri yanında yüksek hidrofobisitede çok sayıda bölge içermektedirler (Tablo VI, VII).

Gerek reseptör afiniteleri gerekse hidrofobisite gözönüne alındığında K-562 hücrelerinin eritrositlere benzemediği açıktır. Fakat saptanan farklılıkların, farklılaşmanın tamamlanmasından mı, yoksa bu hücrelerin malign karakterinden mi ileri geldiğini söylemek mümkün değildir. K-562 hücrelerini farklılaşmaya ve sonuçta eritrosit benzeri partiküller oluşmaya zorlayan sodyum butirat ile uyarılmaları sonucu elde edilecek hücrelerde (55) bu tip çalışmaların yapılması konuya açıklık kazandıracaktır. Bu

hücrelerde hidrofobik bölgelerle triptofan molekülleri arasındaki uzaklığın, incelenen diğer hücre türlerinden yaklaşık 4 Å daha kısa olması çok büyük yüzey değişikliğine işaret eder. Bu farklılık hücrelerin malign karakteri gözönüne alındığında yüksek oranda "kriptik" bölge oluşturabilmelerine bağlanabilir. Diğer taraftan bu hücrelerde hem hidrofob bölgelerin, sayı ve hidrofobitesi yüksek hem de glikoprotein reseptör sayısı fazladır (Tablo VI, VII). Bu nedenle bu bölgelerin birbirine yakın olması da beklenebilir.

Con A'nın değişik hücre türlerinin yüzeyine bağlanması zarların biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerinde önemli değişiklikler oluşturur. Örneğin bazı tümör hücrelerinde agglütinasyonun artması (151) mitoz için uyarılması (152) polimorfonükleer lökositlerde karbohidrat metabolizmasının hızlanması (153) gibi. Bu değişikliklere bağlı olarak bazı hücre zarı enzimlerinde de aktivite değişiklikleri olması doğaldır. Tablo (IX) normal B lenfositlerinde 5' nükleotidaz enzim aktivitesinin Con A bağlanması ile % 50, K-562 hücrelerinde ise % 75 inhibe olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan K-562 hücre zarlarının 5' nükleotidaz aktivitesi 3.5 kez daha düşüktür. Bu aktivite azlığının farklılaşmanın tamamlanmamış olmasına mı yoksa bu hücrelerin malign karakterine mi bağlı olduğu bilinmemektedir. 5' nükleotidaz aktivitesinin Con A bağlanması ile inhibe oluşunu enzimin kinetiklerini normalden sigmoide geçişi ile açıklamaya çalışılmış ve bu geçişten Con A reseptörlerinin bir araya toplanmasının sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (133). Bu çalışmada Con A bağlanmasının 0°C da yapılarak, reseptörlerin bir araya toplanmasının minimumda tutulmasına ve yüksek substran derişiminde çalışılmasına karşın inhibisyon yüzdelerinin yüksek bulunması, doğrudan bir inhibisyonun varlığını gösterir. Bu da Con A reseptörü ile 5' nükleotidaz enziminin zar da birbirine sterik olarak yakın bulunması anlamına gelebilir. Hücre yüzeyinde Con A reseptörü ile ilişkisi

araştırılan bir diğer protein de IgM dir. Anti IgM ile muamele edilmiş B lenfositlerinde Con A bağlanması % 86 inhibe olurken, K-562 hücrelerinde bu inhibisyon % 15 civarında saptanmıştır (Şekil 14,15).

Şekil 16 ve 17'de bu hücrelerin fluoressan mikroskopik görünüşleri verilmiştir. Fl-IgM bağlanmış hücrelerin Fl-Con A bağlanmış hücrelere oranla çok parlak görünmelerinin nedeni hem IgM molekülleri sayısının Con A moleküllerinin sayısından fazla olmasına hem de anti IgM in fluoressan içeriğinin yüksek olmasına bağlıdır. Anti IgM ile ön inhibisyona uğratılmış K-562 hücrelerinde Con A bağlanması sonucu bir miktar "capping" gözlenmektedir. Bu hücreler yalnız Con A ile de, bölgesel bağlanma (patches) göstermektedir. Bu hücrelerde ANS bağlanma bölgeleri ile triptofan molekülleri arasında uzaklığın düşük olması da bu bölgesel bağlanmayı destekleyen bir kanıttır.

B lenfositleri ve K-562 hücreleri izole zarları, çözünleştirilip SDS-poliakrilamid jel elektroforezine uygulandığında her iki tür hücre için de 4 farklı elektroforetik mobilitede Con A reseptörü saptanmıştır. Aynı jeller protein ve karbohidrat boyası ile boyandığında bu peptidlerle çakışan protein ve karbohidrat üniteleri olduğu saptanmıştır (bildirilmemiş sonuçlar). Bu glikoproteinlerden I ve III numaralı olanlar elektroforetik mobiliteleri açısından tamamen farklı iken, II, IV ve V numaralı glikoproteinlerin elektroforetik mobiliteleri her iki hücre türünde de aynıdır. Con A reseptörlerinin hücreden hücreye ve bir hücrenin değişik evrelerindeki farklarını tam olarak saptayabilmek için bu reseptörlerin saflaştırılabilir oranlarda elde edilebilmesi ön şarttır. Molekül ağırlıklarının (SDS'te elektroforetik mobilite) aynı olması reseptörlerin benzer olmasını gerektirmez.

Bağlanma deneyleri ile 2 tür reseptör saptanırken elektroforezde 4

ayrı reseptör glikoproteininin bulunması bu proteinlerin farklı molekül ağırlığında olmasına karşın, yakın afiniteli gruplar oluşturabileceğini akla getirmektedir. Diğer bir olasılık ise SDS li elektroforezde çok karşılaşılan bir problem olan proteaz aktivasyonudur. Hernekadar plazma zarlarının izolasyonunda proteolitik parçalanmayı önlemek için önlem alındıysa da zarların SDS ile çözünürleştirilmesinde proteolitik parçalanma kontrol edilememiş olabilir. Buna bağlı olarak da gözlenen küçük molekül ağırlıklı glikopeptidler proteolitik parçalanma ürünleri olabilirler.

Ö Z E T

Bu çalışmada insan periferik T ve B lenfositleri eritrositleri ve devamlı kültür hücreleri olan K 562 hücrelerinin yüzey özellikleri incelendi.

Bu amaçla insan kanından T ve B lenfositlerinin yüksek verimde, saf-
lıkta ve canlılıkta elde edilebilmesi için bir yöntem geliştirildi.

T lenfositlerinde Con A reseptörlerinin incelenmesi glikoprotein yapısında tek tip afiniteli yaklaşık 3 milyon reseptör olduğunu ortaya koydu. B lenfositlerinin ise düşük afiniteli ($Ka = 1.28 \pm 0.36 \times 10^6$) ve yüksek afiniteli ($Ka = 22.33 \pm 4.28 \times 10^6$) olmak üzere farklı sayılarda iki tip reseptör içerdiği saptandı. K-562 hücreleri de iki tip reseptör içermekteydiler ($Ka_1 = 2.2 \pm 0.98 \times 10^6$; $Ka_2 = 31.11 \pm 4.39 \times 10^6$). Matür eritrositlerde de iki tür reseptör olduğu saptandı ($Ka_1 = 0.74 \times 10^6$; $Ka_2 = 29.42 \times 10^6$).

Aynı hücrelerin zar hidrofobisitesi ANS yöntemi ile araştırıldığında, K-562 hücrelerinin en hidrofobik hücreler olduğu saptandı.

B lenfositleri ve K-562 hücrelerinde Con A bağlanması sonucunda bir zar proteini olan 5' nükleotidaz enziminin farklı oranlarda inhibe olduğu gözlemlendi. Bir diğer zar proteini olan IgM'in anti-IgM ile kapatılmasının B lenfositlerinde Con A bağlanmasını tümüyle engellediği saptandı. K-562 hücrelerinde ise anti-IgM'nin etkisi çok az olmakta idi. Bu hücre türlerinin Con A bağlayan glikoproteinleri elektroforez ile de gösterildi.

Bulgular adı geçen hücre türleri arasında gerek farklılaşma gerekse malign özellikler gözönüne alınarak tartışıldı.

K A Y N A K L A R

1. Singer, S.J., Nicholson, G.L., *Science*, 175, 720 (1972).
2. Edidin, M., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3, 179 (1974).
3. Nicholson, G.L., *Biochem. Biophys. Acta.*, 457, 57 (1976).
4. McConnel, H.M., "Functional linkage in Biomolecular Systems", (Schmidt, F.O., Schneider, D.M., editörleri), Raven Press, New York, S: 123-131 (1975).
5. Berlin, R.D., Oliver, J.M., Ukena, T.E., *N. Eng. J. Med.*, 292, 515 (1975).
6. Edelman, G.M., Yahara, I., Wang, J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70, 1442 (1973).
7. Edelman, G.M., "Origins and mechanisms of specificity in clonal selection, Cellular selection, and regulation in the immune response", (Edelman, G.M., derleyen), Raven Press, New York, S: 1-38 (1975).
8. Wilson, L., Bryan, J., *Adv. Cell Mol. Biol.*, 3, 21 (1974).
9. Lazarides, E., *J. Histochem. Cytochem.*, 23, 507 (1975).
10. Uhanue, E.R., Kamansky, M.J., *Transplant. Rev.*, 14, 184 (1973).
11. De Petris, S., *J. Cell Biol.*, 65, 123 (1975).
12. Oppenheim, J.J., *Fed. Proc.*, 27, (1968).
13. Andre-Schwartz, J., *Blood*, 24, 113 (1964).
14. Gowans, J.L., McGregor, D.D., *Progr. Allergy*, 9, 1 (1965).
15. Bach, J.F., *Transplant. Rev.*, 16, 196 (1973).
16. Bentwich, Z., Kunkel, H.G., *Transplant. Rev.*, 16, 29 (1973).
17. Frolan, S.S., Natvig, J.B., *Transplant. Rev.*, 16, 114 (1973).
18. Jondal, M., *Transplant. Rev.*, 16, 163 (1973).
19. Polliac, A., *J. Exp. Med.*, 138, 607 (1973).
20. Buckton, K.E., *Nature*, 214, 470 (1967).

21. Norman, A., *Science*, 147, 745 (1964).
22. Novell, P.C., *Blood*, 26, 798 (1965).
23. Everett, N.B., Tyler, R.W., *Int. Rev. Cytol.*, 22, 205 (1967).
24. Osmond, D.G., Everett, N.B., *Blood*, 23, 1 (1964).
25. Loutit, J.F., *Br. J. Haematol.*, 15, 333 (1968).
26. Miller, J.F.P.A.P., *Cellular Immunol.*, 2, 469 (1971).
27. Miller, J.F.P.A.P., Osaba, D., *Physiol. Rev.*, 47, 437 (1967).
28. Ford, C.E., Micklem, H.S., *Lancet*, 1, 359 (1963).
29. Boycott, A.E., *Proc. R. Soc. Med.*, 23, 15 (1929).
30. Donohue, D.M., *J. Clin. Invest.*, 37, 1571 (1958).
31. Tavassoli, M., Crosby, W.H., *Science*, 179, 912 (1973).
32. Donelson, E.G., *Am. J. Physiol.*, 128, 382 (1940).
33. Skalak, R., Rnanemar, P.I., *Science*, 164, 717 (1969).
34. Dodge, J.T., *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 119 (1963).
35. Weed, R.I., *J. Clin. Invest.*, 42, 581 (1963).
36. Bakerman, S., Wasemiller, G., *Biochemistry*, 6, 1100 (1967).
37. Cooper, R.A., *Semin. Hematol.*, 7, 296 (1970).
38. Nelson, G.J., *J. Lipid Res.*, 8, 374 (1967).
39. Sachs, J.R., *J. Clin. Invest.*, 51, 3244 (1972).
40. Glomset, J.A., *J. Lipid Res.*, 9, 155 (1968).
41. Marchesi, V.T., *Biochemistry*, 9, 50 (1969).
42. Marchesi, V.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69, 1445 (1972).
43. Fajnholc, N., *Biochem. Biophys. Acta.*, 255, 850 (1972).
44. Sabine, J.C., *Am. J. Med.*, 27, 81 (1959).
45. Reinwein, D., Durrer, H.A., *Horm. Met. Res.*, 4, 213 (1973).
46. Roth, J., *Metabolism*, 22, 1059 (1973).
47. Rasmussen, J., *Progress in Clinical and Biological Research*. (Brewer, G.J., editor), Alan R. Liss Inc., New York, N.Y. (1975).
48. Nilsson, K., Ponten, J., *Int. J. Cancer*, 15, 321 (1975).

49. Lozzio, C.B., Lozzio, B.B., *Blood*, 45(3), 321 (1975).
50. Ortaldo, J.R., Oldham, R.K., Cannon, G.C., Heberman, R.B., *J. Natl. Cancer Inst.*, 59, 77 (1977).
51. Greaves, M.F., Janossy, G., Roberts, M., Rapson, N.T., Ellis, R.B., Chessels, J., Lister, T.A., Catovsky, D., "Immunological diagnosis of leukemias and lymphomas", (Felder, T.H., Thiel, E., derleyenler), Springer-Verlag, Berlin (1977).
52. Andersson, L.C., Nilsson, K., Gahmberg, C.G., *Int. J. Cancer*, 23, 143 (1979).
53. Klein, E., Ben-Bassat, H., Neuman, H., Ralph, P., Zeuthen, J., Polliack, A., Vanky, F., *Int. J. Cancer*, 18, 421 (1976).
54. Rutherford, T.H., Clegg, J.B., Weatherall, D.J., *Nature*, 280, 164 (1979).
55. Andersson, L.C., Jokinen, M., Ghamberg, C.G., *Nature*, 278, 364 (1979).
56. Schulman, H.M., Wilczynska, A., Ponka, P., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 100, 1523 (1981).
57. Stillmark, H., *Inang. Dis. Dorpat.*, 3, 59 (1888).
58. Sumner, J.B., Howell, S.F., *J. Bacteriol.*, 32, 227 (1936).
59. Bird, G.W.C., *Brit. Med. J.*, 15, 165 (1959).
60. Boyd, W.C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 169, 168 (1970).
61. Pardoe, G.I., Uhlerbruck, G., *J. Med. Lab. Technol.*, 27, 249 (1970).
62. Jones, D.B., Johns, C.O., *J. Biol. Chem.*, 28, 67 (1916).
63. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J., *Biochem. J.*, 96, 230 (1965).
64. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J., *Biochem. Biophys. Acta*, 147, 262 (1967).
65. Olson, M.O.J., Liener, I.E., *Biochemistry*, 6, 105 (1967).
66. Kabat, E.A., Mayer, M.M., *Experimental Immunochem.* Thomas Co., Springfield, III. p: 114-116 (1961).
67. Sumner, J.B., Howell, S.F., *J. Biol. Chem.*, 115, 583 (1936).
68. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J., *Can. J. Biochem.*, 46, 1147 (1968).
69. Kalb, A.J., Levitzki, A., *Biochem. J.*, 109, 669 (1968).
70. Brewer, C.F., Marcus, D.M., Grollman, G.P., *J. Biol. Chem.*, 249, 4614 (1974).
71. Von Goldhammer, E., Zorn, H., *Eur. J. Biochem.*, 44, 195 (1974).
72. McKenzie, G.H., Sawyer, W.H., Nichol, L.W., *Biochem. Biophys. Acta*, 263, 283 (1972).

73. Hassing, G.S., Goldstein, I.J., *Eur. J. Biochem.*, 16, 549 (1970).
74. Gordon, J.A., Marquardt, M.D., *Biochem. Biophys. Acta*, 332, 136 (1974).
75. Huet, C., Lonchamp, M., Huet, M., Bernadac, A., *Biochem. Biophys. Acta*, 365, 28 (1974).
76. Doyle, R.J., Pittz, E.P., Woodside, E.E., *Carbohydrate Res.*, 8, 89 (1968).
77. Pflumm, M.N., Beychok, S., *Biochemistry*, 13, 4982 (1974).
78. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J., Hassing, G.S., So, L.L., *Biochemistry*, 7, 4211 (1968).
79. Edmundson, A.B., Ely, K.R., Sly, D.A., Westholm, F.A., *Biochemistry*, 10, 3554 (1971).
80. Wang, J.L., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J., Edelman, G.M., *J. Biol. Chem.*, 250, 1490 (1975).
81. Recke, G.N., Jr., Becker, J.W., Edelman, G.M., *J. Biol. Chem.*, 250, 1525 (1975).
82. Barber, B.H., Carver, J.P., *J. Biol. Chem.*, 248, 3353 (1973).
83. Grimaldi, J.J., Sykes, B.D., *J. Biol. Chem.*, 250, 1618 (1975).
84. Hardman, K.D., Ainsworth, C.F., *Biochemistry*, 12, 4442 (1973).
85. Alter, G.M., Magnuson, J.A., *Biochemistry*, 13, 4038 (1974).
86. Goldstein, I.J., Reichert, C.M., Misaki, A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 234, 283 (1974).
87. Lis, H., Sharon, N., *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 541 (1973).
88. Nicolson, G.L., *Int. Rev. Cytol.*, 39, 89 (1974).
89. Cuatrecasas, P., *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 169 (1974).
90. Cuatrecasas, P., Hollenberg, M.D., *Adv. Prot. Chem.*, 30, 251 (1976).
91. Newton, B.A., *J. Gen. Microbiol.*, 10, 491 (1954).
92. Brocklehurst, J.R., Freedman, R.B., Hancock, D.J., Radda, G.K., *Biochem. J.*, 116, 721 (1970).
93. Azzi, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 254 (1969).
94. Gitler, C., Rubalcava, B., Cawell, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 193, 479 (1969).
95. Azzi, A., Fabbro, A., Santato, M., Gherardini, P.L., *Eur. J. Biochem.*, 21, 404 (1971).
96. Datta, A., Penefsky, H.S., *J. Biol. Chem.*, 245, 1537 (1970).

97. Tasaki, I., Watanabe, A., Sandlin, R., Carney, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 61, 883 (1968).
98. Kasai, M., Podleski, T.R., *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.*, 7, 13 (1970).
99. Rubalcava, B., *Biochemistry*, 8, 2742 (1969).
100. Dallner, G., Emster, L., Azzi, A., *Chem. Biol. Interactions*, 3, 254 (1971).
101. Chance, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 560 (1970).
102. Azzi, A., Baltscheffsky, M., Vinio, H., *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.*, 17, 49 (1971).
103. Stryer, L., Haugland, R.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 719 (1967).
104. Bornens, M., Karsenti, E., Avrameas, S., *Eur. J. Biochem.*, 65, 61 (1976).
105. Maro, B., Avrameas, S., Bornens, M., *Exp. Cell Res.*, 118, 85 (1979).
106. Speckart, S.F., Boldt, D.H., Mc Dermott, R.P., *Blood*, 52, 681 (1978).
107. Speckart, S.F., Boldt, D.H., Ryerson, K.L., *Exp. Cell Res.*, 111, 385 (1978).
108. Gordon, J.A., Young, R.K., *J. Biol. Chem.*, 246, 1932 (1979).
109. Phillips, P.G., Furnanski, P., Lubin, M., *Exp. Cell Res.*, 86, 301 (1974).
110. Kawaguchi, T., Matsumoto, I., Osawa, T., *Biochemistry*, 13, 3169 (1974).
111. Emerk, K., Sinangil, F., *Biyokimya Dergisi*, 4, 181 (1979).
112. Bretten, R., Wicker, R., Barnhard, W., *Int. J. Cancer*, 10, 397 (1972).
113. Bhalla, D.K., Hunt, C.V., Kapur, S.P., Andersen, W.A., *J. Cell Sci.*, 36, 31 (1979).
114. Maca, R.P., Hakes, A.D., *Biochem., Biophys. Res. Acta.*, 81, 1124 (1978).
115. Rutishauser, U., Yahara, I., Edelman, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1149 (1974).
116. Taylor, R.B., *Nat. New Biol.*, 233, 225 (1971).
117. Quotel, M.R., Kaplan, J.G., *Exp. Cell. Res.*, 63, 230 (1971).
118. Smith, J.N., *J. Clin. Invest.*, 50, 432 (1971).
119. Mandelsohn, J., Skinner, S.A., Kornfeld, S., *J. Clin. Invest.*, 50, 818 (1971).

120. Ferber, E., Resch, K., *Biochim. Biophys. Acta.*, 296, 335 (1973).
121. Resch, K., Gelfand, E.W., Hansen, K., Ferber, E., *Eur. J. Immunol.*, 2, 598 (1972).
122. Ulrich, R.S., Wallach, D.F.H., Ferber, E., *Biochim. Biophys. Acta*, 356, 288 (1974).
123. Andersson, L., Gahnberg, C.G., Kimura, A.K., Wigzell, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 3455 (1978).
124. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J., *Biochem. Biophys. Acta.*, 133, 376 (1967).
125. Lowry, A., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., Kaplan, N.O., (derleyenler), Acad. Press, New York and London, C. III, S: 448 (1957).
126. "Chemical Notes", Packard Instrument, Co., Inc. (1970).
127. Bray, G.A., *Anal. Biochem.*, 1, 279 (1960).
128. Nicolson, G.L., Locorbiere, M., Eckhart, W., *Biochemistry*, 14, 172 (1975).
129. Bachi, T., Schnebli, H.P., *Exp. Cell Res.*, 81, 175 (1975).
130. Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660 (1949).
131. Schimmel, S.D., Kent, C., Bischoff, R., Vogelos, P.R., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 3195 (1973).
132. Domand, J., Bonnofaus, J.C., Mani, J.C., *Eur. J. Biochem.*, 87, 459 (1978).
133. Carraway, C.A.C., Jett, G., Carraway, K.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 67, 1301 (1975).
134. Azzi, A., "Methods in Enzymology", Colowick, S.P., Kaplan, N.O., (derleyenler), Acad. Press, New York and London, C. XXXII, S: 234 (1974).
135. Atkinson, P.H., Summers, D.F., *J. Biol. Chem.*, 246, 5162 (1971).
136. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H., *Biochemistry*, 10, 2606 (1971).
137. Böyum, A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, Suppl. 97, 77 (1968).
138. Böyum, A., *Scand. J. Immunol.*, 5, Suppl. 5, 9 (1976).
139. Greaves, M.F., Brown, G., *J. Immunol.*, 112, 420 (1974).
140. Kansu, E., Hauptman, S.P., *Clin. Immunol. Immunopath.*, 12, 341 (1979).
141. Bach, J.F., Muller, J.Y., Dardenne, M., *Nature*, 227, 1251 (1970).

142. Bentwich, Z., Douglas, S.D., Skutelsky, E., Kunkel, H.G., *J. Exp. Med.*, 137, 1532 (1973).
143. Bobrove, A.M., Strober, S., Herzenberg, L.A., DePamphis, J.D., *J. Immunol.*, 112, 520 (1974).
144. Jondal, M., Holm, G., Wigzell, H., *J. Exp. Med.*, 136, 207 (1972).
145. Inbar, M., Socks, L., *Nature*, 233, 710 (1969).
146. Cline, M.J., Livingstone, D.C., *Nature (New Biol.)*, 232, 155 (1971).
147. Ozonne, B., Sambrook, J., *Nature (New Biol.)*, 232, 156 (1971).
148. Gunther, G.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 1012 (1973).
149. Chang, K.J., Jacobs, S., Cuatrecasas, P., *Biochem. Biophys. Acta.*, 406, 293 (1975).
150. Cuatrecasas, P., Hollenberg, M.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 31 (1974).
151. Burger, M.M., *Fed. Proc.*, 32, 91 (1973).
152. Novogrodsky, A., Katcholski, E., *Biochim. Biophys. Acta.*, 228, 579 (1971).
153. Romco, D., Zabucchi, G., Rossi, F., *Nature (New Biol.)*, 243, 111, (1973).

