

283809

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**VİRAL ENFEKSİYON VE TRANSFORMASYONDAN SONRA
ÇEŞİTLİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
CONCANAVALİN A RESEPTÖR KİNETİKLERİNİN İRDELENMESİ**

BİYOKİMYA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

FARUK SİNANGİL

ANKARA — 1980

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

VİRAL ENFEKSİYON VE TRANSFORMASYONDAN SONRA
ÇEŞİTLİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
CONCAVALİN A RESEPTÖR KİNETİKLERİNİN İRDELENMESİ

BİYOKİMYA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

FARUK SİNANGİL

Rehber Öğretim Üyesi : Doç. Dr. KAYA EMERK

ANKARA - 1980

Bu çalışmanın yürütülmesinde bana her türlü
yardımı sağlayan H.. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji
Bilim Dalı Öğretim yelerinden Doç. Dr. şemsettin
Ustağelebi'ye teşekkür boręlu olduğumu belirtmek
isterim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa No.

I. GİRİŞ	1
I.1. GENEL OLARAK LEKTİNLERLE İLGİLİ BİLGİ	1
I.2. CONCAVALİN A	2
I.2.1. Saflaştırılması ve Özellikleri	2
I.2.2. Biyolojik Aktivite	2
I.2.3. Con A'nın Yapısını ve Etkinliğini Etkileyen Faktörler	3
I.2.3.1. pH'nın etkisi	3
I.2.3.2. Sıcaklığın etkisi	3
I.2.3.3. İyonik gücün ve Tuzların etkisi	4
I.2.3.4. Denatüre edici ajanların etkisi	4
I.2.3.5. Metal iyonlarının rolü	5
I.2.3.6. Con A modifikasyonları	5
I.2.3.6.1. Proteolitik parçalanma	5
I.2.4.6.2. Amino gruplarının kimyasal modifikasyonu	5
I.2.4. Con A'nın moleküler yapısı	5
I.2.4.1. Metal iyonlarını bağlama bölgeleri	8
I.2.4.2. Con A'nın karbonhidrat bağlama özgülüğü	8
I.2.5. Con A Türevleri	10
I.3. HÜCRESEL RESEPTÖRLERİN SAYI ve AFİNİTELERİNİN BULUNMASINDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN NOKTALAR	10
I.4. HÜCRE ZARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER	11
I.4.1. Hücre Zarının Önemi	11
I.4.2. Hücre Zarının Yapısı	12
I.4.3. Zar Proteinleri	13
I.4.4. Zar Proteinlerinin İşaretlenmesinde Kullanılan Yöntemler	15
I.4.5. Zar Proteinlerinin Çözünürleştirilmesi	15

I.5. IN VITRO VIRÜS ENFEKSİYONU ve ONKOJENİK TRANSFORMASYONUN ZAR YAPISINA ETKİLERİ	16
I.5.1. Zar Yapısını Etkileyen In Vitro Virüs Enfeksiyonları	16
I.5.2. Zar Yapısını Etkileyen In Vitro Onkojenik Virüs Transformasyonları	17
I.5.3. Transformasyon Sonucu Hücre Yüzeyinde Gözlenen Değişiklikler	19
I.5.4. Normal ve Transformé Hücrelerde Lektin Reseptörlerinin Dinamiği	21
I.6. AMAÇ	23
II. ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	24
II.1. ARAÇ ve GEREÇLER	24
II.2. YÖNTEMLER	25
II.2.1. Hücreler	25
II.2.2. Hücre Kültürleri	25
II.2.3. Hücrelerin Kültür Şişelerinden Sökülmesi	25
II.2.4. Hücrelerin Tripsinle Muamele Edilmesi	26
II.2.5. LU-106 Hücrelerinin Kızamık Virüsü İle Akut Enfeksiyonu	26
II.2.6. Protein Tayinleri	26
II.2.7. Radyoaktivite Sayımları	26
II.2.7.1. Dioksanın Peroksitlerden Arındırılması	26
II.2.7.2. Peroksit Ölçümü	27
II.2.7.3. Bray Sayım Çözeltisinin Hazırlanması	27
II.2.8. ³ H-Con A'nın Hazırlanması	27
II.2.9. Mikrohemaglutinasyon	27
II.2.10. Mikrofüj Tekniği ile Bağlanma Deneyi	28
II.2.11. O-MM ile Yapılan Sökme Deneyleri	28
II.2.11.1. Derişime Bağımlı Sökme Deneyi	28
II.2.11.2. Zamana Bağımlı Sökme Deneyi	29

II.2.12. Asosiyasyon Sabiti (K_a) ve Reseptör Sayısı (N)'nin Hesaplanması	29
III. BULGULAR	31
IV. TARTIŞMA	60
ÖZET	70
KAYNAKLAR	72

I . G İ R İ Ő

I.1. GENEL OLARAK LEKTİNLERLE İLGİLİ BİLGİ :

Alyuvarları ve diğer birçok hücreleri aglutine etme özelliğine sahip proteinler ilk kez Stillmark (1) tarafından bulunmuş ve Sumner (2) tarafından saflaştırılmıştır. Bu aglutininler doğada bulunan bitkilerin özellikle de baklagillerin tohumlarında bulunmaktadır. Ancak diğer bir çok bitkinin kök, yaprak ve dallarında da aglutinasyon yapma özelliğine sahip proteinlere rastlanmıştır (3,4). Bunlara ilaveten salyangoz gibi omurgasızlarda ve balık gibi aşağı sınıf omurgalılarda da bu özelliğe sahip proteinler bulunmuştur (5). Bitkisel aglutininler genellikle phytohemoglutinler veya phytoaglutininler olarak adlandırılmaktadır. Ancak hücreleri aglutine etme özelliğine sahip bu proteinlerin bitkilerden başka organizmalarda da bulunduğunun anlaşılması üzerine bu proteinlere Byod (4) tarafından lektin adı verilmiştir.

Lektinlerin çeşitli kan gruplarına özgüllükleri, kan gruplarının sınıflandırılmasında, yeni kan gruplarının tanımlanmasında ve kan gruplarının yapısal olarak irdelenmesinde kullanılmaktadır. Lektinlerin bu özelliğinin yanı sıra mitojenik etkinliğinin olması ve bu özelliği ile lenfositleri transforme etmesi transformasyon mekanizması çalışmalarında lektinleri önemli bir araç haline getirmiştir. Ayrıca lektinlerin hücre yüzeyine bağlanmalarının bazı basit şekerlerle özgül olarak inhibe edilmesi,

lektinlerin hücre yüzeyindeki sakkaritlere özgül olarak bağlandığını ortaya çıkarmış; bu bulgu, hücre yüzeylerinin yapısını aydınlatmak için yapılan çalışmalarda lektinleri önemli bir araç haline getirmiştir.

Bugüne kadar çeşitli kaynaklardan bir çok lektin izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Ancak bunlar içinde Concanavalin A, üzerinde en fazla araştırma yapılan ve özellikleri en fazla bilinenidir.

I.2. CONCAVALIN A

I.2.1. Saflaştırılması ve Özellikleri :

İlk kez 1916 da Canavalia Ensiformis'ten Concanavalin A'nın izolasyonu Jones ve Johns (6) tarafından gerçekleştirilmiştir. Canavalia Ensiformis taneciklerinin tuz ekstraksiyonundan elde edilen globulin fraksiyonunun amonyum sülfatta farklı çözünürlüğe sahip iki fraksiyondan oluştuğu gözlenmiştir. Canavalin adı verilen ana fraksiyon ancak doymuş amonyum sülfatta çökerken daha az olan ikinci fraksiyonun % 60 amonyum sülfatta çöktüğü saptanmıştır. Bu fraksiyona da Concanavalin adı verilmiştir. Sumner (2) ise Concanavalin fraksiyonunu kristalize olabilen iki kısma ayırmayı başarmıştır. Bu fraksiyonlardan biri % 10'luk NaCl çözeltisinde kısmen çözülürken, ikincisinin ancak derişik NaCl çözeltisinde çözünebildiği gözlenmiştir. Bu fraksiyonlardan birincisine Concanavalin B, ikincisine ise Concanavalin A adı verilmiştir.

Daha sonra geliştirilen afinite kromatografisi teknikleri ile Concanavalin A saf olarak 100 g. tanecikten 2-3 g. olarak elde edilebilmiştir (7,8,9).

I.2.2. Biyolojik Aktivite

Saflaştırılan Con A'nın biyolojik aktivitesinin olup olmadığı çe-

şitli yöntemlerle araştırılabilir. Ancak en çok kullanılan yöntem 2x seri seyreltmelerle, lektinin eritrositlere karşı hemaglutinasyon aktivitesini takip etmektir (10).

I.2.3. Con A'nın yapısını ve etkinliğini etkileyen faktörler

I.2.3.1. pH'nın etkisi

Con A ile yapılan aglutinasyon ve presipitasyon tepkimelerinde maksimum aktivite pH'nın 6-7 arasında olduğu zaman gözlenmiştir (2,9), ki bu aralıkta Con A tetramer yapıdadır (16). Bu da bu tip tepkimelerde Con A'nın tetramer yapıda olmasının gerekliliğini göstermektedir. Ayrıca α -D-glukoz, α -D-mannoz gibi şekerlerin p-nitrophenylglikozit türevlerinin pH = 2.4'te Con A ile bağlanması, bu pH'da dimer yapıda olan Con A'nın da şekerlere bağlanabilme özelliğini kısmen koruduğunu göstermektedir (17).

Con A'nın maksimum etkinlik gösterdiği pH aralığında molekül genellikle β -konformasyonda bulunmakta, α -heliks kısımlar bulunmamaktadır (14). Daha yüksek pH'larda Con A inaktif bir durumdadır ve konformasyonu tersinmez bir şekilde düz zincir halindedir (14).

I.2.3.2. Sıcaklığın etkisi

Con A'nın biyolojik etkinliği sıcaklık ile önemli bir şekilde etkilenmektedir. Sıcaklığın 20°C veya 37°C den 0°C veya 4°C'ye indirilmesi Con A'nın insan alyuvarlarını (18) veya transforme hücreleri aglutine etmesini (19) etkilediği gözlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda az miktarda transforme hücrenin aglutine olmasına rağmen elektron mikroskopik çalışmalar, bağlanmanın gerçekleştiğini göstermiştir (19). Bu çalışmalar sonucunda düşük sıcaklıklarda Con A'nın dimer yapıda, yüksek sıcaklıklarda ise tetramer yapıda olduğu ve aglutine olmuş hücrelerin çökebilmesi için Con A'nın tetramer yapıda olması gerektiği anlaşılmıştır. Ayrıca aglutinasyon

olayının iki aşamada gerçekleştiği; Con A'nın hem dimer hem de tetramer yapılarının aynı derecede etkili olduğu, monovalan bağlanma olayının birinci aşama, aglutine olmuş hücrelerin çökmesinin de ikinci aşama olduğu anlaşılmıştır. İkinci aşamada Con A'nın tetramer yapısının polivalan özelliği sayesinde hücreleri reseptörleri aracılığı ile birbirine bağlandığı ve böylece çökmelerini sağladığı sanılmaktadır.

40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda glikojen-Con A kompleksinin dissosiyasyonu, Con A molekülündeki bağlanma bölgelerinin sıcaklığa duyarlı olduğunu ve bağlanma olayının hidrojen bağlarını içerdiğini göstermiştir (20).

I.2.3.3. İyonik gücün ve tuzların etkisi

Con A molekülünün stabilitesinde çevrenin iyon gücünün etkisinin olduğu görülmüştür. Con A'yı stabilize etmek için en az 0.3 iyonik güce gereksinim vardır. Bu iyonik güçte Con A esas olarak dimer yapıdadır. Daha yüksek iyonik güç ($I = 1.0$) Con A molekülünü hem stabilize etmekte, hem de Con A'nın tetramer yapıda olmasını sağlamaktadır.

I.2.3.4. Denatüre edici ajanların etkisi

Yüksek derişimde üre, guanidin hidroklorid, formamid ve 1,1,3,3-tetrametil üre gibi denatüre edici ajanlarla muamele sonucunda Con A sakkarit bağlama özelliklerini yitirmektedir. Ancak etkinlikteki bu kaybolma dissosiyasyondan ziyade konformasyonda meydana gelen tersinmez değişikliklerden ileri gelmektedir. Çünkü Con A'yı alt birimlerine dissosiyeye etmek için gerekli üre veya guanidin derişimlerinin çok altındaki derişimlerde bile Con A sakkarit bağlama etkinliğini kaybetmektedir (21).

I.2.3.5. Metal iyonlarının rolü

İlk kez Sumner ve Howell (11) Con A'nın etkinliği için metal iyonlarına gereksinim olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar yaptıkları deneyde seyreltik asit çözeltisinde Con A'yı diyaliz ettiklerinde etkinliğin kaybolduğunu; ortama Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} veya Mg^{+2} tuzların konduğunda etkinliğin tekrar normale döndüğünü gözlemişlerdir.

I.2.3.6. Con A modifikasyonları

I.2.3.6.1. Proteolitik parçalanma

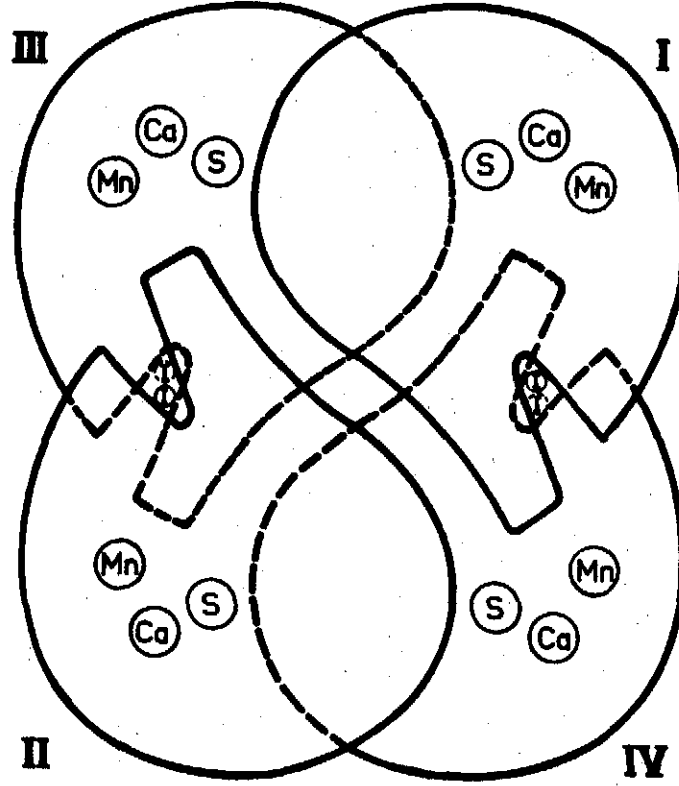
Con A, pepsin, kemotripsin, papain ve pronaz gibi proteolitik enzimlerle muamele edildiği zaman etkinliğini çok kısa sürede kaybetmektedir. Ancak tripsinin etkisinin çok yavaş olduğu saptanmıştır (2).

I.2.3.6.2. Amino gruplarının kimyasal modifikasyonu

Con A'nın lizinlerinin ϵ -amino grupları tamamen asetillenebilmektedir ve bu asetillenme sonucunda Con A'nın biyolojik aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır (22). Ayrıca Con A'nın asetik anhidridle asetilasyonu esnasında tirozinin fenolik gruplarının yaklaşık % 30'u da asetillenmektedir. Ancak bu asetillenmenin de Con A'nın biyolojik etkinliği üzerinde bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (22).

I.2.4. Con A'nın moleküler yapısı

Fizyolojik pH'da tetramer yapıda olan Con A, her biri 237 amino asit içeren 4 alt birimden meydana gelmektedir (23). Ayrıca her alt birim bir kalsiyum iyonu, bir mangan iyonu, bir de mannoz-, glukoz- veya fruktoz- gibi sakkarit molekülü bağlama bölgesi içerdiği anlaşılmıştır (13).



ŞEKİL 1 : Con A tetramerinin şematik çizimi. Dört alt birim kalın çizgilerle gösterilmiştir. Ca^{++} , Mn^{++} , -(O-iyodofenil)-D-glukopiranozit ve özgül sakkarit bağlama bölgeleri sırasıyla Ca, Mn, β -IPGlc ve S olarak gösterilmiştir. Romen 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).

Polipeptit zinciri çok sıkı katlanmış bir elipsoit şeklinde olup $40 \times 39 \times 42 \text{ \AA}^0$ boyutlarındadır.

Diğer bir çok lektinin aksine Con A hiç karbonhidrat içermemektedir. Ayrıca proteinin yapısında lipid, nükleik asit veya başka prostetik gruplar da yoktur. Bundan ötürü 237 amino asit ve 2 metal iyonu Con A proteini meydana getirmektedir (24,25).

Amino asit dizisi analizleri sonucunda, en fazla bulunan amino asidin serin (% 13.1) olduğu görülmüştür. Ortaya çıkan amino asit kompozisyonu, fizyolojik pH'da eksi yüklü amino asitlerin sayısının artı yüklülerden daha fazla olduğunu göstermiştir.

Tablo 1. Concanavalin A'nın Amino asit kompozisyonu

Amino Asit	Sayı (Toplam 237 a.a.)
Lys	12
His	6
Arg	6
Trp	4
Asn	12
Gln	5
Asp	20
Thr	19
Ser	31
Glu	7
Pro	11
Gly	16
Ala	19
Val	16
Met	2
Ile	15
Leu	18
Tyr	7
Phe	11

Becker, J.W., Reke, G.N., Jr., Cunningham, B.A. ve Edelman, G.M., Nature 259, 406 (1976).

I.2.4.1. Metal iyonlarının bağlama bölgeleri

Agrawal ve Goldstein (12), Kalb ve Levitzki (13) adlı araştırmacılar Con A'nın iki değerlikli iyonları iki ayrı bölgeye bağladığını; bunlardan S_1 bölgesine Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Co^{+2} , S_2 bölgesine ise Ca^{+2} bağlandığını gösterdiler.

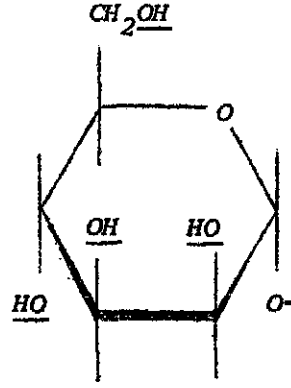
Her Con A protomeri birbirinden 5 \AA uzaklığında Mn^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarını içerir.

Elektron spin rezonans (14), circular dichroism, elektron paramagnetik rezonans (15) yöntemleriyle yapılan çalışmalar sakkarit bağlama bölgesinin doğrudan Ca^{++} iyonuna bağımlı olmadığını ancak kalsiyumun S_2 bölgesine bağlanmasının S_1 bölgesinin çevresinde meydana getirdiği değişikliklerin sakkarit bağlama bölgesinin oluşmasına neden olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Ayrıca yapılan diğer çalışmalar Mn^{+2} iyonunun Ca^{+2} dan daha önce bağlanması gerektiğini ve Ca^{+2} iyonunun da Mn^{+2} iyonunun bağlanma hızı üzerinde büyük etkisi olduğunu göstermiştir (26). Mn^{+2} iyonunun bağlanması zincirin NH_2 - terminalini öyle bir şekle getirmektedir ki Ca^{+2} iyonunun bağlanması için gerekli bölgeler oluşmaktadır. Buna karşın Ca^{+2} iyonu hidrojen bağları ve koordinasyon ilişkileri içinde yer almakta, böylece zincirin COOH-terminal bölgelerini NH_2 -terminal yakınındaki metal bağlayıcı grupların yanına getirmektedir (27).

I.2.4.2. Con A'nın karbonhidrat bağlama özgülüğü

Yapılan X ışını kristalografik analizleri (28) ve nmr spektroskopisi çalışmaları sonucunda (29) Con A bağlama bölgesinin en çok α -D-mannopiranozit ile uygunluk gösterdiği anlaşılmıştır (30). Şekil 2 de α -D-mannopiranozitin yapısı görülmektedir.



Şekil 2. α -D-Mannopiranozil biriminin yapısı. Altı çizili hidroksil grupları bağlanmadan sorumlu olan hidroksil gruplarıdır.

Yapılan çalışmalar OMM'in C-3, C-4 ve C-6 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının bağlanmadan sorumlu olduğunu ve bunlarda yapılan değişikliklerin (deoksi veya O-metil eter gibi), Con A molekülü ile bağlanmayı tamamen engellediğini göstermiştir (30). Ayrıca, yapılan çalışmalar furanoid şekerlerin de Con A'ya bağlandıklarını ortaya koymuştur. Con A'nın bazı inhibitörleri ve inhibisyon potansiyelleri Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.

Inhibitör Şeker	Inhibisyon Potansiyeli
Metil α -D-mannopiranozit	100
Metil α -D-glukopiranozit	24
D-Mannoz	13.6
D-Glukoz	2.9
Sukroz	2.6
Laktoz, Melibioz, D-galaktoz, D-Riboz, D-Ksiloz, N-Asetil-D- galaktozamin	0

Foretz, D.R. ve Goldstein, I.J., Biochem, 9, 2890 (1970).

I.2.5. Con A Türevleri

Daha önce de belirtildiği gibi Con A, şeker içeren reseptörler aracılığı ile bir çok hücre ile özgül bağlanma özelliğine sahip bir protein molekülüdür. Con A'nın bu özelliğini gözönünde tutan araştırmacılar floresin, ferritin, hemosiyanin ve peroksidaz ile konjuge Con A türevleri ve ³H-asetilasyon, ¹⁴C-süksinilasyon, ¹²⁵I-iyodinasyon ve ⁶³Ni- ile elde edilen radyoaktif Con A'lar sayesinde hücrel reseptörlerin tanımlanması, saflaştırılması, reseptör bölgesinin mobilitesi, reseptörlerin sayıları ve dağılımı konusunda araştırmalara büyük önem vermişlerdir (31,32,33,34).

I.3. HÜCRESEL RESEPTÖRLERİN SAYI ve AFİNİTELERİNİN BULUNMASINDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN NOKTALAR :

Lektinler, hormonlar gibi çeşitli ligandlarla hücre yüzeyinde bulunan reseptörler arasında ilişki giderek daha fazla sayıda araştırmacının dikkatini çekmektedir.

Hücre yüzeyindeki reseptörlerle ligandlar arasındaki bağlanma deneylerinin sağlıklı sonuçlar vermesi için bazı noktaların gözönünde tutulması gerekmektedir. Bunlar :

- a) Bağlanma deneyleri izole plazma zarları yerine sağlam canlı hücrelerde yapılmalıdır. Ölü hücreler hesaplamalardan çıkarılmalıdır,
- b) Ligand-reseptör ilişkisini etkileyecek santrifügasyon, yıkama, fiksasyon gibi uygulamalardan kaçınılmalıdır,
- c) Deney esnasında hücreler fizyolojik ortamda bulunmalıdır. Bağlanmayı olumlu veya olumsuz şekilde etkileyebilecek katkılardan kaçınılmalıdır.
- d) Bağlanacak ligandın, bağlanma bölgelerini doyuracak derişimden çok daha aşağı derişimlerde de ölçülebilir olması gerekmektedir,

e) Ölçümlerin duyarlılığı ve tekrarlanabilinir yöntemlerle yapılması ve buradan alınacak sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olması gerekmektedir,

f) Ligand moleküllerinin hücre içine girişi (endositoz) engellenmelidir,

g) Bağlanma özgül olmalıdır Diğer bir deyişle, bağlanma izotermi doygunluk kinetiği göstermelidir. Ayrıca işaretli ligant molekülleri kompetitif bir şekilde işaretlilerle yer değiştirmeli veya lektin çalışmalarında inhibitör haptent, lektinle hücre yüzeyindeki reseptörler için yarışmalıdır,

h) İşaretlenmiş ligandlar biyolojik etkinliklerini korumalıdır.

Bağlanma deneylerinde tekrarlanabilinir, sağlıklı sonuçların alınması, ancak yukarıda sayılan durumların sağlanması ile elde edilebilir.

I.4. HÜCRE ZARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER

I.4.1. Hücre Zarının Önemi

Sayılamıyacak kadar çok bulgu hücre yüzeyinin; hücre büyümesinin kontrolü, hücre bölünmesi, gelişmesi, hücreler arası iletişim, hücre farklılaşması ve hücrenin ölümü gibi olaylardan birinci derecede sorumlu olduğunu ortaya koymuştur.

Hücrenin çevresi ile olan ilişkilerinin, herhangi bir uyarıya karşı cevabın sağlanmasında plazma zarının görevi büyüktür. Bu yüzden bu organel bilhassa son 75 yılda bir çok araştırmanın ana konusu olmuşsa da ancak bu konuda kayda değer gelişmeler son 10 yılda gerçekleşmiştir. Ayrıca kanser biyolojisinde tümör hücrelerinin yüzeyinin ve plazma zarının konak immün cevabından kaçmada, metastazda görev yaptığı saptanmıştır (35).

Bu nedenlerden hücre zarının kompozisyonu, bileşenlerinin sentezlerini, yıkımlarını, etkinliklerini incelemek, virus enfeksiyonu veya onkojenik transformasyon gibi olaylarda zarıdaki olan değişiklikleri saptamak konusunda son derecede önemli bir rol oynamaktadır.

I.4.2. Hücre Zarının Yapısı

1972'de Singer ve Nicholson (36) tarafından biyolojik zarların yapısı konusunda bir model önerilmiştir. Sıvı mozaik model adı verilen bu modele göre, biyolojik zarlar asimetrik fosfolipid çift tabakalarından oluşmakta ve fizyolojik şartlarda bu çift tabaka sıvı halde bulunmaktadır. Yine bu modele göre lipidlerin polar uçları dıştaki sulu ortama yönelirken, hidrofobik kısımları zarın omurgasında apolar bir çevre oluşturmaktadır. Bir çok protein ve glikoprotein asimetrik olarak çift tabakada yer alarak, onun devamlılığını bozmakta ve böylece zara bir mozaik görünümü vermektedir. Zaral proteinlerin ve glikoproteinlerin yapıları oldukça heterojen bir görünümündedir. Çift tabakanın yüzeyinde bulunan çevresel proteinler ve glikoproteinler biyolojik zarın yüzeyine hidrofobik olmayan iyonik etkileşimler veya iyonik olmayan Van der Waals ve London dispersiyon kuvvetleri gibi zayıf bağlarla bağlıdırlar. Bundan ötürü sonikasyon veya iyonik şiddetin değiştirilmesi gibi yumuşak yöntemlerle çift tabakadan kolayca uzaklaştırılabilirler. Integral proteinler ise çift tabakaya kısmen veya tamamen gömülmüş proteinlerdir. Tamamen gömülmüş olanların, zarın hem dış hem de iç yüzünde uzantıları vardır. Integral proteinler globüller, anfipatik moleküller olup zarın hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımları ile ilişkiindedirler. Bu proteinler duragan bir lipid tabakası ile çevrili durumdadırlar. Bu lipid tabakası organik çözücüler ve deterjanlarla muamele sonucunda bile protein kısmına bağlı olarak kalmaktadırlar. Yine bu modele göre zarın bileşenleri olan fosfolipidler ve protein-

ler zar düzleminde lateral bir mobiliteye sahiptirler. Lipid kısım sıcaklığa bağlı olarak bir faz ayrışmasına uğramakta bu ayrışmada proteinlerin dağılımını önemli bir şekilde etkilemektedir. Yapılan çalışmalar faz geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda zarsal proteinlerin dağınık olarak bulduklarını, geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda ise toplanmış (clustered) durumda olduklarını göstermiştir (37). Böylece lipidin fiziksel durumunun zarsal proteinlerin etkinliğini önemli bir şekilde etkilediği ortaya çıkmıştır.

Zardaki asimetriyi çok büyük termodinamik engel sağlamakta böylece glikolipidlerin ve glikoproteinlerin polar kısımlarının ve diğer hidrofilik moleküllerin zarın hidrofobik matrisine geçişleri önlenmektedir. Bu şekilde zarın yüzeyinde hormonlar, viruslar ve lektinler için gerekli reseptörlerin oluşması sağlanmaktadır.

I.4.3. Zar Proteinleri

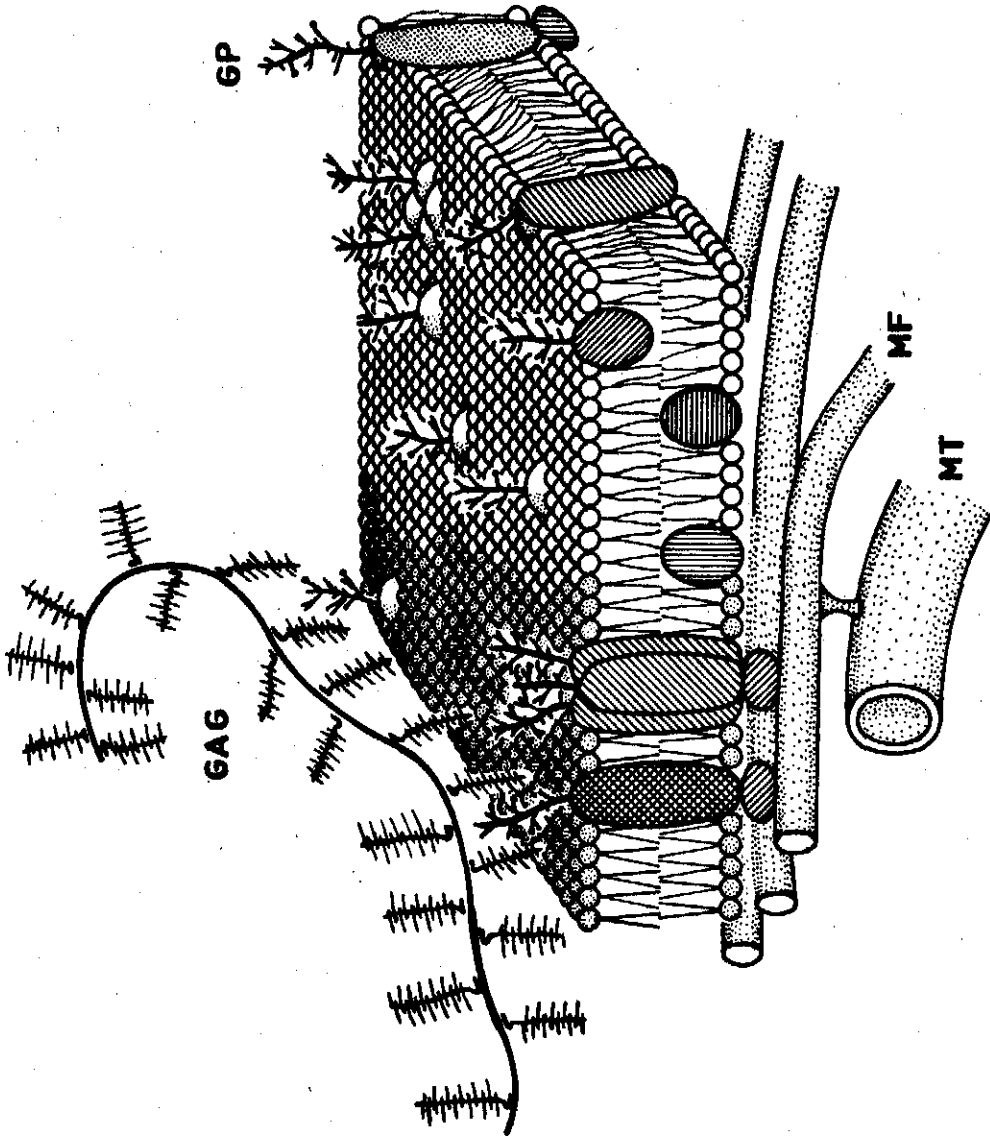
Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli zarlardan saflaştırılan proteinler aşağıda gösterilmiştir.

Eritrosit Zarı Proteinleri : Glikoforin, 3.band glikoproteini, Asialoglikoforin.

Lenfosit plazma zarı proteinleri : Komponent 5.1, Thy-1 Antijeni, HLA, H-2K, H-2D, IgD, IgM. Con A reseptörü

Nöral glikoproteinler : Sinaptik zar glikoproteinleri, Asetilkolin reseptörü, Alkalen fosfataz.

Normal ve Transforme hücre zar proteinleri : Galaktoprotein a (LETS proteini), galaktoprotein b, miyozin, kollajen, MP-1, SF-145, TSSA, Aktin, Ω , Δ



ŞEKİL 3 : Plazma zar yapısının temsili şekli. Şekilde glikoproteinler (GP) ile glukozaminoglikanlar (GAG) arasındaki olası ilişkilerde gösterilmiştir. Ayrıca glikoproteinler ile hücre yüzey reseptörlerinin mobilitesinin ve dağılımının kontrolünde görev yapan mikrotübül (MT) ve mikrofilamentler (MF) arasındaki ilişkiler de gösterilmiştir. (Lotan, R., ve Nicolson, G.L., Biochem. Biophys. Acta., 559, 329 (1979)).

I.4.4. Zar Proteinlerinin İşaretlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Transformasyon sonucu hücre zarında meydana gelen değişikliklerin incelenmesi bir çok araştırmanın konusu olmaktadır (38,39,40,41). Bu değişiklikleri incelemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan biri hücre yüzeyi protein ve glikoproteinlerini radyoaktif işaretleme yöntemidir. Bunun için çeşitli teknikler kullanılmakla beraber en bilineni laktoperoksidaz kalalizli iyodinasyon tekniği ile hücre yüzeyindeki proteinlerin histidin ve tirozinlerinin ^{125}I - veya ^{131}I - ile işaretlenmesidir (42). Hücre yüzeyindeki proteinleri ^3H - ile işaretlemek için kullanılan bir yöntemde ise önce proteinlerin piridoksal fosfat ile Schiff bazı oluşturmaları sağlanmakta daha sonra sodyum (^3H) borohidrit ile indirgeyerek işaretleme gerçekleştirilmektedir (43). Hücre yüzeyi çalışmalarında kullanılan bir başka yöntem ise yüzeyde bulunan karbonhidrat gruplarının işaretlenmesidir. Bu işaretleme ya sialik asitlerin IO_4^- ile oksidasyonu sonucu oluşan aldehit gruplarının ^3H -borohidrit ile indirgenmesi (44) veya galaktozil veya N-asetil galaktozaminil gruplarının önce galaktoz oksidaz ile yükseltgenmesi ve sonra ^3H -borohidrit veya ^{35}S -metionin sulfone hidrazit ile indirgenmesiyle gerçekleştirilmektedir (45,46).

Bir başka zar işaretleme yöntemi de doku kültürlerinin metabolik olarak ^3H -fukoz veya ^3H -glukozamin ile işaretlenmesidir (47).

I.4.5. Zar Proteinlerinin Çözünürleştirilmesi.

Zarsal glikoproteinler natif hallerinde sulu tampon çözeltileri ile ekstre edilemezler. Bundan dolayı integral proteinleri izole edebilmek için önce protein-lipid ve protein-protein ilişkilerini bozmak gerekmektedir. Bu tip ilişkilerden hem hidrofobik hem de iyonik kuvvetler sorumlu olduğu için her iki tip kuvvetide etkileyebilecek ajanlara gereksinim

vardır. Bu işlem için en başarılı ajanlar deterjanlardır. Triton X-100 ve Nonidet P-40 gibi iyonik deterjanlar, dimetildodesilglisin gibi Zwitter iyonik deterjanlar, sodyum deoksikolat, lityumdiodosalisilat, sodyum dodesilsulfat gibi aniyonik veya dodesiltrimetilamonyum bromid gibi katyonik deterjanlar kullanılabilir (48).

Bu şekilde çözünürleştirilen zarsal proteinler ve glikoproteinler jel filtrasyonu, iyon-değiştirici kromatografisi veya afinite kromatografisi gibi yöntemlerle saflaştırılabilirler (49).

I.5. IN VITRO VİRUS ENFEKSİYONU ve ONKOJENİK TRANSFORMASYONUN ZAR YAPISINA ETKİLERİ

I.5.1. Zar Yapısını Etkileyen İn Vitro Virus Enfeksiyonları.

Viruslar enfekte edip üredikleri hücrelerden otolizis veya tomurcuklanma ile olgunlaşırlar. Otolizis ile olgunlaşan viruslar "çıplak" olarak adlandırılırlar ve basit olarak nükleik asit ve onu çevreleyen protein kılıfı (kapsit) içerirler. "Çıplak" virus enfeksiyonunda konak hücre parçalanmış ve mutlaka bu enfeksiyon hücre için ölümle sonuçlanmıştır. Ancak bazı viruslar enfekte ettikleri hücrelerin zar yapısına replikasyonları sırasında bazı viral proteinleri yerleştirirler. Bu tür virus-konak hücre ilişkisi daha uzun ömürlüdür. Çünkü nükleik asit ve kapsit yapısına ilaveten virüs hücreden çıkarken kendi proteinleri ile değiştirdiği hücre zarından bir zarf alır. Olgunlaşması tomurcuklanma ile olan bu viruslara "zarflı" viruslar adı verilmiştir.

İnsanlarda enfeksiyon yapan pek çok viruslar zarflı viruslardır ve in vitro olarak enfekte ettikleri hücrelerden tomurcuklanma ile olgunlaşırlar. Buna en güzel örnek miksovirus grubunda yer alan viruslardır. Bu grupta bulunan kızamık virusu, üzerinde in vitro çalışmalar yapılmakta olan model bir sistem oluşturur (50).

Kızamık akut seyreden, döküntülü bir çocukluk çağı enfeksiyonudur. Ancak son yıllarda kızamık virusunun bazı nörolojik hastalıklara da neden olduğu anlaşılmıştır. Bunlardan subakut siklerozan pan ensefalit (SSPE) primer kızamık enfeksiyonundan 2-4 yıl sonra ortaya çıkan ve merkezi sinir sistemini etkileyen bir hastalıktır. Primer kızamık enfeksiyonundan uzun bir süre sonra kişide SSPE oluşması bunun kronik bir enfeksiyon olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (51,52,53). Ancak virusun primer enfeksiyondan sonra geçen sürede konakta ne şekilde latent olarak kaldığı ve hastalığı hangi mekanizma ile oluşturduğu tüm açıklığı ile bilinmemektedir. Hastalık sırasında en önemli bulgu demiyelinizasyon olayının saptanmasıdır. Demiyelinizasyonda virusla enfekte nöronların konak immün cevabına bağlı olarak geliştiği sanılmaktadır (53).

Bu tür kronik enfeksiyonu en iyi çalışma in vitro sistemdir. Çünkü kızamık virusu belirli şartlarda akut olarak enfekte ettiği hücrelerde kronik enfeksiyona da neden olabilmektedir. Akut enfeksiyonda tüm virus partiküllerinin hücrede sentez edilmesine karşın kronik enfeksiyonda virusa özgü bir çok proteinin sentezi yapılmakta ancak tüm virus partikülü oluşmamaktadır (54). Kızamık virusu gibi hücreden tomurcuklanma ile olgunlaşan bir virusun kronik enfeksiyonda hücre zarına viral proteinleri yerleştirmesine rağmen olgunlaşamaması ilginçtir. Ancak akut ve kronik enfeksiyonlarda meydana gelen zar değişikliklerinin aynı olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Kronik enfeksiyonda virusun hücre zarında yaptığı değişikliklerin saptanması, kronik enfeksiyon oluş mekanizmasını aydınlatılabilir.

I.5.2. Zar Yapısını Etkileyen İn Vitro Onkojenik Virus Transformasyonları.

Bir virusun onkojenik potansiyeli o virusun in vitro olarak hücreleri trasforme edebilme yeteneğine bağlıdır. Transforme hücre etken virusun

replikasyonunu destekler veya desteklemeyebilir. Örneğin RNA tümör virusları transforme ettikleri hücrelerde üreme yeteneğine sahipken DNA tümör virusları ancak üreyemedikleri hücreleri transforme ederler (55).

Transforme hücre normal hücreden ziyade tümör hücresine özgü bir çok biyolojik özellikler kazanır. Bunlardan en önemlisi hücre zarında meydana gelen antijenik değişikliktir. Bu değişiklik viral gen tarafından sentezlenen tümöre özgül transplantasyon antijeni (TSTA) tarafından oluşturulur (56,57). Viruslarla oluşturulan transformasyonda viral genetik materyal hücre genetik materyaline stabil bir şekilde integre olmuştur. Hücrede meydana gelen tüm onkojenik transformasyondan en fazla 3-5 viral gen sorumludur. Bu viral genlerin ve sentez ettikleri transformasyon proteinlerinin tanımlanması çalışmaları sürmektedir. Ancak tümör hücresinin zar yapısını etkileyen proteinin transformasyondaki önemi oldukça fazladır. Zarda meydana gelen değişiklikler; kontakt inhibisyonun kaybolması, hücre morfolojisinin değişmesi, yumuşak agarda üreyebilme yeteneğinin kazanılması ve hücre çeperi özelliklerinin değişmesi olarak tanımlanırlar. Normal ve transforme hücre arasındaki zar farklılıkları çeşitli yöntemlerle saptanabilir. Onkojenik DNA viruslarından polyoma virusu bu tür değişikliklerin araştırılması için model bir sistem oluşturmaktadır. Polyoma virusunun doğal konakçısı fare dir ve farede çeşitli organlarda değişik tip tümörlerin oluşmasına neden olur. Ancak polyoma virusu in vitro üreyemediği hamster ve sıçan hücrelerini transforme edebilme yeteneğine sahiptir. Bebek hamster böbrek devamlı hücre kültürü olan BHK/C13 hücreleri polyoma virusu ile yüksek sıklıkta transforme edilebilmekte ve in vitro transformasyon mekanizmasının irdelenmesi için uygun bir sistem olarak kabul edilmektedir (58).

I.5.3. Transformasyon Sonucu Hücre Yüzeyinde Gözlenen Değişiklikler

Tümör hücrelerinin veya *in vitro* transforme hücrelerin yüzeyinde normal hücreden farklı bir takım değişiklikler olduğu çeşitli araştırmalar sonucunda saptanmıştır (38,39,40,41).

Bütün hücrelerde önemli yüzey bileşenleri proteinler, glikoproteinler, lipidler, glikolipidler ve glukozaminoglikanlardır (Şekil 3). Bunların bir kısmı hücre yüzeyinde antijen veya tanıma bölgeleri olarak görev yapmaktadırlar.

Yapılan araştırmalar sonucunda bazı tümörlerin özellikle de insan kolon, mide, göğüs tümörlerinin normal dokulara göre daha fazla sialik asit içerdiği saptanmıştır (59). Buna karşın transforme hücre kültürlerinde bunun tersi gözlenmiştir. Diğer bir deyişle kültür hücrelerinde transformasyon sonucu zar sialik asit miktarında bir düşüş bulunmuştur (60). Bundan ötürü hücre yüzeyi sialik asit miktarındaki değişim neoplastik durum için genel bir özellik olamamaktadır.

Hücre yüzeyindeki en önemli karmaşık karbonhidratlar heksozaminler ve heksuronik asit içeren glukozaminoglikanlardır. Bir çok araştırma transformasyon sonucu bu yapılarda değişiklik olduğunu bildirmektedir (61,62). Çeşitli viruslarla transforme edilmiş hücrelerin normallerine göre hyalüronik asit sentez hızlarının ve hücre yüzeyi hyalüronik asit miktarlarının daha fazla olduğu gözlenmiştir (63). Ayrıca transforme hücrelerde sülfatlanmış glukozaminoglikan sentezinin normallere göre daha düşük olduğu da saptanmıştır (61).

Çeşitli tümörlerde ve transforme hücrelerde zar lipid ve glikolipid kompozisyonlarında genel değişiklikler olduğu bulunmuştur. Bir çok malign insan tümöründe kolesterol ve fosfolipid miktarlarının normal

dokuya veya benign lezyonları göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Inbar ve Shinitzky (64) adlı araştırmacılar ise murine ascites lenfoma plazma zarlarının kolesterol miktarının zarın akışkanlığını ayarlaması ile büyümeyi kontrol edici bir işlevi olduğunu gözlemişlerdir.

Transformasyona bağlı olarak glikolipidlerde görülen değişiklikler konusunda geniş çalışmalar yapılmıştır (65). Hamster NIL fibroblast hücrelerinin çeşitli viruslarla transforme edilmesi sonucunda glikolipidlerde gözlenen değişiklikler şu şekilde genelleştirilebilir : a) Karmaşık glikolipidlerde azalma ile beraber terminal sakkarit ünitelerinde kopma, b) glikolipid sentezinin terminal sakkaritlerin katılması sonucu yüzeyel dokunma uzantılarına cevabındaki eksiklik, c) Enzim, antikor ve lektinlerin bağlanma özelliğindeki artış (66,67).

Transformasyondan sonra hücre yüzeyinde gözlenen en önemli değişiklikler çeşitli işaretleme yöntemlerine duyarlı protein ve glikoproteinlerin hücre yüzeyindeki durumları ile ilgilidir (40). Daha önce de belirtildiği gibi laktoperoksidaz katalizli ¹²⁵I-iyodinasyon veya galaktoz oksidaz katalizli ³H-borohidrit işaretleme yöntemleri ile işaretlenen sağlam hücre yüzeyleri daha sonra deterjanlarla çözünürleştirilerek sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezine uygulandıkları zaman transforme hücre yüzeyi protein ve glikoproteinlerinde normalere göre bazı farklılıklar saptanmıştır.

Bu değişikliklerin en önemlisi transforme hücre yüzeyinde moleküller ağırlığı yaklaşık 220.000-250.000 olan bir glikoprotein bulunmamasıdır. Normal hücrede bulunan bu glikoproteine 250 K yüzey proteini, L₆TS proteini, I komponenti, Z komponenti, galaktoprotein a veya CSP adları verilmektedir (40,68,69,70). Bu glikoprotein transforme hücrelerde bulunmamasının nedeninin sentezinin bloke olması veya öldürücü olmayan sürekli proteoliz olduğu düşünülmektedir (40).

Benzer tekniklerle yapılan çalışmalar sonucunda normal fibroblastlarda bulunan 210.000 molekül ağırlığında bir yüzey antijeninin (SF antijeni) Rous Sarcoma virusu ile enfekte hücrelerde olmadığı gözlenmiştir (71). Proteolitik enzimlere duyarlı olan bu antijenin 210.000, 145.000 ve 45.000 molekül ağırlığında 3 polipeptitten oluştuğu ve ilginç olarakta 45.000 molekül ağırlığındaki kısmın (SF 45) elektroforetik olarak saflaştırılmış fibroblast aktini ile beraber hareket ettiği gözlenmiş ve SF antijeninin zar aktini ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (71). Ayrıca normal ve tümör hücrelerinin yüzeylerinden proteolitik enzimler aracılığı ile uzaklaştırılan glikoproteinlerin sefadeks jel kromatografileri sonucunda transformasyona bağlı değişiklikler saptanmıştır (72).

Transformasyon sonucu yüzey enzimlerinde de bazı değişikliklerin olduğu bildirilmiştir. Bu değişiklik en belirgin olarak yıkım enzimlerinde görülmektedir. Transformasyon sonucu oligosakkarit hidrolitik enzimlerin veya glikozidazların değiştiği söylenmektedir. Bosmann ve Hall adlı araştırmacılar insan normal ve malign dokularında yaptıkları çalışmalarda, malign dokularda normallere göre daha yüksek β -galaktozidaz, α -mannozidaz, nörominidaz ve asit proteaz seviyeleri bulmuşlardır (73).

I.5.4. Normal ve Transformé Hücrelerde Lektin Reseptörlerinin Dinamiği.

Tümör hücrelerinin veya transformé hücrelerin en bilinen özelliği, bu hücrelerin normallerine göre daha düşük lektin derişimlerinde aglutine olabilmelidir (31, 32, 74, 75, 76). Ancak transformé hücrelerinin lektinlerle daha kolay aglutine olmalarına karşın bu hücrelerin içerdiği lektin reseptörlerinin sayısı hakkında birbiri ile çelişkili görüşler ileri sürülmektedir. Bazı araştırmacılar lektin reseptörlerinin sayısında bir değişiklik olmadığını ileri sürerken (77, 78), Noonan ve Burger adlı araştı-

ricılar transforme veya proteaz ile muamele edilmiş hücrelerin normallere göre bir kaç kat daha fazla lektin reseptörüne sahip olduklarını bildirmişlerdir (79). Bu araştırmacılar diğerlerinin lektin reseptörlerinin sayılarında bir fark bulamamalarını onların kullandıkları yöntemlerin yüksek düzeyde endositoz içermesine bağlamaktadırlar. Nicolson ve arkadaşları ise normal, vahşi tip py BHK ve sıcaklığa hassas polyoma ile transforme BHK (ts3-PyBHK) hücreleri ile yaptıkları çalışmalar sonucunda pyBHK ve ts3-PyBHK hücrelerinin normallere göre daha düşük lektin derişimlerinde aglutine olmalarına karşın, daha az miktarda ¹²⁵I işaretli Ricinus communis aglutini (¹²⁵I-RCA_I) bağladığını görmüşlerdir (80).

Floresan mikroskobisi ve elektron mikroskopik yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda lektin reseptörlerinin dağılımı, transforme ve normal hücrelerdeki mobiliteleri konularında detaylı bilgi elde edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda transforme hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin normallere göre daha toplanmış (Clustered) bir dağılım gösterdiği saptanmıştır (81). Ancak daha sonra yapılan çalışmalar transforme hücrelerde gözlenen lektin bağlama bölgelerinin devamlı olmayan lokalizasyonunun dağınık reseptörlerin lektin ile indüklenebilen toplanmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır (19,79). Yine bu konuda yapılan çalışmalar lektin reseptörlerinin yüzeyde toplanmış olarak dağılımının, zar düzleminde lektin-reseptör difüzyonunun polivalan lektin moleküllerinin ilave lektin bağlama bölgeleri ile çapraz bağlanma yapmasından dolayı meydana geldiğini göstermiştir (19). Hücreler önceden gluteraldehit veya formaldehit ile fikse edildiği zaman lektin reseptörlerinin dağınık olarak bulunduğu gözlenmiştir (82). Bütün bu bulgular transforme hücrenin lektin reseptör mobilitésinin normallere göre daha fazla olduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir.

Normal hücrelerin proteolitik enzimlerle muamelesi sonucunda aglutinasyon özelliklerinin transforme hücrelere benzer bir şekilde arttığı

görülmüştür. Bunun nedeninin kapalı bulunan (criptic) lektin reseptörlerinin proteolitik enzimler tarafından açığa çıkarılmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (32,83).

Bazı hücrelerin onkojenik olmayan viruslarla enfeksiyonu sonucunda lektin aglutinasyonunda transforme hücrelerde olduğu gibi bir artış olduğu saptanmıştır (84).

Vaccinia virusu ile enfekte hücrelerde enfeksiyondan 2 saat sonra viral veya konak DNA sentezine gerek olmadan Con A aglutinasyonunda önemli bir artma görülmüştür. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda tavuk ve hamster embryo hücrelerinin Newcastle hastalığı, influenza, vesicular stomatitis, simliki sindbis ve SV 5 virusları ile enfeksiyonu sonucu bu hücrelerin lektinlerle aglutinasyon özelliklerinin arttığı gözlenmiştir (84).

I.6. AMAÇ

Bu çalışmada ³H-Con A kullanılarak heteroploid insan akciğer hücrelerinin (LU-106) kızamık virusu ile akut ve kronik enfekte edilmesinin bu hücrelerin zar Con A reseptörlerinin sayı ve afinitelerini ne şekilde etkilediği araştırıldı. Ayrıca bebek hamster böbrek devamlı hücrelerinin (BHK/C13) ve bunların onkojenik DNA virus grubundan polyoma virusu ile in vitro transformasyonu sonucunda Con A reseptör kinetiklerindeki değişiklikler irdelendi.

II. ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER

II.1. ARAÇ ve GEREÇLER

Concanavalin A (Grade IV), GMM, glutraldehit Sigma firmasından (ABD), ³H-Asetik Anhidrit, Amersham firmasından (İngiltere), Ferritin Nutritional Biochemicals Corp. firmasından (ABD), 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), LU-106 ve taşıyıcı LU-106 hücreleri E.Norrby, Karolinska Enstitüsü (İsveç), BHK ve pyBHK hücreleri J.Subak-Sharpe, Glasgow Üniversitesi, Viroloji Enstitüsü (İskoçya), Vero hücreleri Flow Lab., Irvine (İskoçya)'dan temin edildi.

Kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta idi.

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

Fraksiyon toplayıcısı LKB 700 ultralog, LKB (İsveç), Hücre kültürü şişeleri (10 ounce) Kimax (ABD), Hemaglutinasyon plakları Cooke Micro-titer System (İngiltere).

II.2. YÖNTEMLER

II.2.1. Hücreler :

Bu çalışmada kullanılan fare embriyosu fibroblast (MEF) hücreleri 2. pasajda, heteroploid insan akciğer hücreleri olan LU-106 ve taşıyıcı LU-106 hücreleri laboratuvarımıza geldikten sonraki 5-10. pasaj arasında, Bebek hamster böbrek hücreleri olan BHK/C13 ve polyoma virusu ile transforme edilmiş pyBHK/C13 hücreleri laboratuvarımıza geldikten sonraki 3-5. pasaj arasında, yeşil Afrika maymunu böbrek hücreleri olan Vero hücreleri ise 20. pasajda kullanıldı.

II.2.2. Hücre Kültürleri :

Bütün hücre kültürleri Eagle's minimal essential medium (MEM) de üretildiler. Hücre kültürlerinin üretimi için vasata % 10 oranında normal veya fetal dana serumu, 100 ünite penisilin ve 100 µg/ml Streptomisin ilave edildi. Deneylerde kullanılan primer fare embriyosu fibroblast kültürü standard yöntemlere göre İsviçre albino faresi kullanılarak hazırlandı. Hücreler % 10 normal dana serumu içeren MEM vasatında üretildiler. Devamlı, heteroploid akciğer hücreleri olan LU-106 ve bu hücrelerin kızamık virusu ile persistant olarak enfekte edilmiş hücre kültürü (MC = Measles Carrier) % 2 fetal dana serumu içeren MEM vasatında üretildiler. BHK ve pyBHK hücreleri % 10 fetal dana serumu, % 1 triptoz fosfat ile zenginleştirilmiş besiyerlerinde üretildiler. Vero hücreleri de % 10 fetal dana serumu içeren MEM vasatında üretildiler.

II.2.3. Hücrelerin Kültür Şişelerinden Sökülmesi.

Tek tabaka oluşturan hücrelerin önce vasatları dökülür, daha sonra 3 kez PBS ile yıkanan ve 5 ml % 0.02 EDTA ile 10 dakika 37°C de inkübe edilir. Sökülen hücreler santrifüj tüplerine alınarak 8 dakika 1200 xg'de

santrifüj edilir, 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra sayım ve tripan mavisi dışlama yöntemiyle canlılık testi yapılan hücreler deneye alınır. Yapılan canlılık testlerinde kullanılan hücrelerin ortalama % 95'inin canlı olduğu saptanmıştır.

II.2.4. Hücrelerin Tripsinle Muamele edilmesi.

Kültür şişelerinde tek tabaka oluşturan hücreler vasatları döküldükten sonra 3 kez PBS ile yıkanır ve 5 ml % 0.25 tripsin ile 10 dakika 37^o C da inhibe edilirler. Sökülen hücreler EDTA yönteminde olduğu gibi deneye hazırlanırlar.

II.2.5. LU-106 Hücrelerinin Kızamık Virusunu İle Akut Enfeksiyonu.

Normal LU-106 hücreleri kültür ortamında 1 TCID₅₀ sıklığında kızamık virusu (Edmonston strain) ile enfekte edildi. Hücreler enfeksiyondan 20 saat sonra kullanıldı.

II.2.6. Protein Tayinleri.

Protein tayinleri 280 nm de absorpsiyon ölçümü ile yapıldı. Con A için molar ekstinksiyon katsayısı olarak 1.14 kullanıldı (85).

II.2.7. Radyoaktivite Sayımları.

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

II.2.7.1. Dioksan'ın Peroksidlerden Arındırılması (86) :

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

II.2.7.2. Peroksit Ölçümü (86) :

10 ml dioksan, 10 ml su, 0.5 ml glacial asetik asit, 5 ml kloroform ve 1 ml.% 10'luk potasyum iyodür şiddetlice çalkalanarak karıştırıldı ve 2 dakika beklenildi. Açığa çıkan iyod 0.1 N tiosulfat ile çözelti renksiz olana dek titre edildi. Sodyum üzerinden geri soğutucuda kaynatıldıktan sonra distillenen dioksanda peroksite rastlanmadı.

II.2.7.3. Bray Sayım Çözeltisinin Hazırlanması (87) :

4 gm PPO, 200 mg POPOP, 60 gm naftalen, 100 ml metanol, 20 ml etilen glükol karıştırıldı ve dioksan ile 1 lt'ye tamamlandı.

II.2.8. ³H-Con A'nın Hazırlanması (80).

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 boyutlarında 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.2.9. Mikrohemaglutinasyon (88).

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

siyon hazırlandı. Con A Dulbecco PBS (89) ile seyreltildi ve eritrositlerle U tipi hemaglutinasyon plaklarında 1 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. 2X seri dilüsyonlarla hemaglutinasyon aktivitesi gösteren en düşük Con A derişimi saptandı.

II.2.10. Mikrofüj Tekniği İle Bağlanma Deneyi (78).

Kültür ortamından sökülen ve 3 kez PBS ile yıkanan hücreler ($0.5-1.5 \times 10^6$ /ml) 1.5 ml'lik plastik tüplerde Ca^{++} , Mn^{++} , PBS ve 3H -Con A ($0.8-250 \mu\text{g/ml}$) ile 1 saat 0°C da inkübe edildi. Kontrol tüplerine 60 mM OMM 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, içinde 350 λ % 2.5'luk BSA bulunan 1 ml'lik plastik tüplerin üzerine yayıldı. İnkübasyon tüpleri 2 kez 50 λ PBS ile yıkanarak bunlarda 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 hidroksid ile çözünürleştirilerek sayım şişelerine aktarıldı.

II.2.11. OMM İle Yapılan Sökme Deneyleri.

II.2.11.1. Derişime Bağımlı Sökme Deneyi :

MEF hücreleri 200 $\mu\text{g/ml}$ Con A, Ca^{++} , Mn^{++} ve PBS ile 1 saat 0°C da inkübe edildikten sonra, çeşitli OMM derişimleri (0.25-60 mM) ile muamele edilerek bağlı Con A'nın sökülmesi mikrofüj yöntemiyle saptandı.

II.2.11.2. Zamana Bağımlı Sökme Deneyi :

MEF hücreleri 200 µg/ml Con A, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺ ve PBS 1 saat 0°C da inhibe edildi. İnkübasyondan sonra karışıma 60 mM OMM ilave edildi ve değişik zamanlarda (10-120 dakika) karışımdan örnekler alınarak bağlı Con A'nın zamana bağımlı sökülmesi mikrofüj yöntemiyle saptandı.

II.2.12. Asosiyasyon Sabiti (K_a) ve Reseptör Sayısı (N)'nin Hesaplanması.

Reseptör-ligand ilişkisi



olarak ifade edilecek olursa

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

burada;

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

Scatchard'ın (90) ifadesine göre,

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

burada;

- (L)_b : bağlı ligand derişimi
- (L)_f : serbest ligand derişimi
- (R) : toplam reseptör derişimi
- K_a : Asosiyasyon 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' e karşı B çizilecek olursa, elde edilecek doğrunun eğimi $-K_a$, x-ksenini kestiği noktada N olacaktır.

Radyoaktivite sayımları ile çizilmiş örnekler bir grafikte;

$$\frac{\text{Sbd}}{\text{Özgül etkinlik (Sbd}/\mu\text{g Con A)} \times \text{Mol. Ağırlık (Con A)}} = \mu\text{M Con A (bağlı)}$$
$$\frac{\mu\text{M Con A (bağlı)} \times 6.02 \times 10^{23} \text{ (Avagadro sayısı)}}{\text{Deneyde Kullanılan Hücre Sayısı}} = N \text{ (Reseptör / Hücre) sayısı}$$

Aynı şekilde radyoaktivite sayımları ile çizilmiş örnek bir grafikte;

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

özgül etkinlik (Sbd/ $\mu\text{g Con A}$)

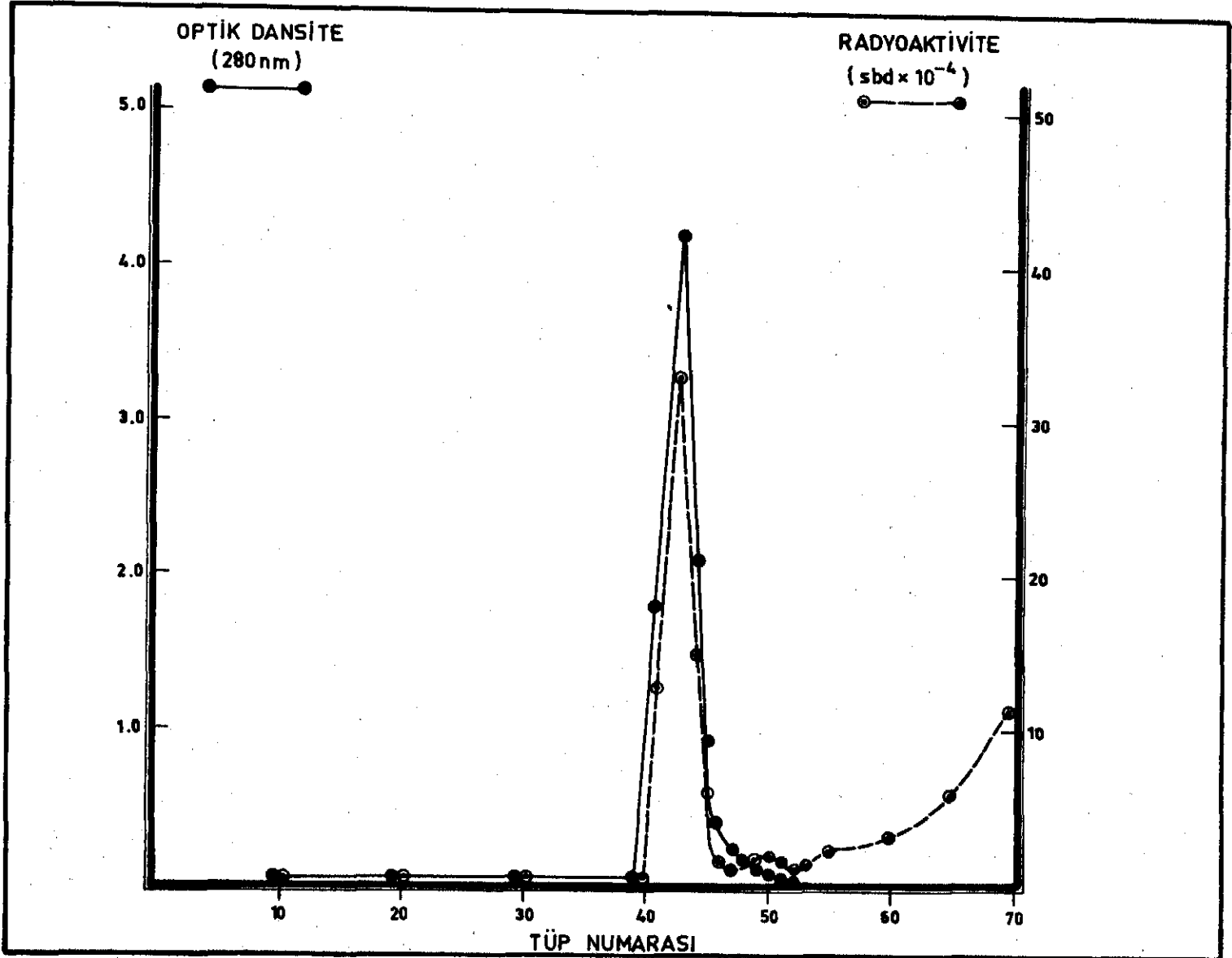
$$-K_a = -\frac{y}{x'} \times 10^{-3} \times 10^{-6}$$

Mol. Ağırlık (Con A)

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

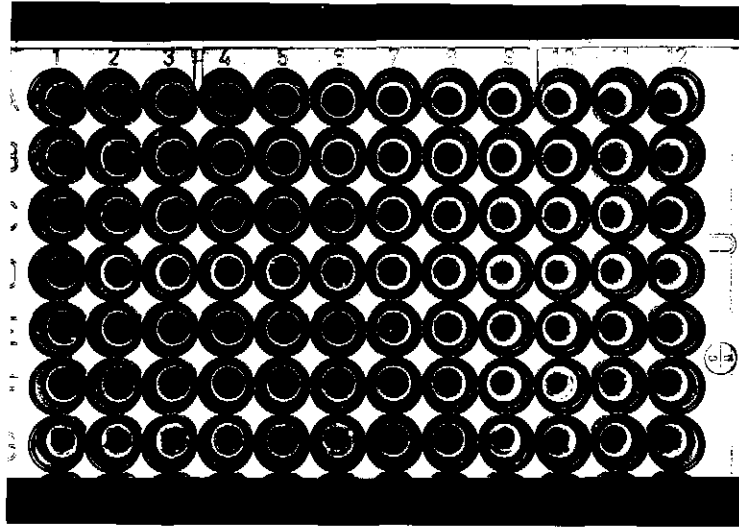
B U L G U L A R

Bağlanma deneylerinde kullanılan ^3H -Con A'nın Sefadex G-25 kolonundan elüsyonu Şekil 4'te görülmektedir. α -MM içeren ortamda yapılan kromatografide aktif bölgeleri mannozid ile kapalı olan Con A Sefadexse tutunmadan çıkmakta ve işaretli asetatin fazlasından kolayca ayrılmaktadır. 1.5×10^4 cpm/ μg özgül etkinlikte Con A bu yöntemle % 95 verimle elde edilmiştir.



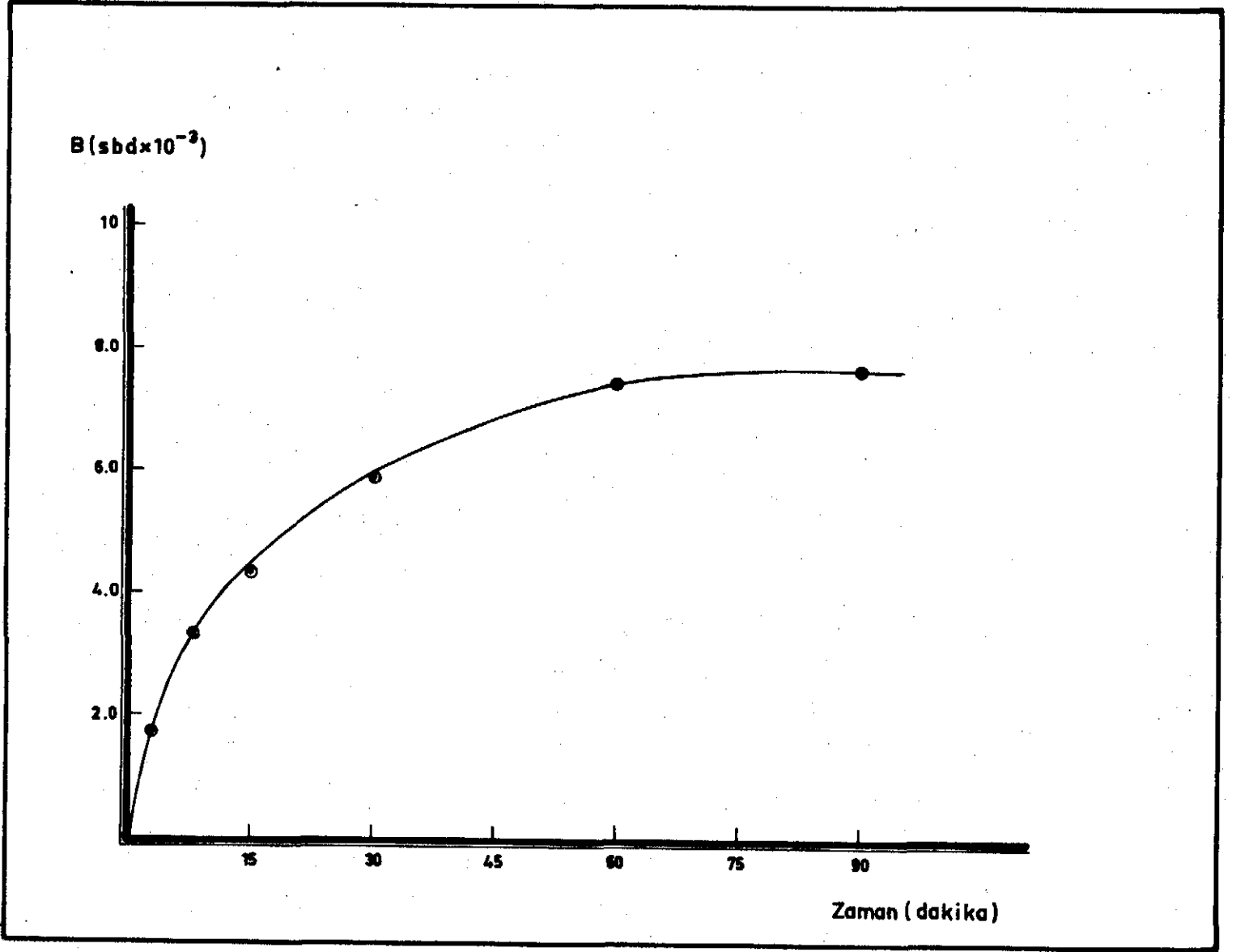
ŞEKİL 4 : ^3H -Con A'nın Sefadex G-25 kolonunda saflaştırılması. 90×1.5 cm boyutlarındaki kolondan toplanan 1.5 ml lik fraksiyonlarda 280 nm de protein tayini ve Bray çözeltisi kullanılarak radyoaktivite tayini yapılmıştır. Radyoaktivite dakikada sayım olarak bildirilmiştir. Kolon akış hızı 4 ml/saat olarak ayarlanmıştır. Tüp 41-47 Fraksiyon A, Tüp 48-52 Fraksiyon B olarak toplanmıştır.

Elde edilen ³H-Con A'nın biyolojik aktivitesi Resim 1 'de gösterilmiştir. Tavşan eritrositleri ile (% 1.5) 1.5 µg/ml derişime kadar hemaglutinasyon sağlanmıştır. Natif Con A ile işaretli Con A'nın aynı derişimde aglutinasyon yapmaları işaretlemenin Con A'nın biyolojik aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Hemaglutinasyonun özgülüğü α-MM kontrolleri ile saptanmıştır.



RESİM 1 : ³H-Con A'nın biyolojik aktivitesinin ölçülmesi. 2X seri dilüsyonlar yatay ekseninde görülmektedir. Birinci kuyularda I: natif Con A; 85 µg/ml, II ve III : H-Con A (Frak. A); 80 µg/ml, IV : ³H-Con A (Frak. A) - α-MM (5 mM), V ve VI : ³H-Con A (Frak. B); 87.5 µg/ml, VII : Dulbecco PBS kontrolü. Hemaglutinasyon % 1.5'luk tavşan eritrosit süspansiyonunun lektinle oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

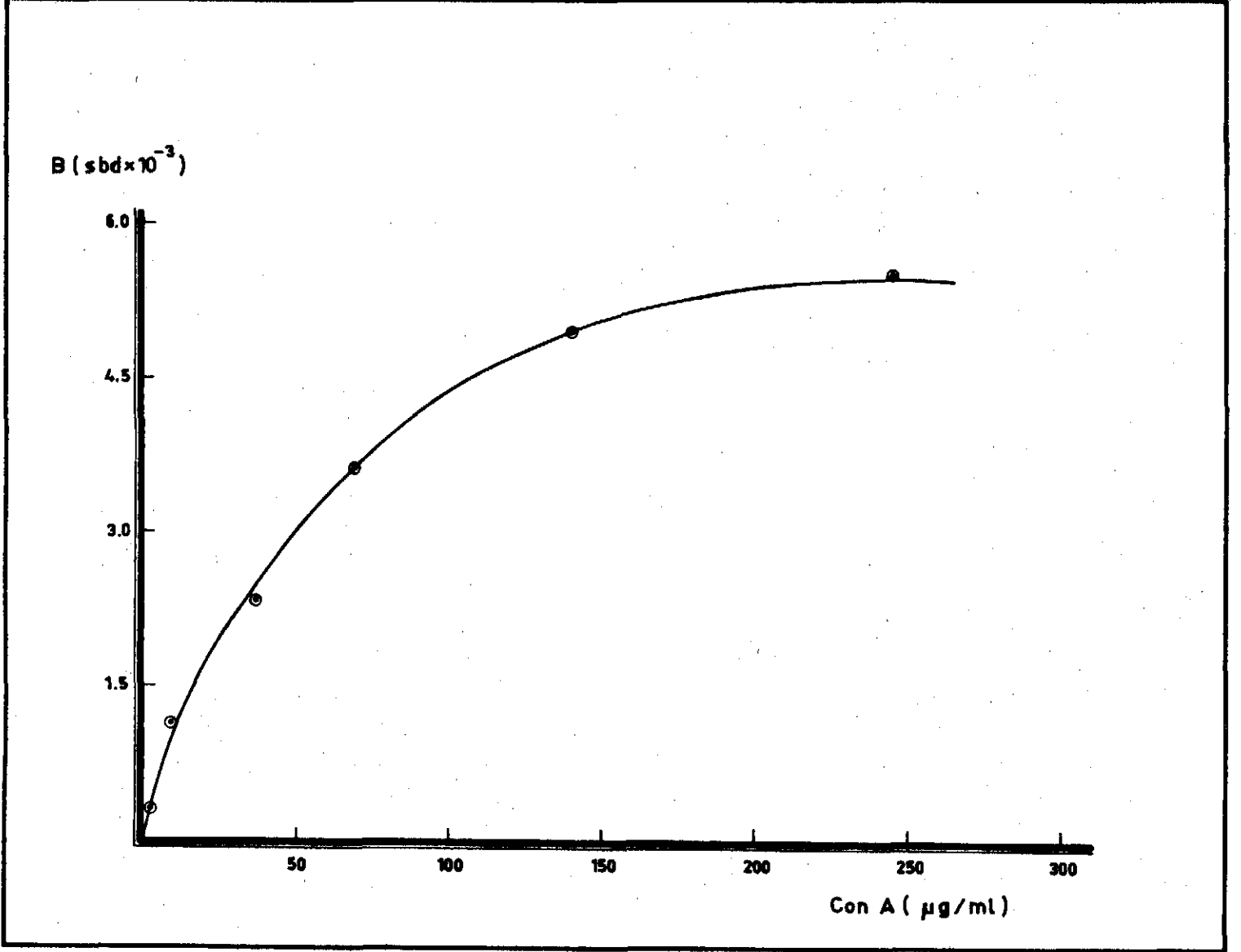
Model sistem olarak seçilen MEF için zamana bağımlı bağlanma eğrisi Şekil 5'te görülmektedir. Bağlama 60 dakika inkübasyon sonucunda doygunluğa ulaşmaktadır.



ŞEKİL 5 : Zamana bağımlı bağlanma eğrisi.

Apsis : Zaman (dakika)
Ordinat : Bağlanan ³H-Con A (Sbd x 10⁻³)
Hücre : MEF, (9 x 10⁵/ml), Normal
³H-Con A: 250 µg/ml
α-MM (Kontrol) : 60 mM
Sıcaklık : 0°C

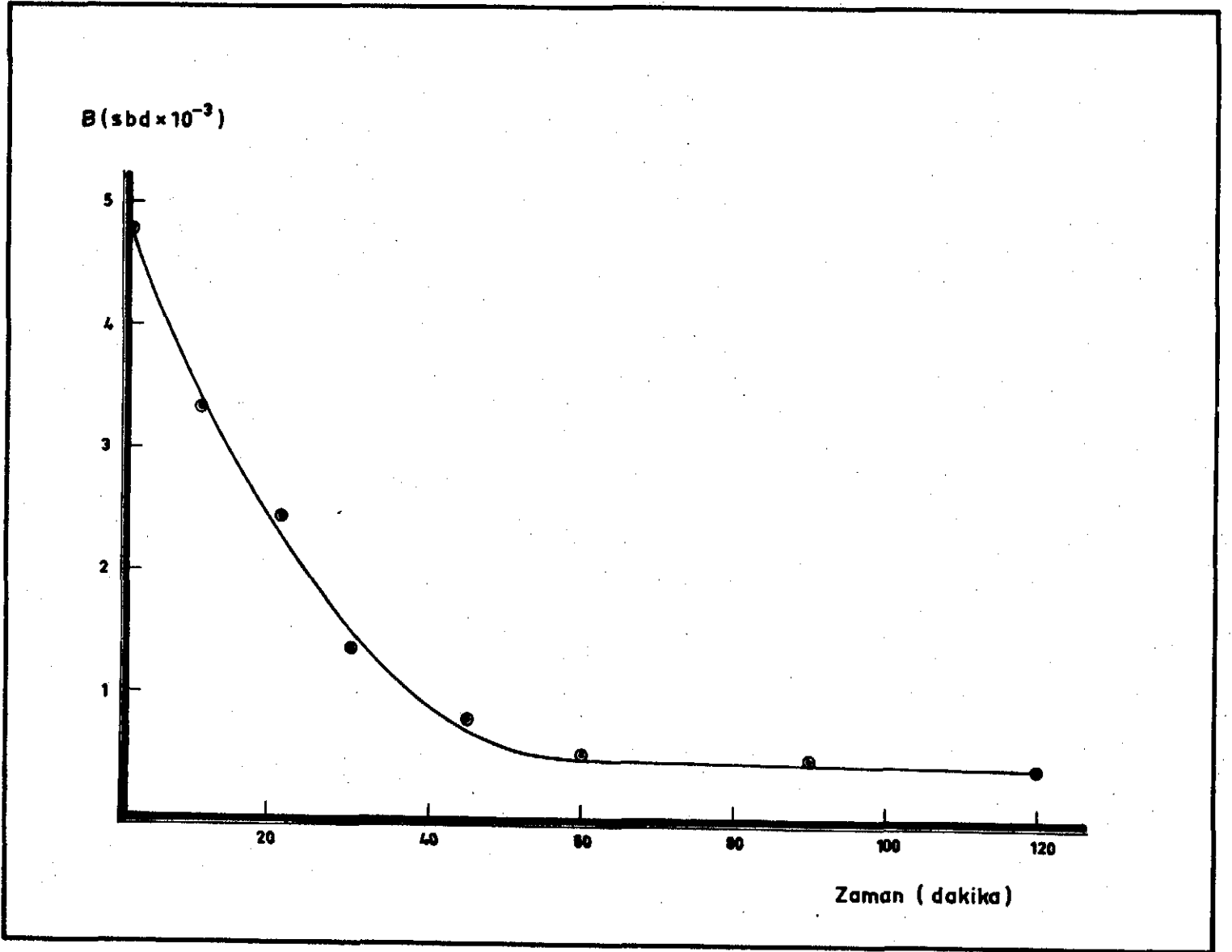
Şekil 6'da MEF için derişime bağımlı bağlanma eğrisi görülmektedir.
Bağlanma 200 µg/ml ³H-Con A derişiminde doygunluğa ulaşmaktadır.



ŞEKİL 6 : Derişime bağımlı bağlanma eğrisi.

Apsis : ³H-Con A derişimi (µg/ml)
Ordinat : Bağlanan ³H-Con A (sbd x 10⁻³)
Hücre : MEF (6.5 x 10⁵/ml), Normal
³H-Con A : 1.7 - 250 µg/ml
α-MM (Kontrol) : 60 mM
Sıcaklık : 0°C
İnkübasyon zamanı : 60 dakika

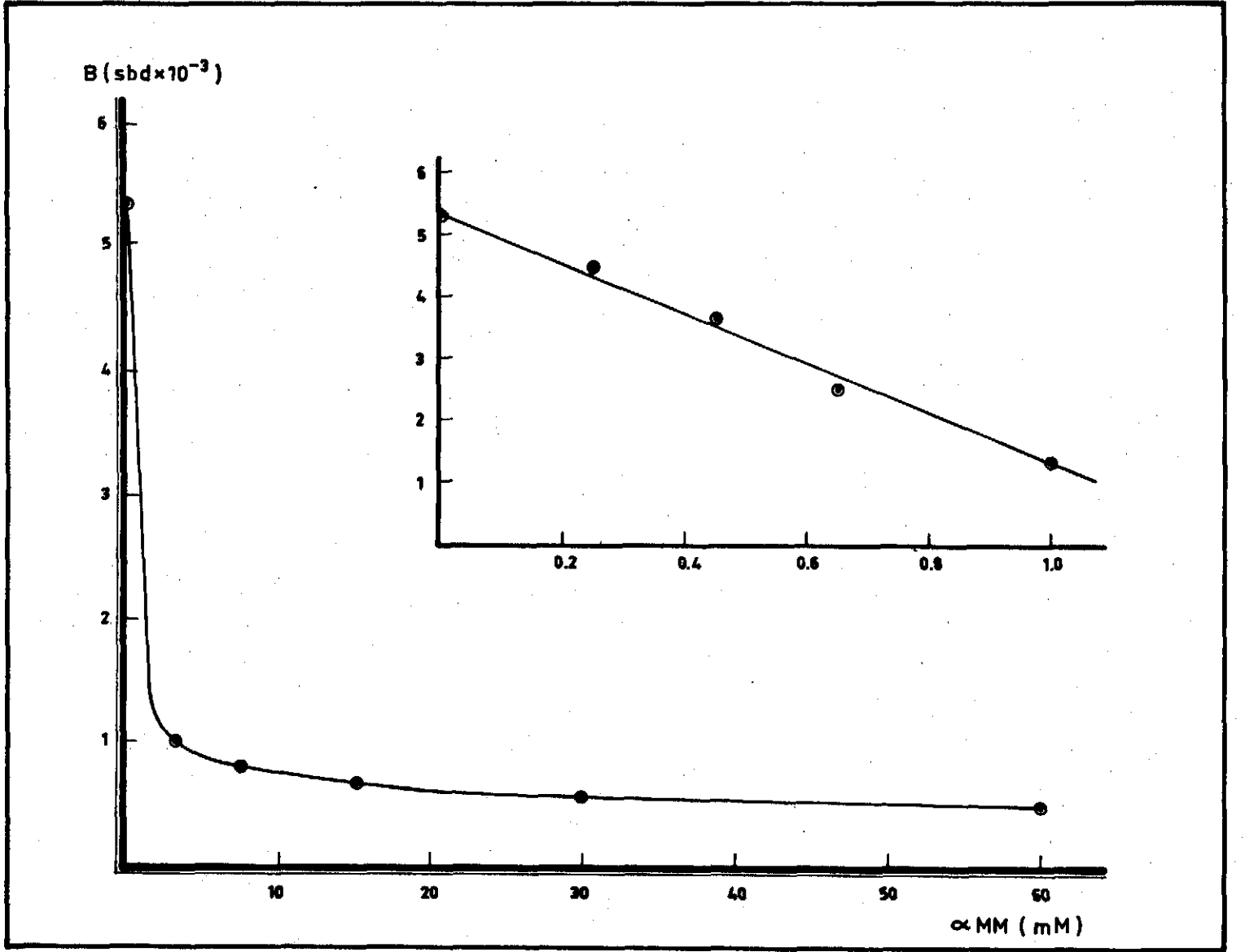
Bağlanan $^3\text{H-Con A}$ 'nın $\alpha\text{-MM}$ tarafından zamana bağımlı sökülmesi Şekil 7'de görülmektedir. Bağlanan $^3\text{H-Con A}$ 'nın 10. dakikada % 29.2'si, 30. dakikada % 71'i, 60. dakikada % 91'i, 120. dakikada ise % 91.2'si $\alpha\text{-MM}$ tarafından sökülmetedir.



ŞEKİL 7 : Zamana bağımlı $\alpha\text{-MM}$ inhibisyon eğrisi.

Apsis : Zaman (dakika)
Ordinat : Sökülen $^3\text{H-Con A}$ ($\text{sbd} \times 10^{-3}$)
Hücre : MEF ($7.5 \times 10^6/\text{ml}$), Normal
 $^3\text{H-Con A}$: $200 \mu\text{g}/\text{ml}$
 $\alpha\text{-MM}$: 60 mM
Sıcaklık : 0°C

Şekil 8'de ise bağlanan $^3\text{H-Con A}$ 'nın $\alpha\text{-MM}$ tarafından derişime bağımlı sökülmesi görülmektedir. 0.5 mM $\alpha\text{-MM}$ derişiminde % 76'sı, 15 mM $\alpha\text{-MM}$ derişiminde % 87'si, 60 mM $\alpha\text{-MM}$ derişiminde ise % 89'u sökülmektedir.



ŞEKİL 8 : Derişime bağımlı $\alpha\text{-MM}$ inhibisyon eğrisi.

Apsis : $\alpha\text{-MM (mM)}$

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

Hücre : MEF ($9 \times 10^5/\text{ml}$), Normal

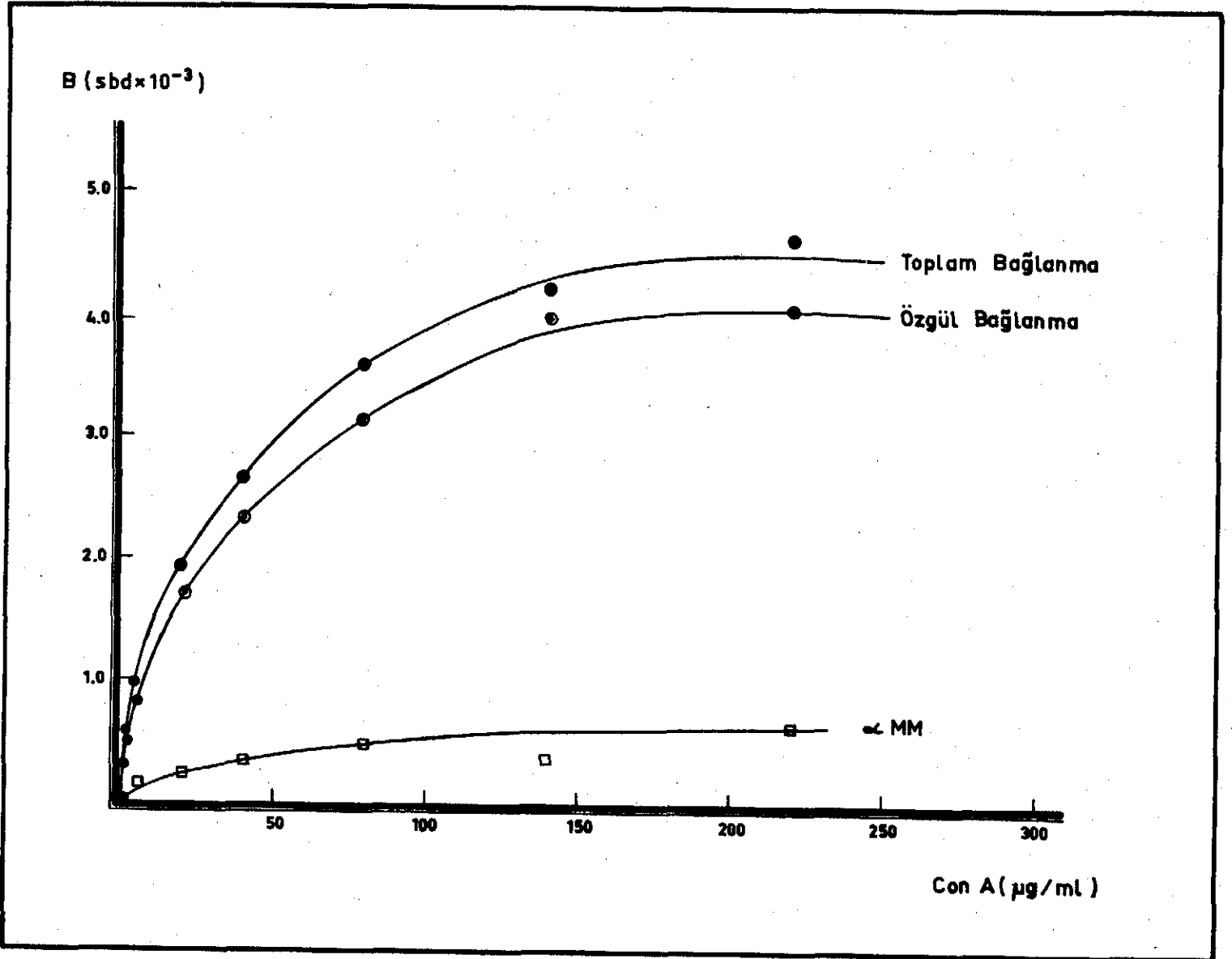
$^3\text{H-Con A}$: 200 $\mu\text{g/ml}$

$\alpha\text{-MM}$: 0.2-60 mM

Sıcaklık : 0°C

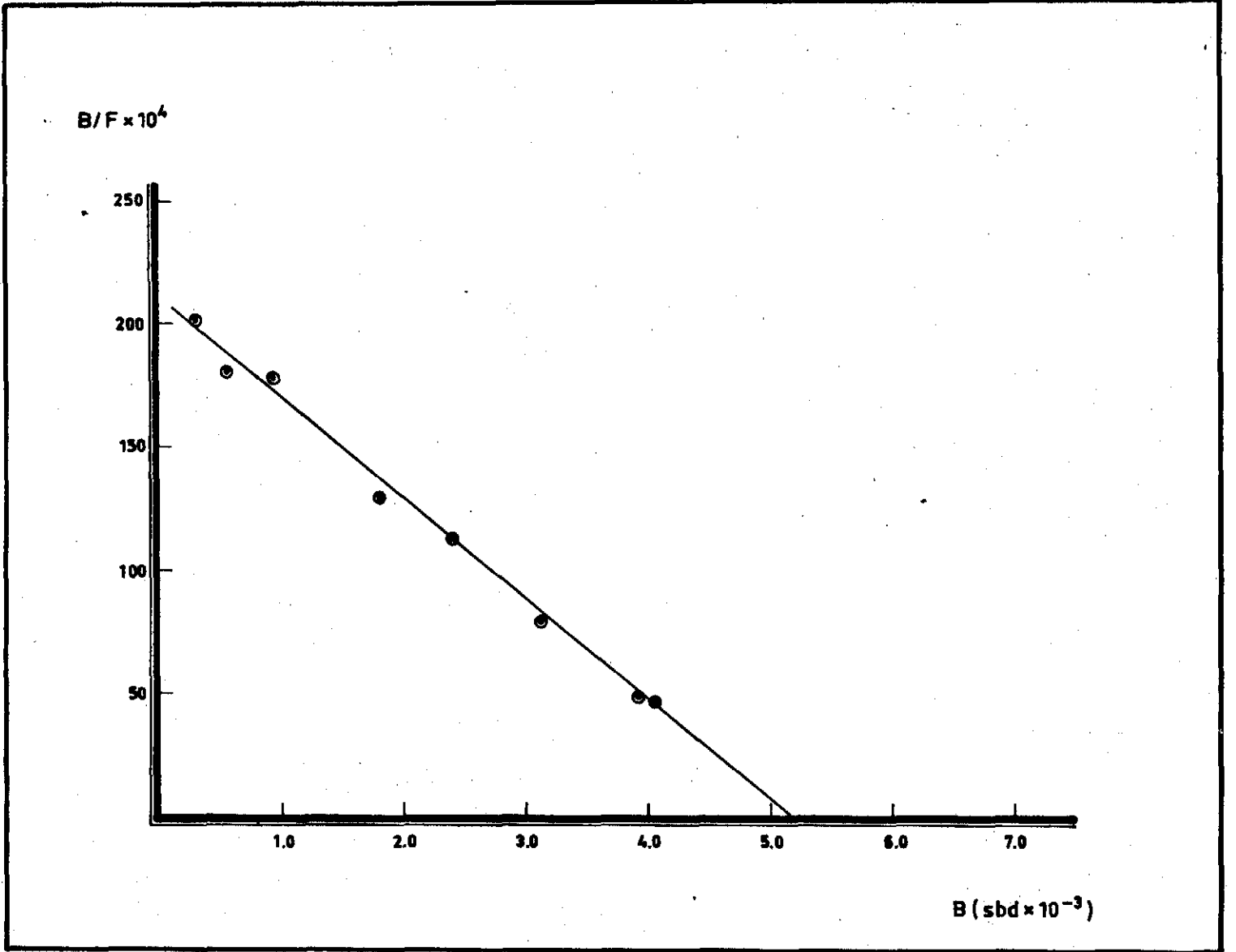
İnkübasyon zamanı : 60 dakika

MEF hücrelerinin bağlanma eğrisi Şekil 9'da Scatchard doğrusu ise Şekil 10'da görülmektedir. Bağlanma eğrisinde toplam bağlanma ile α -MM içeren kontrollerin verdiği bağlanma ayrı ayrı gösterilmiştir. Bunların farkı özgül bağlanmayı vermektedir. Scatchard analizi sonucunda $K_a = 1.52 \times 10^6 M^{-1}$, $N = 15.54 \times 10^6$ reseptör/hücre bulunmuştur. Bu bağlanma eğrisi ayrı ayrı yapılan 5 deneyin ortalamaları kullanılarak çizilmiştir (Şekil 9,10).



ŞEKİL 9 : MEF hücrelerinin bağlanma eğrisi.

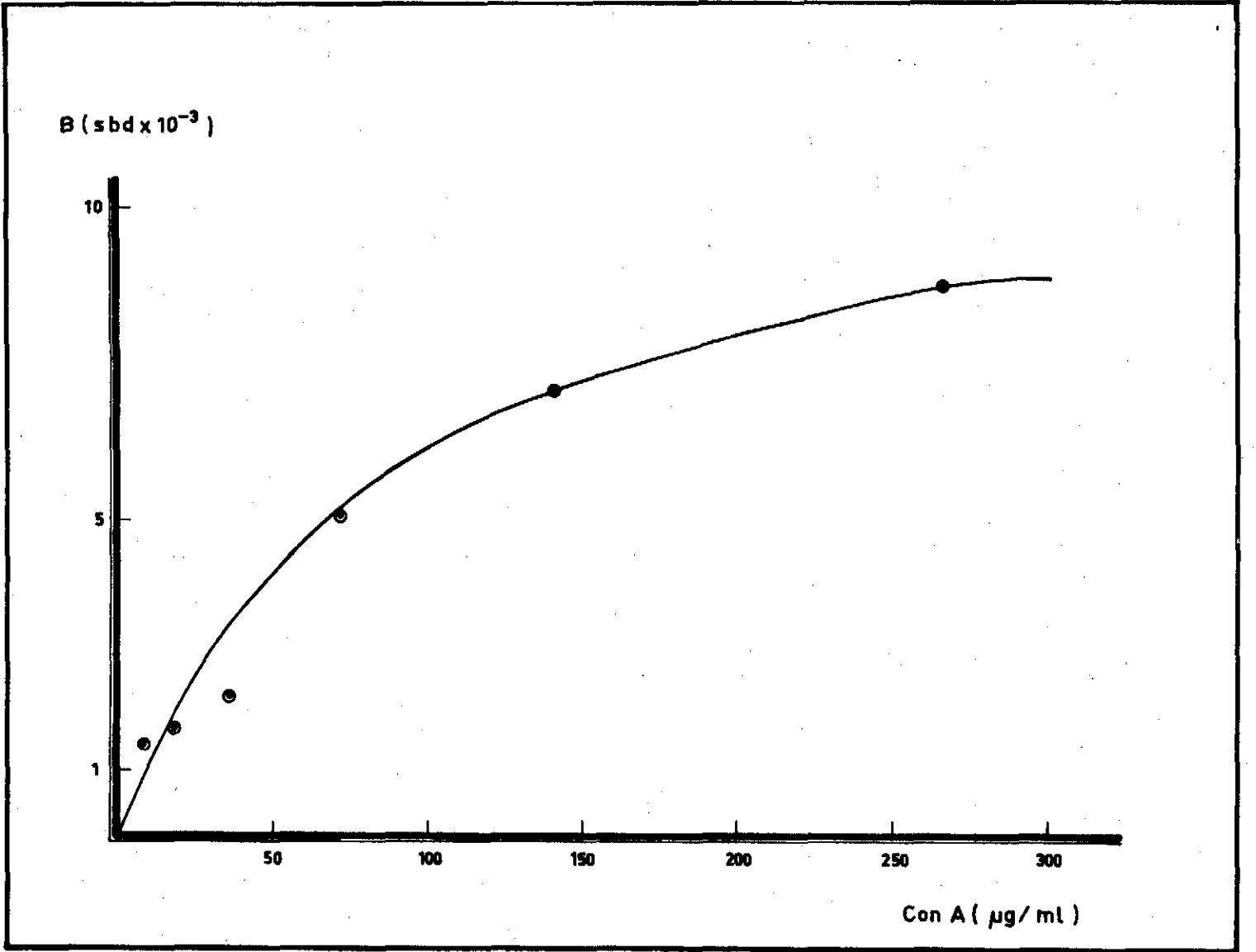
Absis : 3H -Con A ($\mu g/ml$)
Ordinat : Bağlanan 3H -Con A ($sbd \times 10^{-3}$)
Hücre : MEF ($5 \times 10^5/ml$), Normal
 3H -Con A : 1-225 $\mu g/ml$
 α -MM (kontrol) : 60 mM
Sıcaklık : $0^\circ C$
İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 10 : MEF hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

Şekil 11'de tripsin (% 0.25) ile muamele edilmiş MEF hücrelerinin özgül bağlanması gösterilmiştir. Şekil 12'de ise Scatchard doğruları görülmektedir. Tripsin ile muamele sonucunda MEF hücrelerinde yüksek afiniteli ($K_a = 6 \times 10^7 \text{M}^{-1}$), 1.06×10^6 adet yeni reseptör açığa çıkmıştır. Scatchard analizinden görüleceği gibi bağlanma 2 fazlıdır. İkinci fazda daha düşük afiniteli ($0.76 \times 10^6 \text{M}^{-1}$) hücre başına 8.69×10^6 adet reseptör vardır.



ŞEKİL 11 : Tripsin ile muamele edilmiş MEF hücrelerinin bağlanma eğrisi.

Absis : ³H-Con A (µg/ml)

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

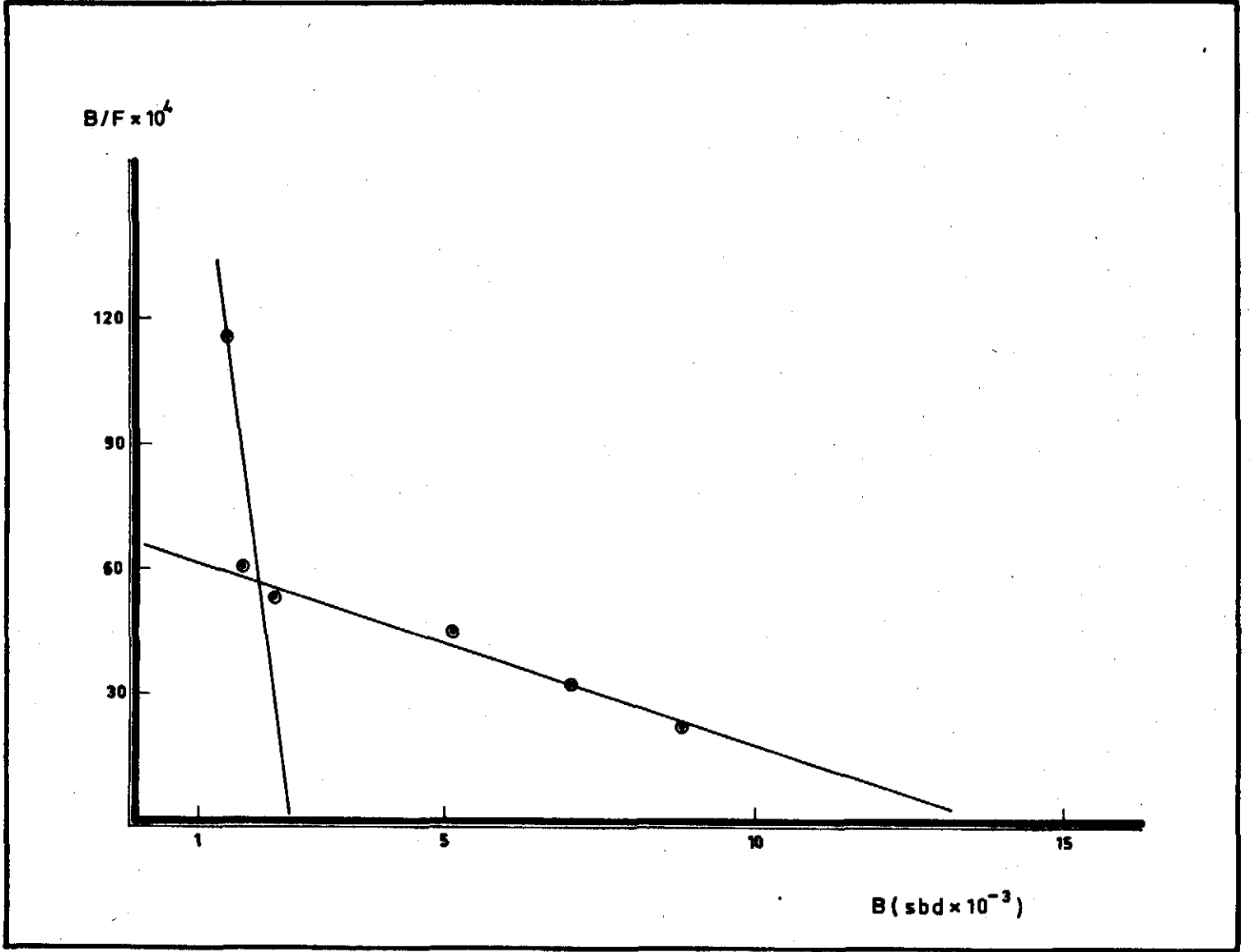
Hücre : MEF (1.1 x 10⁶/ml), Tripsinize (% 0.25)

³H-Con A : 8-266 µg/ml

α-MM (Kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

Inkübasyon zamanı : 60 dakika

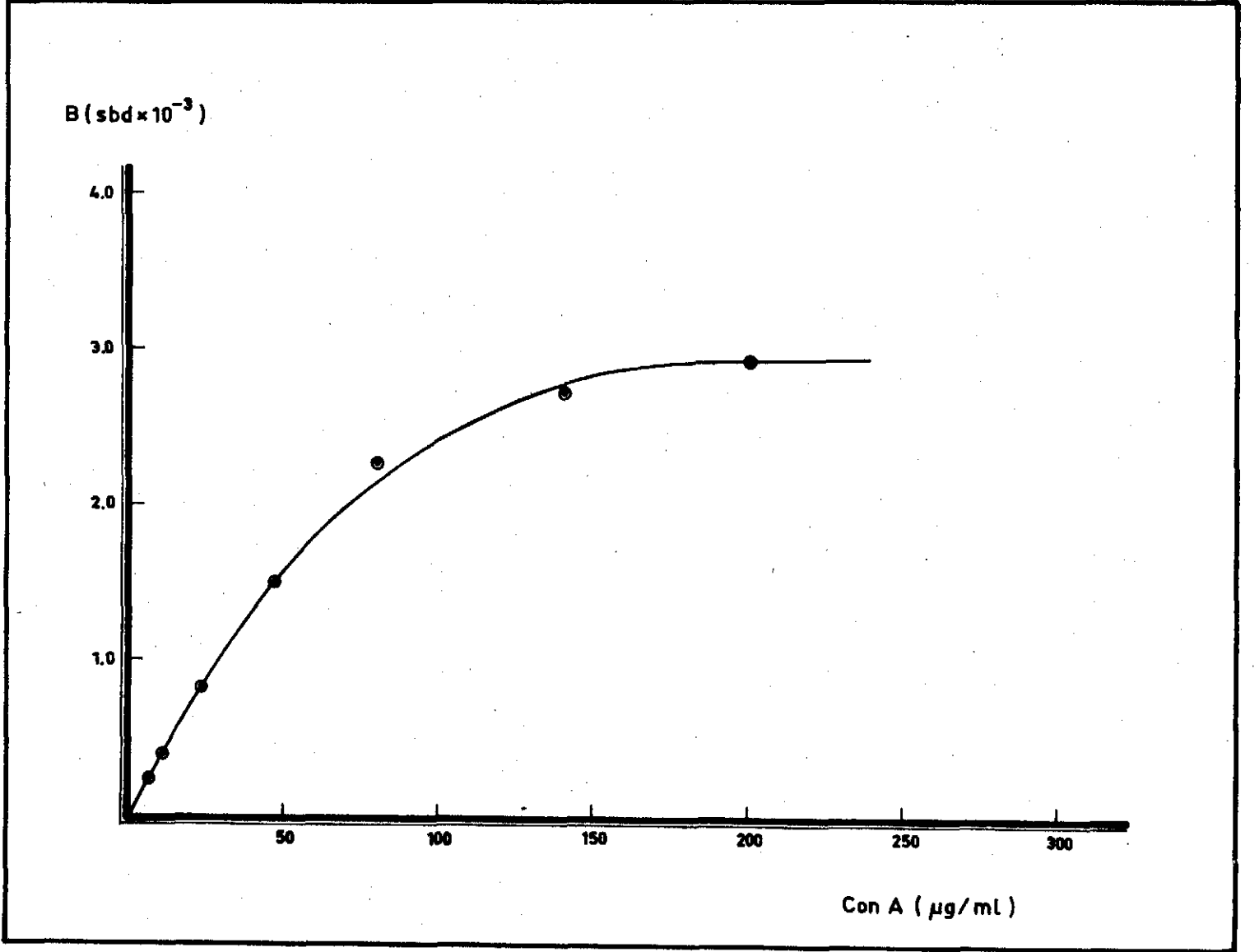


ŞEKİL 12 : Tripsin ile muamele edilmiş MEF hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

Ordinat : Bağlı/Serbest ³H-Con A

Şekil 13'te Vero hücrelerinin bağlanma eğrisi, 14 'te ise Scatchard doğrusu görülmektedir. Vero hücreleri doygunluğa 170 µg/ml ³H-Con A derişiminde ulaşmışlardır. Scatchard analizi sonucunda bu hücrenin yüzeyinde $2.09 \times 10^6 M^{-1}$ afiniteli 11.05×10^6 reseptör olduğu anlaşılmıştır.



ŞEKİL 13 : Vero hücrelerinin bağlanma eğrisi.

Apsis : ³H-Con A (µg/ml)

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

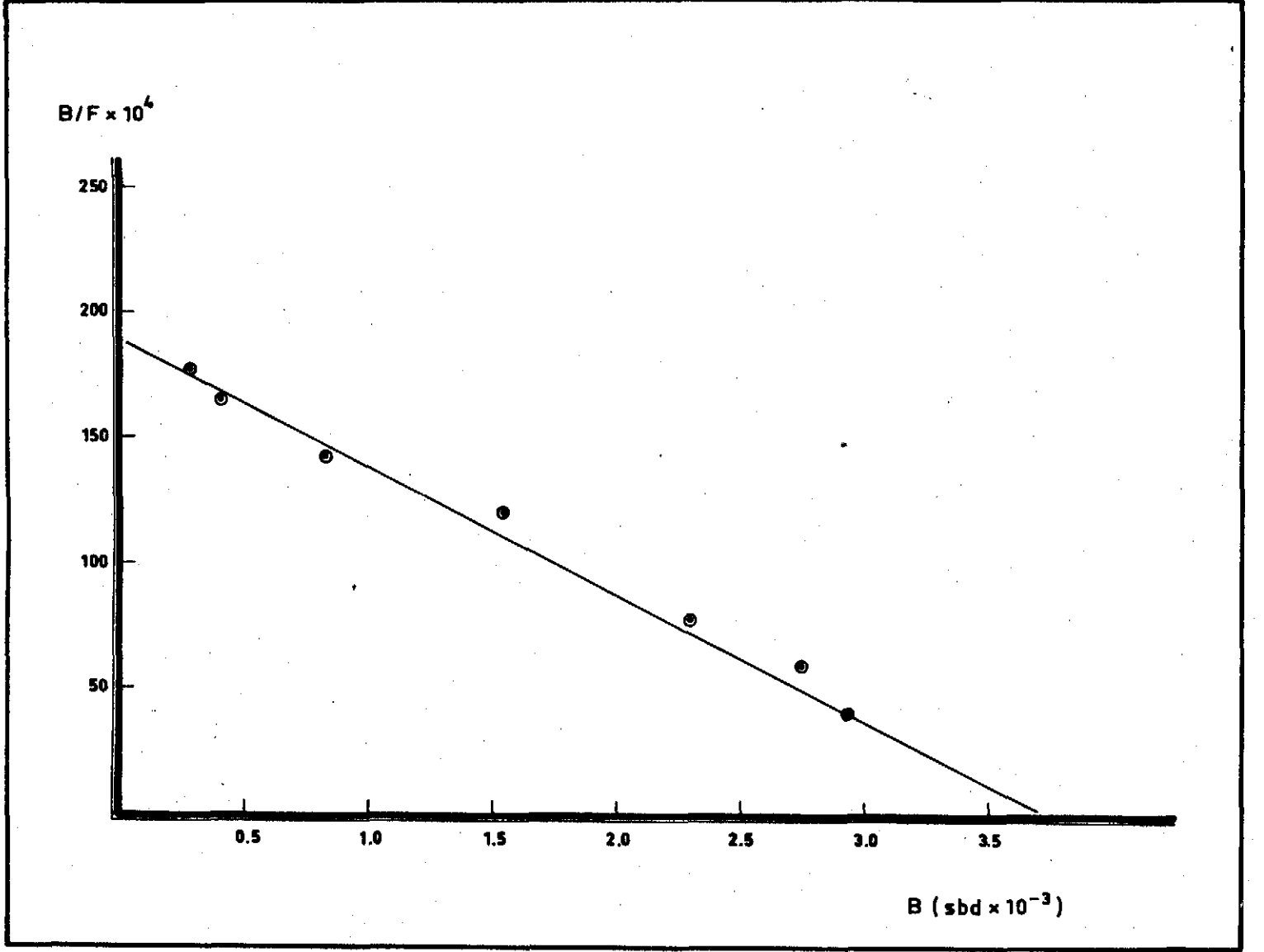
Hücre : Vero (4 x 10⁵/ml), Normal

³H-Con A : 5-200 µg/ml

α-MM kontrol : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika

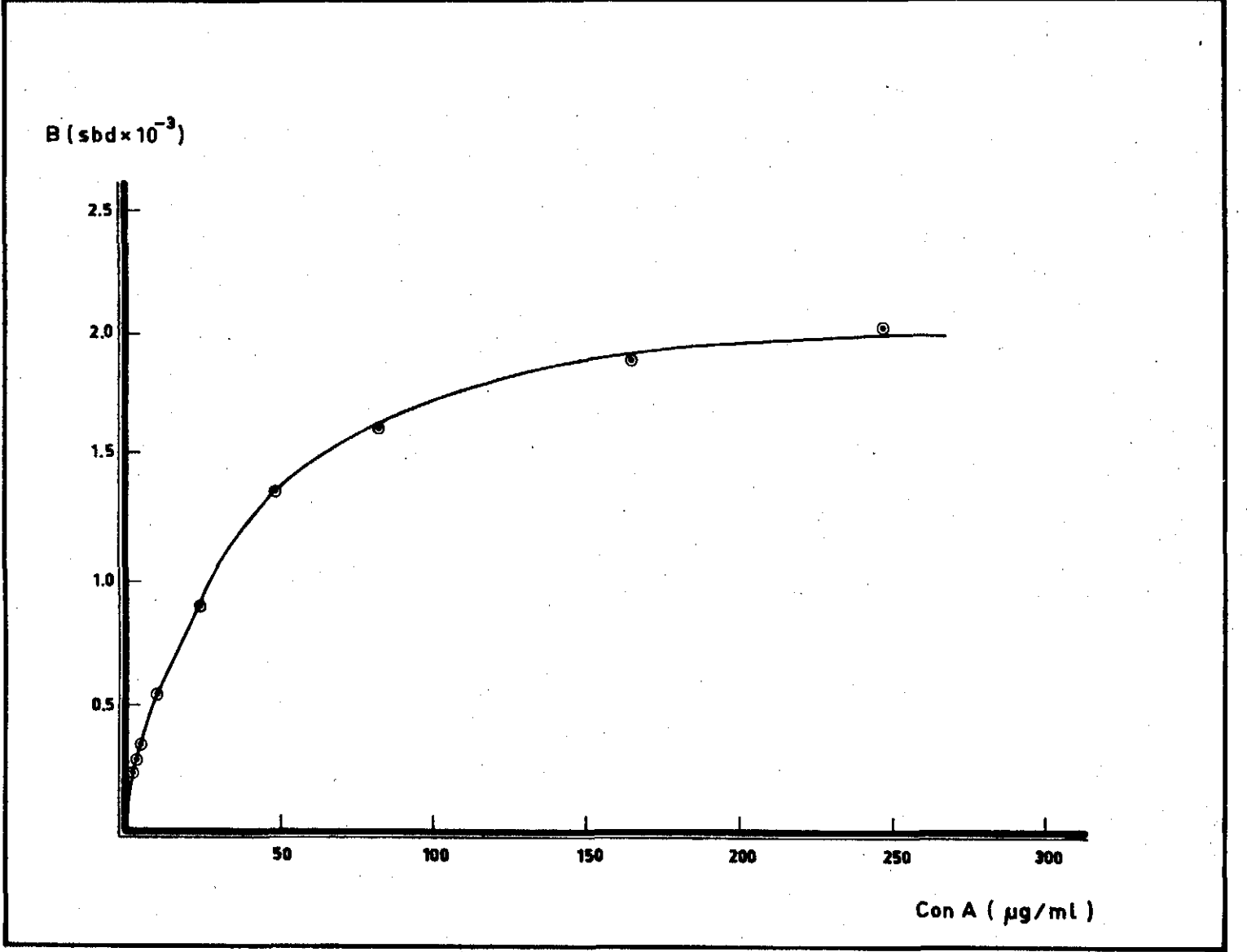


ŞEKİL 14 : Vero hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

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

Heteroploid insan akciğer hücreleri olan LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi Şekil 15'te Scatchard doğruları ise Şekil 16'da görülmektedir. LU-106 hücreleri doygunluğa $190 \mu\text{g/ml } ^3\text{H-Con A}$ derişiminde ulaşmışlardır. Scatchard analizi 2 ayrı tip reseptörün varlığını göstermiştir. Bunlardan yüksek afiniteli ($4.01 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) olanlar 8.9×10^5 /hücre, düşük afiniteli ($2.72 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) olanlar ise hücre başına 6.59×10^6 adettir.



ŞEKİL 15 : LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi.

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

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

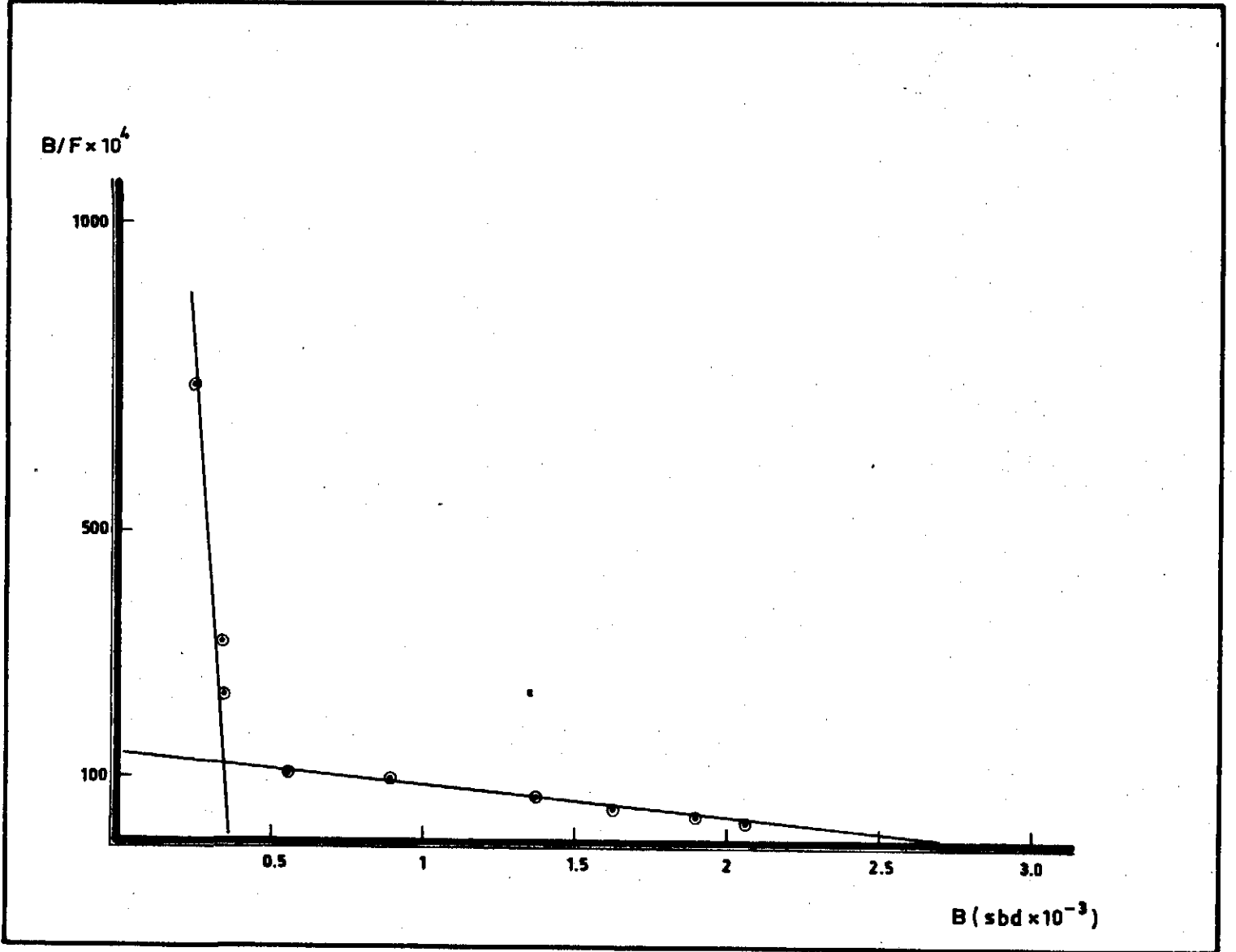
Hücre : LU-106 ($1.25 \times 10^6/\text{ml}$), Normal

$^3\text{H-Con A}$: 1.7 - 245 $\mu\text{g/ml}$

α -MM (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika

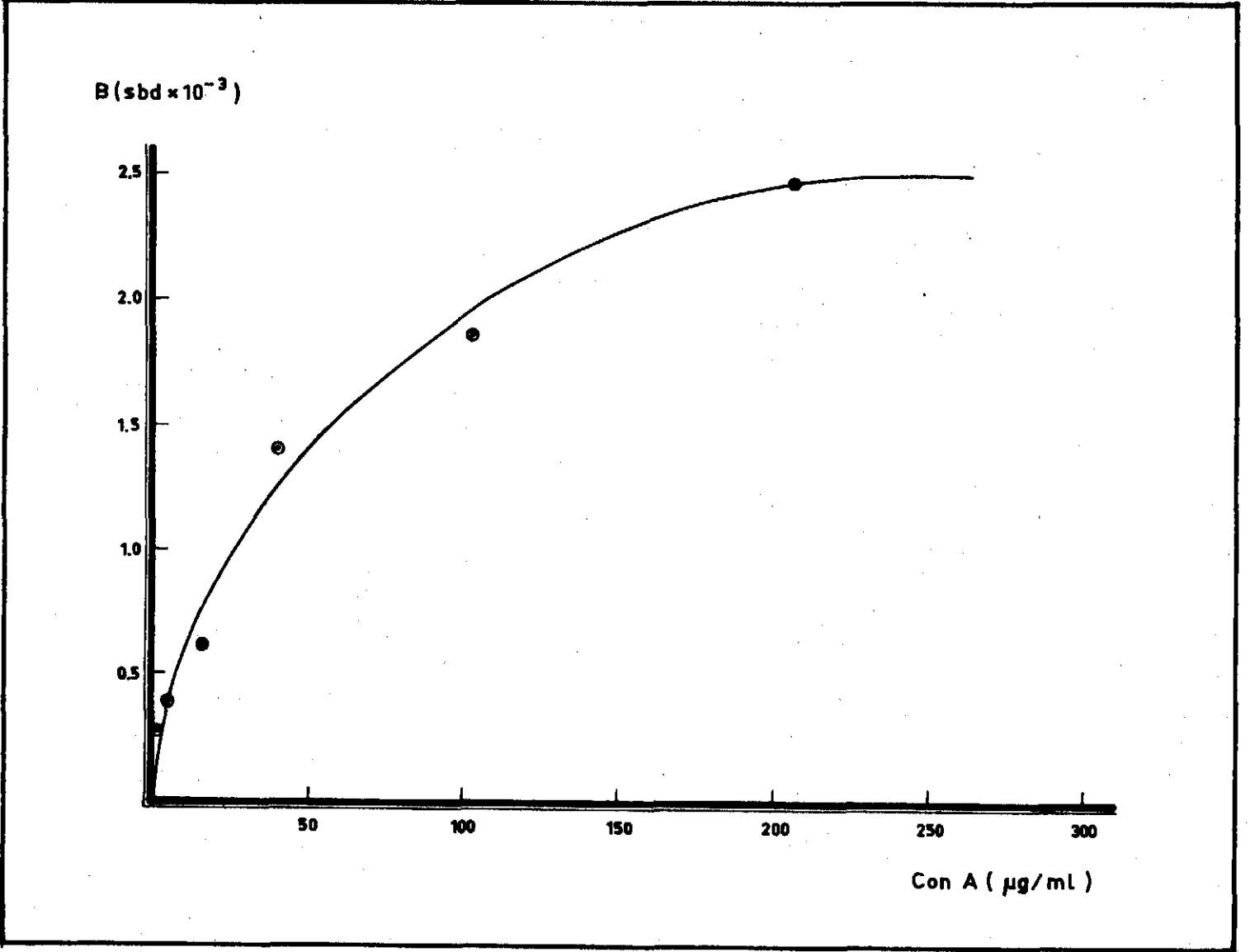


ŞEKİL 16 : LU-106 hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

Şekil 17 de tripsinle (% 0.25) muamele edilmiş LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisini, Şekil 18'de ise bu bağlanmanın Scatchard analizi görülmektedir. Bağlanma $200 \mu\text{g/ml}$ $^3\text{H-Con A}$ derişiminde doygunluğa ulaşmıştır. Scatchard analizi sonucunda bağlanmanın iki fazlı olduğu anlaşılmıştır. Normal LU-106 hücrelerine göre yüksek afiniteli reseptörlerin sayıları yaklaşık 4 kat artarken afiniteleri yaklaşık 8 kez düşmüştür. Düşük afiniteli

reseptörlerin ise sayıları yaklaşık 3 kat artarken afinitelerinin yarı yarıya düştüğü görülmüştür.



ŞEKİL 17 : Tripsinle muamele edilmiş LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi.

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

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

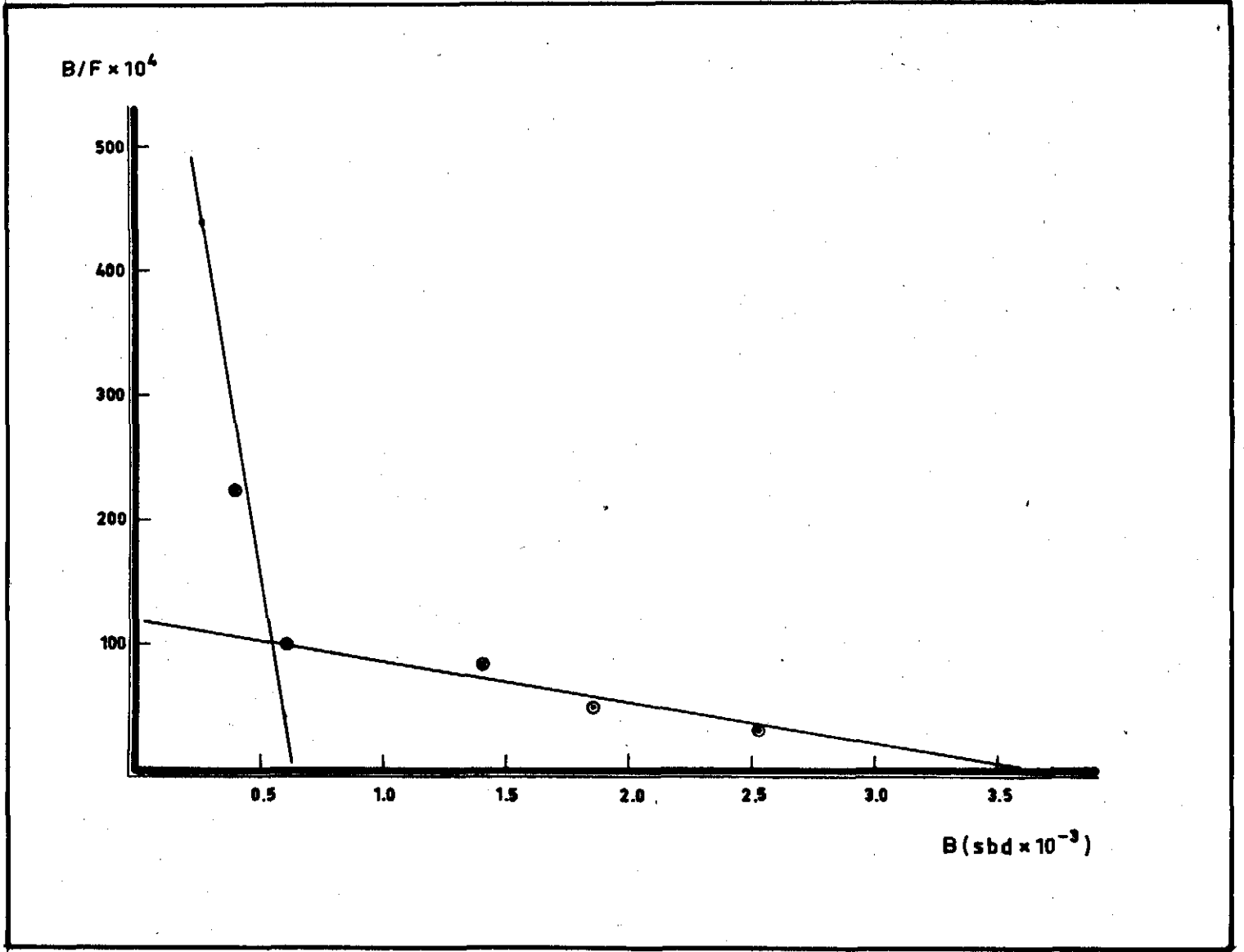
Hücre : LU-106 ($7 \times 10^5/\text{ml}$), Tripsinize (% 0.25)

$^3\text{H-Con A}$: 1-206 $\mu\text{g/ml}$

α -MM (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika



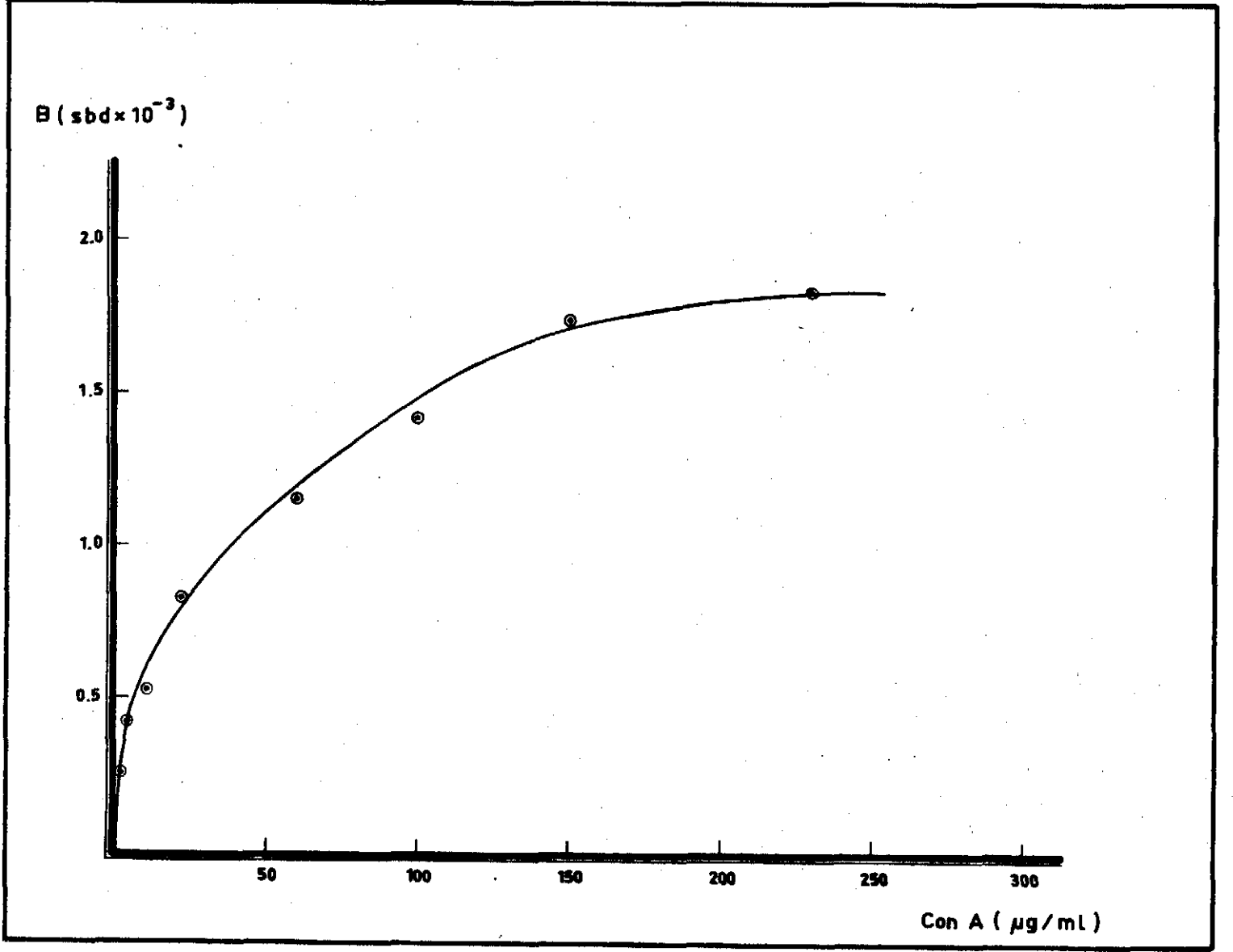
ŞEKİL 18 : Tripsinle muamele edilmiş LU-106 hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

Ordinat : Bağlı / Serbest ³H-Con A

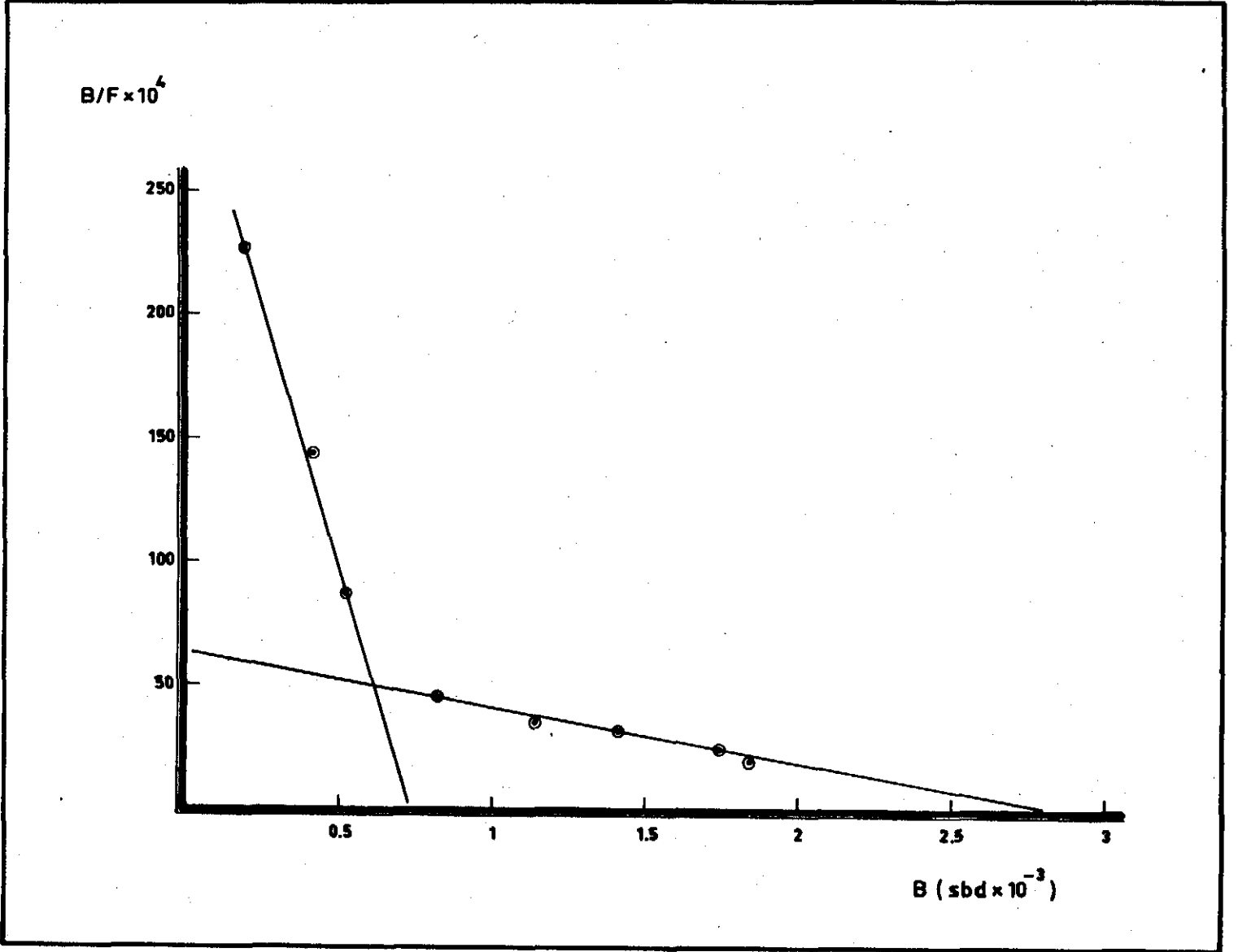
Şekil 19'da kızamık virusu ile kronik olarak enfekte LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi görülmektedir. Hücreler doygunluğa 230 µg/ml ³H-Con A derişiminde ulaşmaktadırlar. Şekil 20'de görülen Scatchard analizi iki ayrı tip reseptörün varlığını göstermektedir. Normal LU-106 hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman kronik enfekte LU-106 hücrelerinin yüksek afiniteli

($24.4 \times 10^6 M^{-1}$) reseptörlerinin normallere göre sayıca 3 kat artarken afinitesinden bakımından 1/20 oranında bir düşüş görülmektedir. Toplam reseptör sayısı hücre başına 8.68×10^6 olurken afinitesinde düşüş olmuştur.



ŞEKİL 19 : Kronik enfekte LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi.

Apsis : 3H -Con A (µg/ml)
Ordinat : Bağlanan 3H -Con A (sbd x 10⁻³)
Hücre : LU-106 (5×10^5 /ml), Kronik enfekte
 3H -Con A : 0.89 - 230 µg/ml
 α -MM (kontrol) : 60 mM
Sıcaklık : 0°C
İnkübasyon zamanı : 60 dakika



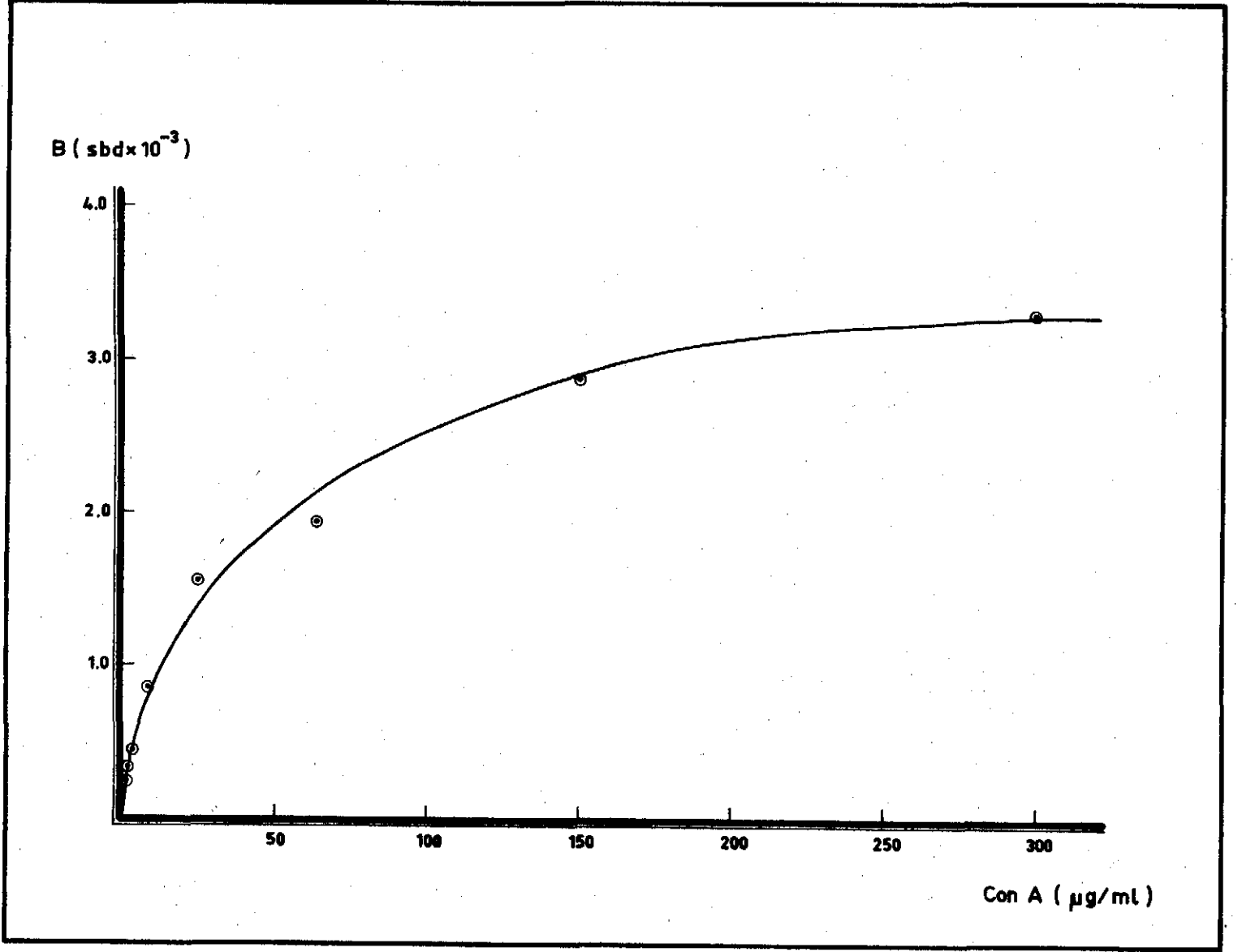
ŞEKİL 20 : Kronik enfekte LU-106 hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

Ordinat : Bağlı / Serbest ³H-Con A

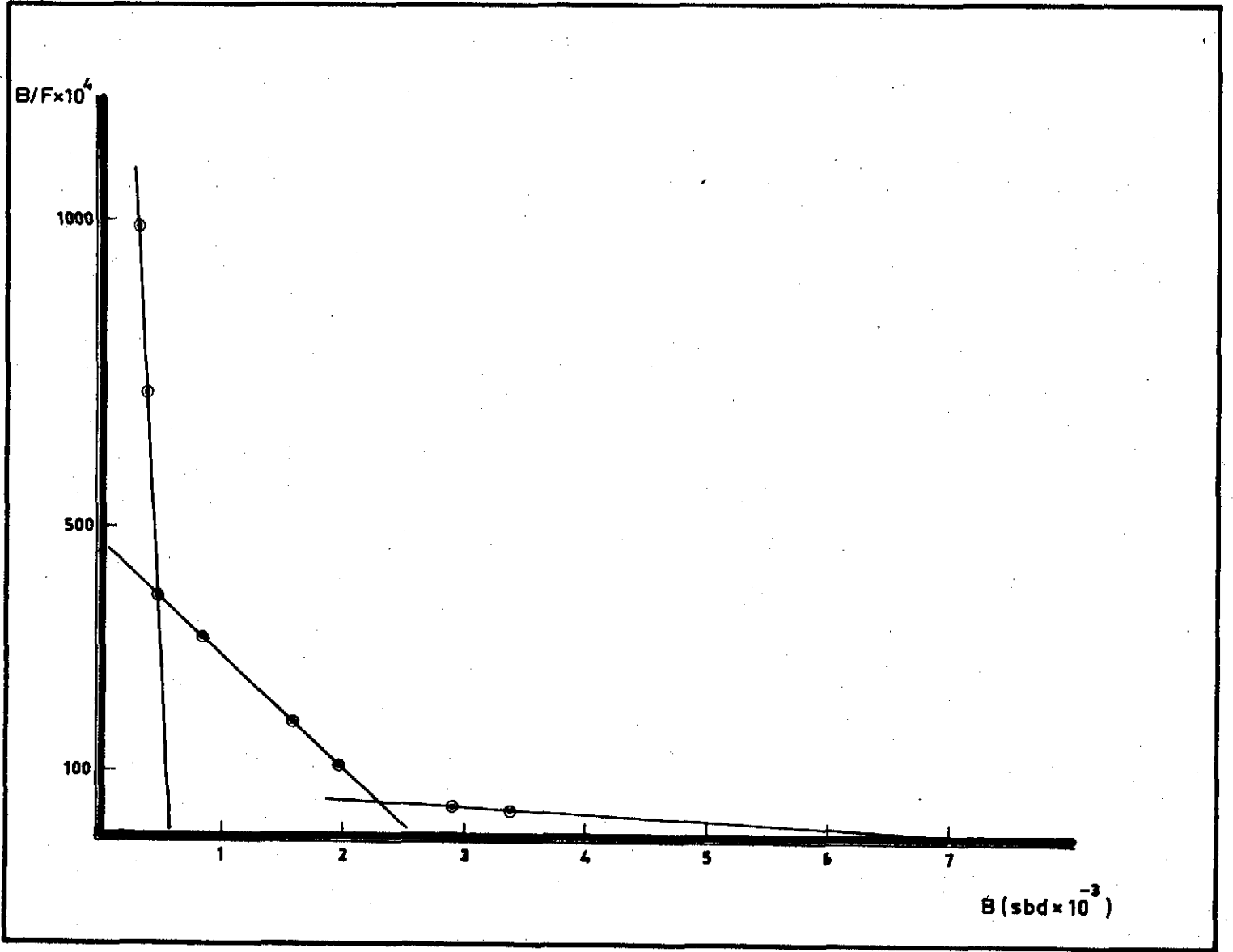
Kızamık virusu ile akut olarak LTCID 50 sıklığında enfekte edilen ve enfeksiyondan 20 saat sonra bağlanma deneyine alınan LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi Şekil 21'de, Scatchard analizi ise Şekil 22'de görülmektedir. Scatchard analizi 3 ayrı tip reseptörün varlığını göstermektedir. Akut enfeksiyon sonucu toplam reseptör sayısında bir misli artış olurken afinite 4 kez düşmüştür. Yüksek afiniteli ($2.43 \times 10^8 M^{-1}$) reseptörlerinin sayısındaki

artış önemli değildir. Ancak normal, kronik enfekte ve tripsinle muamele edilmiş LU-106 hücrelerinde 2 tip reseptör varken akut enfeksiyon sonucu yeni tip reseptörler ortaya çıkmıştır.



ŞEKİL 21 : Akut enfekte LU-106 hücrelerinin bağlanma eğrisi.

Apsis : ³H-Con A (µg/ml)
Ordinat : Bağlanan ³H-Con A (sbd x 10⁻³)
Hücre : LU-106 (6 x 10⁵/ml), Akut enfekte
³H-Con A : 0.85 - 300 µg/ml
α-MM (kontrol) : 60 mM
Sıcaklık : 0°C
İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 22 : Akut enfekte LU-106 hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

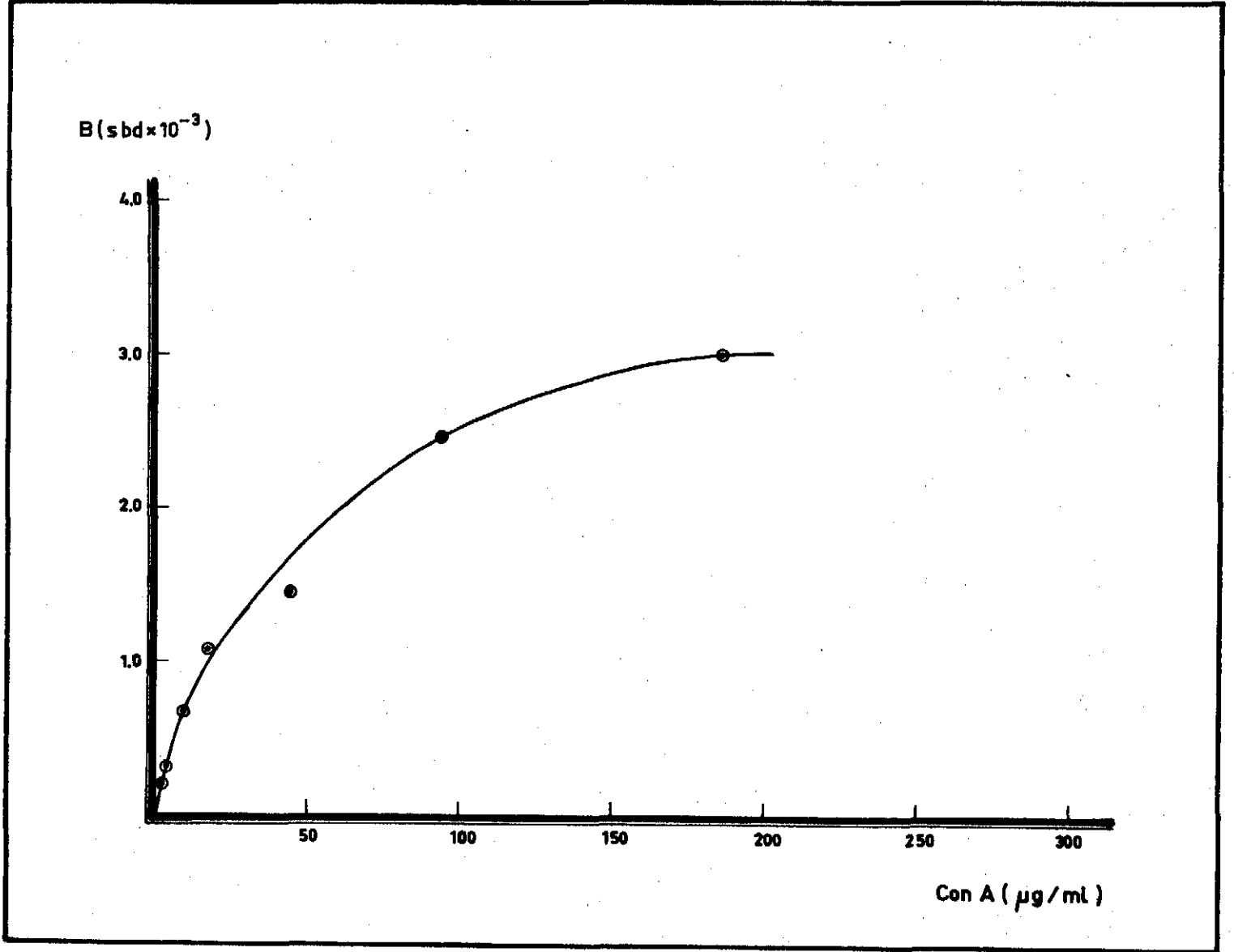
Ordinat : Bağlı / Serbest $^3\text{H-Con A}$

Tablo III'te normal, kronik enfekte ve akut enfekte LU-106 hücrelerinin Con A reseptör sayı ve afiniteleri topluca görülmektedir.

	NORMAL LU-106	KRONİK ENFEKTE LU-106	AKUT ENFEKTE LU-106
$10^{-6} \times K_a$ (M^{-1})	$K_{a1} : 401$ $K_{a2} : 2.72$	$K_{a1} : 24.4$ $K_{a2} : 1.62$	$K_{a1} : 243$ $K_{a2} : 8.11$ $K_{a3} : 0.66$
$10^{-6} \times N$ (Reseptör / Hücre)	$N_1 : 0.89$ $N_2 : 6.59$	$N_1 : 2.41$ $N_2 : 8.68$	$N_1 : 1.18$ $N_2 : 5.72$ $N_3 : 13.62$

Şekil 23'te bebek hamster böbrek hücrelerinin bağlanma eğrisi, Şekil 24'te ise bağlanmanın Scatchard yöntemiyle analizi görülmektedir. Scatchard analizi 2 fazlı çıkmış, diğer bir deyişle BHK hücrelerinde toplam $1.03 \times 10^6 M^{-1}$ afiniteli, 6.24×10^6 reseptör ve bu toplamın % 28'i olan $1.6 \times 10^7 M^{-1}$ afiniteli 1.75×10^6 reseptör bulunmuştur.

Şekil 25'te tripsinle muamele edilmiş BHK hücrelerinin bağlanma eğrisi, Şekil 26'da ise bu bağlanmanın Scatchard yöntemi ile analizi görülmektedir. Scatchard analizi hücrede Con A'ya özgül iki tip reseptör olduğunu göstermektedir. Normal BHK hücreleri ile karşılaştırıldığında bu reseptörlerin afinitelerinin düşmesine karşın sayılarının arttığı anlaşılmaktadır.



ŞEKİL 23 : BHK hücrelerinin bağlanma eğrisi.

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

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

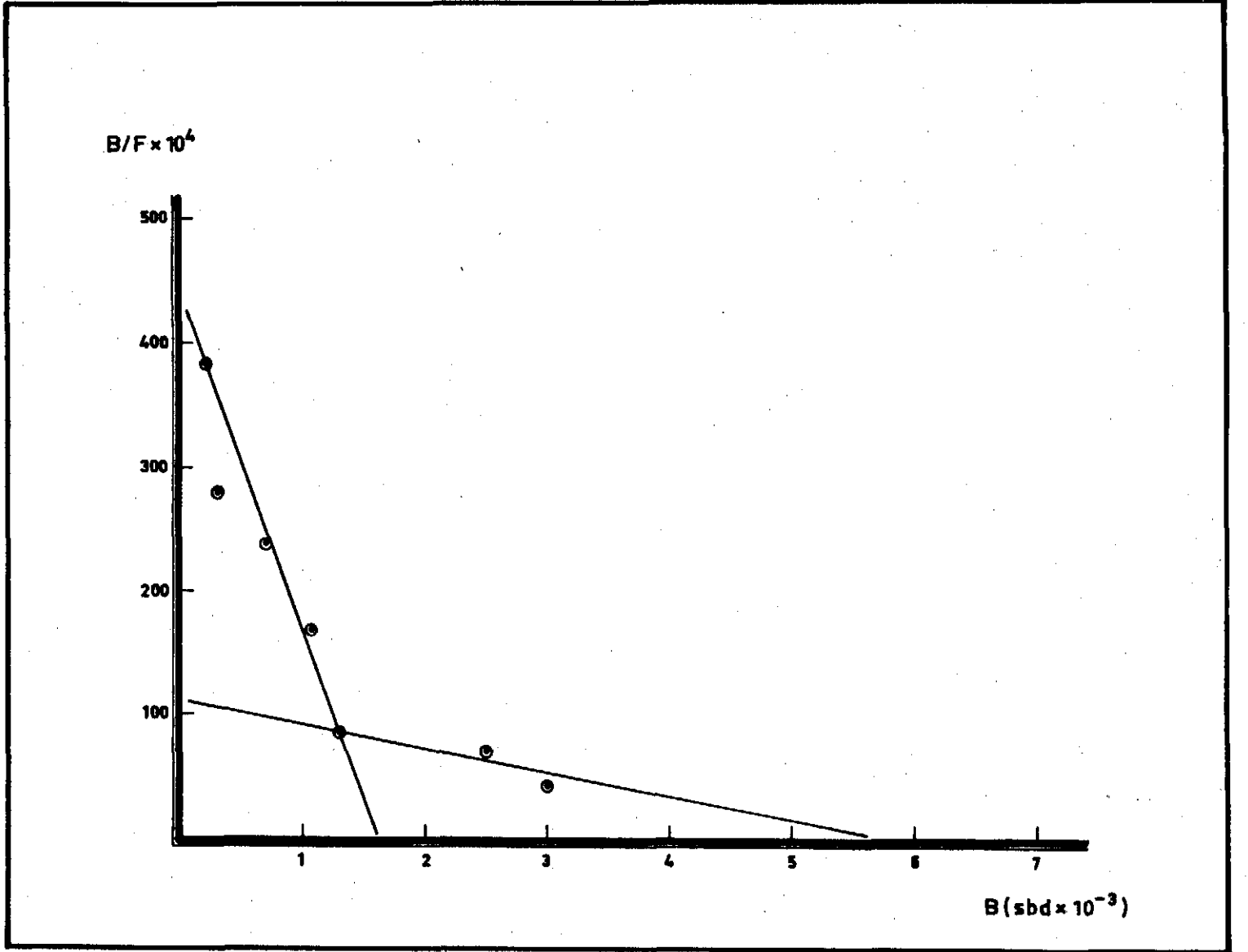
Hücre : BHK ($7.5 \times 10^6/\text{ml}$), Normal

$^3\text{H-Con A}$: 0.85-188 $\mu\text{g/ml}$

$\alpha\text{-MM}$ (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

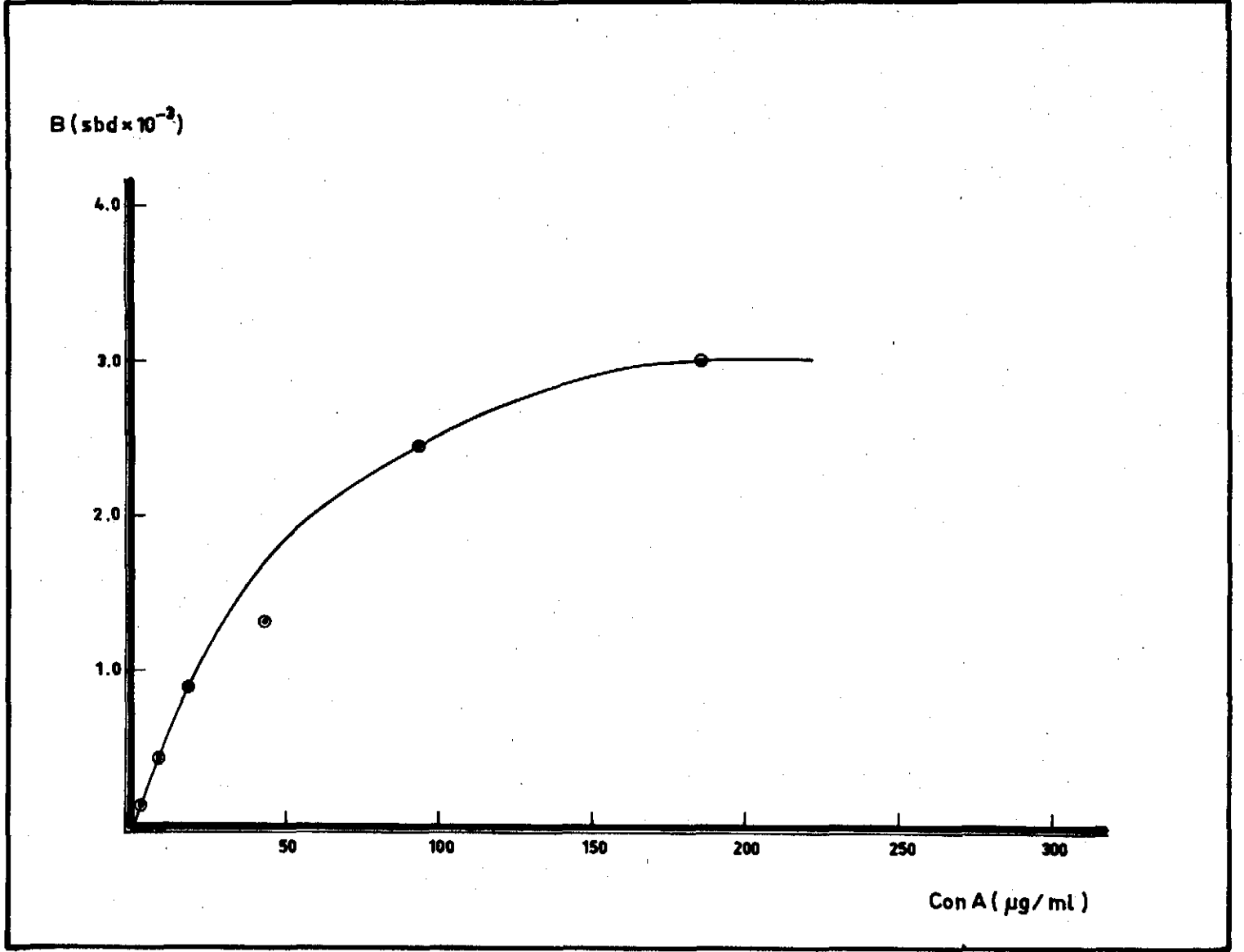
İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 24 : BHK hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

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



ŞEKİL 25 : Tripsinle muamele edilmiş BHK hücrelerinin bağlanma eğrisi.

Apsis : ³H-Con A (µg/ml)

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

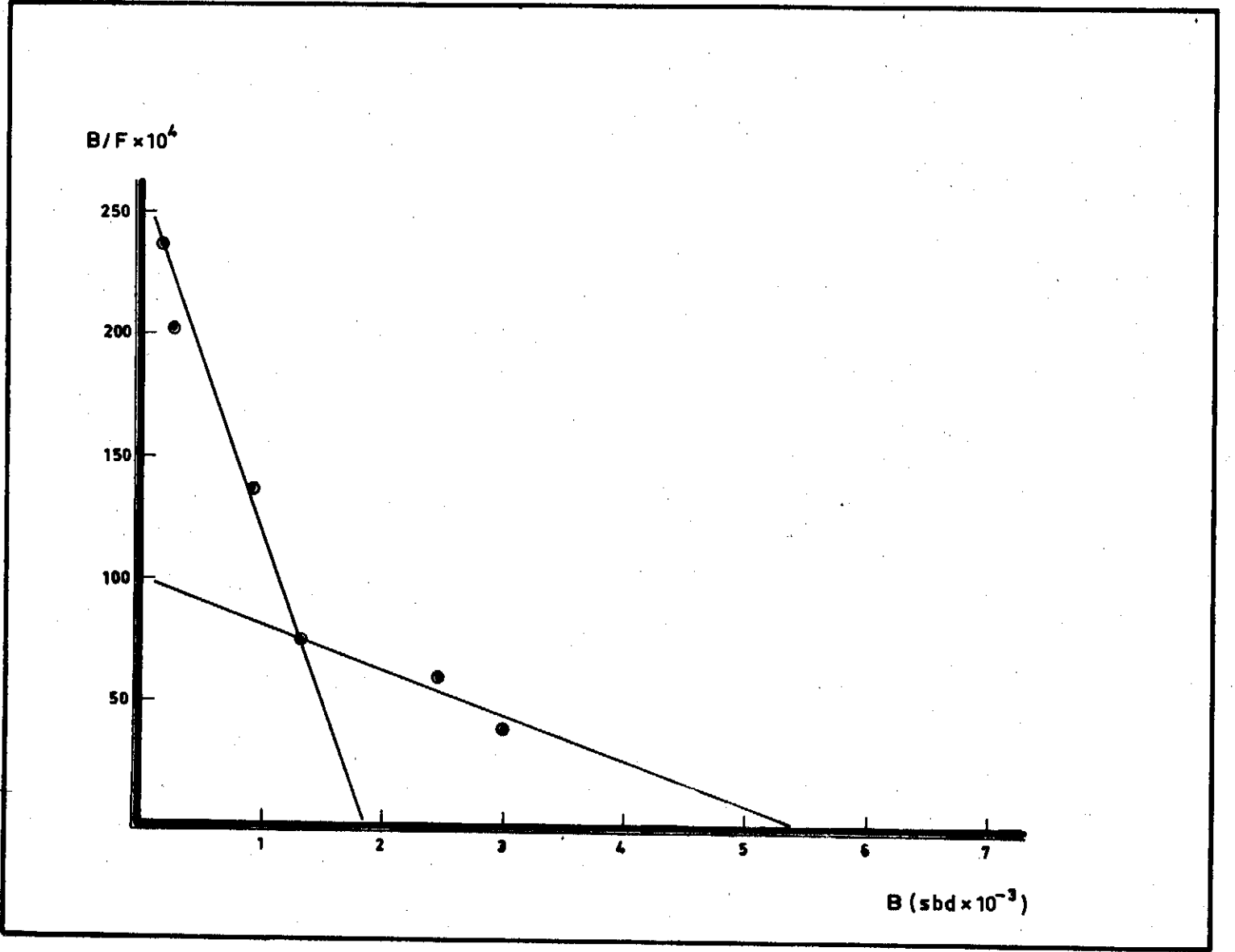
Hücre : BHK (5 x 10⁵/ml), Tripsinize (% 0.25)

³H-Con A : 0.94 - 185 µg/ml

α-MM (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika



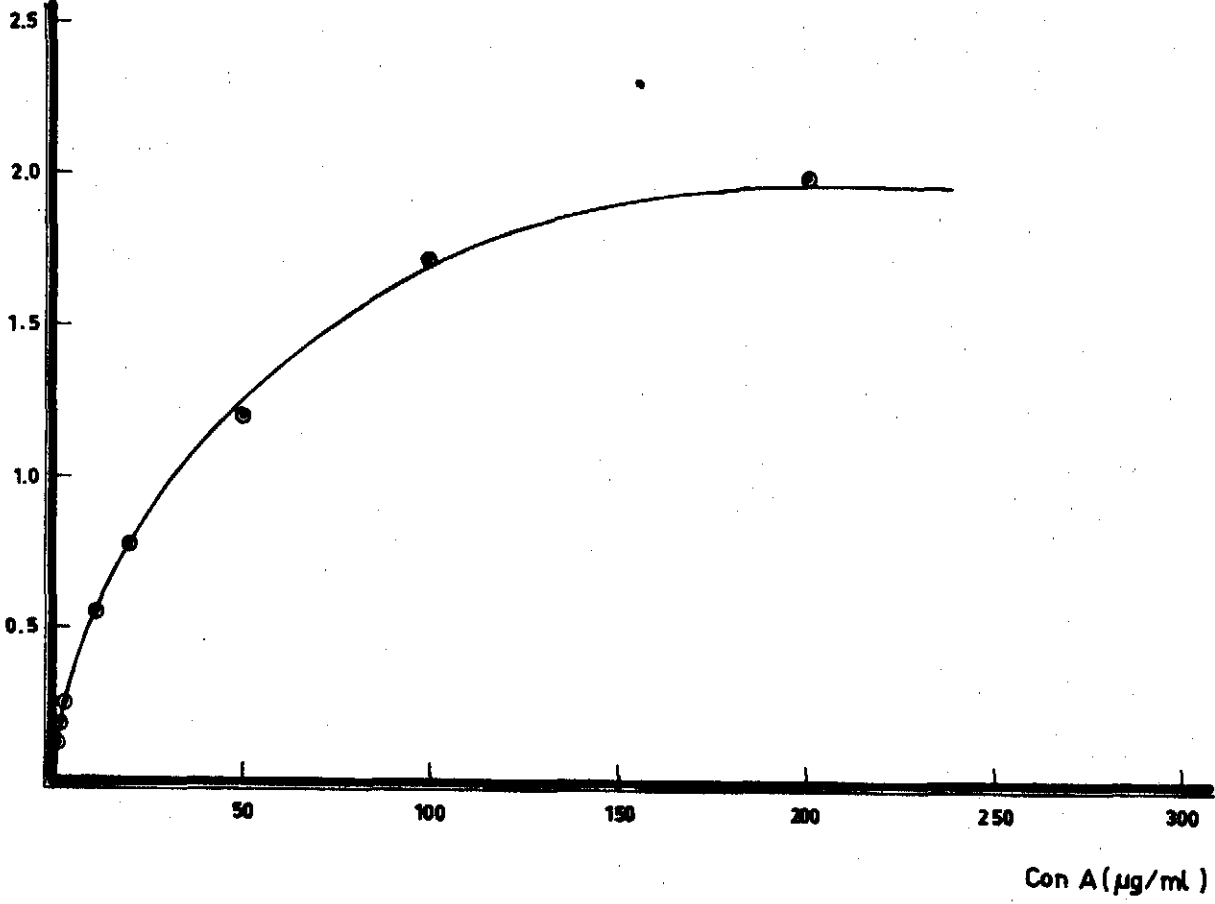
ŞEKİL 26 : Tripsinle muamele edilmiş BHK hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

Ordinat : Bağlı / Serbest ³H-Con A

Şekil 27 ve 28'de polyoma ile transforme BHK hücrelerinin bağlanma eğrisi ve Scatchard doğrusu görülmektedir. Transforme hücreler normallere göre daha az Con A reseptörüne sahip olmalarına karşın, her iki tip reseptörün de afinitelerinin normallere göre önemli bir artış gösterdiği anlaşılmaktadır.

B (sbd $\times 10^{-3}$)



ŞEKİL 27 : Polyoma ile transforme BHK hücrelerinin bağlanma eğrisi.

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

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

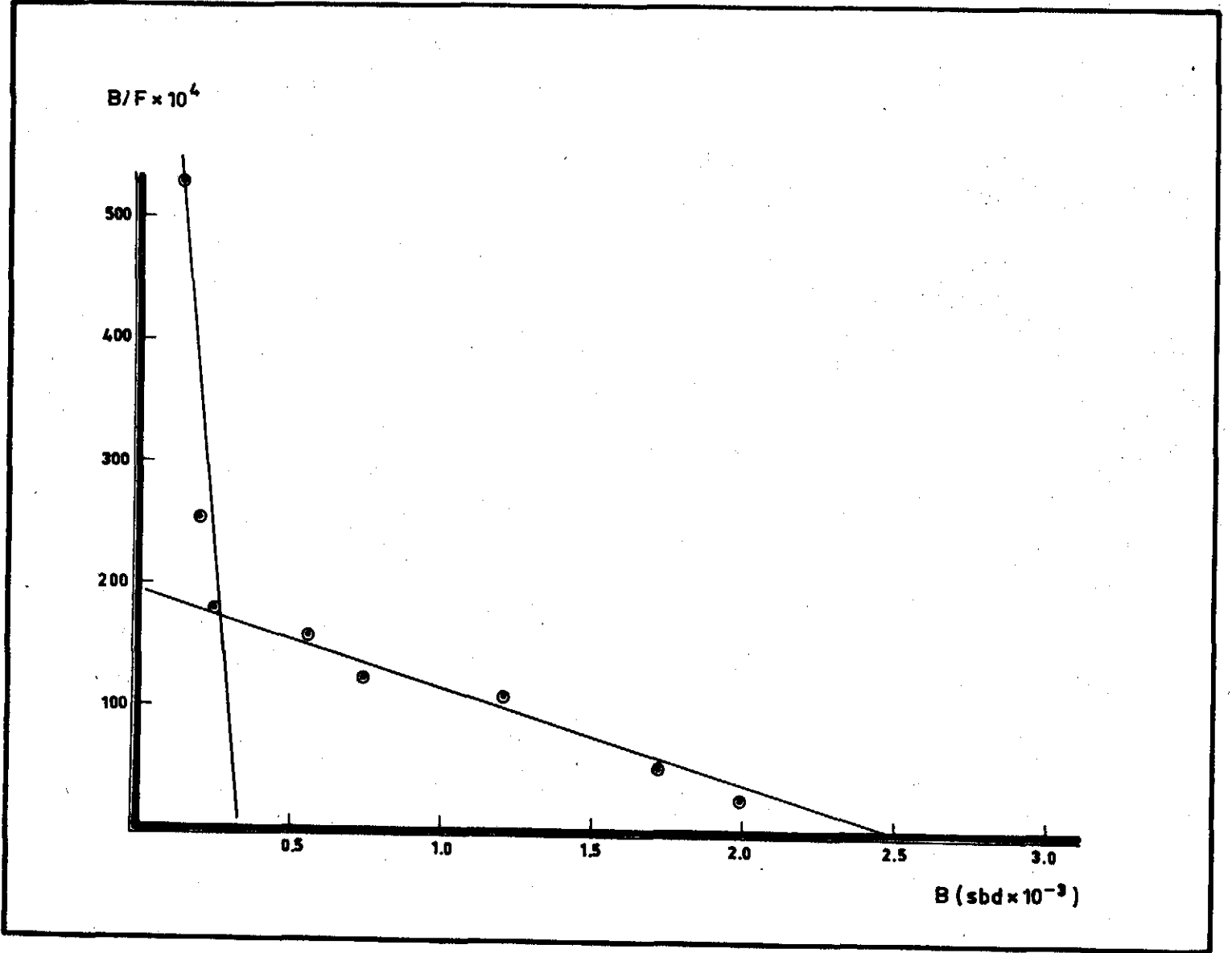
Hücre : BHK ($5 \times 10^5/\text{ml}$), Polyoma ile transforme

$^3\text{H-Con A}$: 0.8 - 200 $\mu\text{g/ml}$

$\alpha\text{-MM}$ (kontrol) : 60 mM

Sıcaklık : 0°C

İnkübasyon zamanı : 60 dakika



ŞEKİL 28 : Polyoma ile transforme BHK hücrelerinin Scatchard doğrusu.

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

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

Tablo IV'de normal ve polyoma ile transforme BHK hücrelerinin Con A reseptörlerinin sayı ve afiniteleri görülmektedir.

Tablo - I V

	BHK (Normal)	Py BHK (Polyoma transforme)
$10^{-6} \times K_a$ (M^{-1})	$K_{a1} : 16.0$ $K_{a2} : 1.03$	$K_{a1} : 92.6$ $K_{a2} : 3.30$
$10^{-6} \times N$ (Reseptör/Hücre)	$N_1 : 1.75$ $N_2 : 6.24$	$N_1 : 0.50$ $N_2 : 3.50$

Tablo V'de MEF, LU-106, BHK ve Vero hücrelerinin Con A reseptör sayı ve afiniteleri topluca görülmektedir.

Tablo - v

	MEF	LU-106	BHK	VERO
$10^{-6} \times K_a$ (M^{-1})	1.52 ∓ 0.65	$K_{a1} : 4.01$ $K_{a2} : 2.72$	$K_{a1} : 16.0$ $K_{a2} : 1.03$	2.09
$10^{-6} \times N$ (Reseptör/Hücre)	15.54 ∓ 8.40	$N_1 : 0.89$ $N : 6.59$	$N_1 : 1.75$ $N : 6.24$	11.05

Tablo VI'da tripsinle muamele edilmiş MEF, LU-106 ve Vero hücrelerinin Con A reseptör sayı ve afiniteleri görülmektedir.

Tablo - VI	MEF	LU-106	BHK
$10^{-6} \times K_a$ (M^{-1})	K_{a_1} : 60.00 K_{a_2} : 0.76	K_{a_1} : 51.72 K_{a_2} : 1.43	K_{a_1} : 6.00 K_{a_2} : 1.10
$10^{-6} \times N$ (Reseptör / Hücre)	N_1 : 1.06 N_2 : 8.69	N_1 : 3.50 N_2 : 20.10	N_1 : 3.68 N_2 : 10.65

T A R T I Ş M A

Concanavalin A hücre yüzeyinin yapısı, işlevi, normal ve transfor-
me hücrelerin karşılaştırılması çalışmalarında özgül bir ligand olarak
pek çok araştırmacı tarafından kullanılan bitkisel kaynaklı bir lektindir.
Sakkarit içeren hücresele reseptörlerin özgül ligandı olarak bilinen Con A
çok değişik tür hücre ile yapılan çalışmalarda gerek reseptör sayısını ge-
rekse kısıtlı sınırlar içerisinde afinitelerini saptamada kullanılabiliri-
r. Bu tür kullanımı için Con A'ya değişik radyoaktif işaretleme yöntem-
leri uygulanmıştır (92,93,94,95). Bunlardan ⁶³Ni-Con A tekrarlanabilirli-
ği, ¹⁴C-Süksinil Con A özgül etkinliğinin düşüklüğü, ¹²⁵I-Con A yarı öm-
rünün kısalığı açısından uygun türevler olarak görülmemektedirler. ³H-
Asetil Con A hem dayanıklı hem de tekrarlanabilir sonuçlar veren bir Con A
türevi olarak seçilmiş, yüksek afiniteli az sayıda reseptörün tanınmasın-
da ortaya zorluklar çıkaran düşük özgül etkinliğinin giderilmesine çalı-
şılmıştır. Bu çalışmada elde edilen ³H-Asetil Con A kullanılan yöntemle
ilgili pek çok yayında bildirilen verim ve özgül etkinliklerden daha yük-
sek verim ve özgül etkinlikle elde edilmiştir (79). Bu sonucun elde edil-
mesinde α -metil mannopirazozit derişimlerinin yüksek tutulması, taze ³H-
asetik anhidrit kullanılması, çözücü olarak kullanılan dioksanın büyük
bir dikkatle susuzlaştırılması ve Con A, asetik anhidrit oranının yakla-
şık 50 kez yüksek tutulması rol oynamıştır. Ayrıca pH sınırı dikkatle

ayarlanarak tetramerik Con A olduğunca yüksek oranda tutulmuştur. Mikro-hemaglutinasyon yöntemi ile ölçülen biyolojik aktivitenin natif Con A ile aynı derişimde gerçekleştirilebilmesi de aktif (tetramerik) ve yüksek etkinlikte Con A elde edildiğinin bir kanıtıdır. İşaretlenmiş Con A'nın saf-laştırılmasında kullanılan değişik Sefadeks türlerinden Sefadeks G-25 (medium) en uygun sonucu vermiş, aynı işlem için Sefadeks G-50 (fine) kullanıldığında hem verimin düştüğü hem de ³H-asetik anhidritin etkin olarak uzaklaştırılmadığı görülmüştür. Ayrıca bu tip Sefadeks türevleri, kromatografi süresinin uzunluğu ve boş hacimlerinin (V_0) büyüklüğü açısından kullanılan α -metil mannopiranozit'in difüzenmesi ile bir miktar da afinite kolonu olarak çalışmışlar ve aktif Con A veriminin düşmesine neden olmuşlardır.

Bu çalışmada kullanılan bağlanma yöntemi özgül olmayan bağlanmayı (Cam, plastik v.b. yüzeylere yapışma) ortadan kaldırması ve endositozun duyarlı bir şekilde ölçülmesine olanak vermesi açısından diğer bağlanma yöntemlerine göre üstünlük taşımaktadır. Con A'nın hücre yüzeyine bağlanmasının inhibisyonu diğer araştırmacıların da (78,96) belirttiği gibi yaklaşık 10 mM α -metil mannopiranozit derişiminde gerçekleşirken, inhibisyon için gerekli inkübasyon zamanı diğer araştırmacıların bildirdiği 120 dakika (96) ve 180 dakikaya (78) karşın 60 dakika olarak bulunmuştur. Gene yapılan deneyler sonucunda endositozun % 18'in üzerine çıkmadığı saptanmıştır. Serbest lektinin ortamdaki uzaklaştırılabilmesi için bağlanmadan sonra hücrelerin yıkanması ve bu işlem için santrifügasyon, gerek sıcaklık değişikliklerine bağlı olarak gerekse fiziksel güçlerin etkisi ile bağlı lektinin hücreden kopmasına neden olmaktadır. Kullanılan albüminli mikrofüj yöntemi, kısılalığı (hücrelerin canlılığının korunması açısından), yıkama ve santrifügasyon işlemlerinin en azda tutulması (ligand-reseptör ilişkisini etkilememek açısından) ve albümin tabakasında yapılan sayımların deneyin kontroluna olanak vermesi açısından

pek çok üstünlükler taşımaktadır. Sağlıklı bir bağlanma deneyinde albümin tabakası sayımı toplam serbest Con A sayımının % 1'inden az olmaktadır. Albümin fraksiyonunda yüksek sayım olması hücre canlılığının veya reseptör-ligand ilişkisinin bozulmasını göstermektedir. Albüminli mikrofüj yönteminden daha sağlıklı bir yöntem olarak düşünülen çabuk süzme yöntemi, kullanılacak süzme materyalinin özelliklerine bağlı olarak son derecede sağlıklı sonuçlar verebilir. Örneğin bu çalışmada 0.22 ve 0.45 mikron çapında millipore filtreler denenmiş ancak büyük ölçüde Con A bağladığından sağlıklı sonuçlar elde edilmesine neden olmuştur (Bildirilmemiş sonuçlar). Bağlanma deneylerinde sıcaklığın 0-4°C aralığında tutulması bu deneylerin yorumlanmasını güçleştiren endositozu büyük ölçüde ortadan kaldırması bakımından yararlı ise de zar yapısında reseptör çevresini etkilemesi olasılığı en büyük sakıncasıdır. Bu yüzden bu sıcaklıkta yapılan bağlanma deneyleri tek başlarına değerlendirilmeyip mutlaka aynı şartlarda gerçekleştirilmiş kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmelidir.

Reseptör çalışmalarında reseptörlerin sayı, afinite ve heterojenliğini ölçmek için en çok kullanılan yöntem Scatchard yöntemidir (90). Orjinal olarak Scatchard analizi küçük ligandlar için düşük afiniteli bağlanma bölgelerine sahip çözümlü makromoleküller için kullanılmıştır. Oldukça sık görülen yüksek afiniteli sistemlerin çalışılması sırasında, özellikle de yüksek sayıdaki bağlanma bölgelerinin toplama göre küçük bir oranının doldurulduğu durumlarda, ligandın yaklaşık % 10'nun bağlanmasında artan ligand derişimi ile bağlanmanın artışı doğrusal bir şekilde görülebilir. Böyle bir sonuç Scatchard analizinde yatay bir eğri verir ki bu yanlış olarak sonsuz sayıda reseptörün varlığını gösterir (97). Bu çalışmada elde edilen bağlanmalar hiç bir şart ve hiç bir derişimde ortama konan toplam serbest lektinin % 2'sini geçmemiştir. Bu yüzden Scatchard analizi sonucu elde edilen afinite ve reseptör sayıları sağlık-

lı bir sonucu yansıtacak niteliktedir.

Scatchard analizinde gözönünde tutulması gereken bir başka önemli nokta da işaretlenmiş ligandın afinitesini işaretlenmemiş olandan farklı olduğu durumlardır. Bu durum, doğrusal olmayan (non-linear) Scatchard eğrilerinin elde edilmesine neden olur. Bunun sebebi işaretli ligand ile kontrol olarak kullanılan işaretlenmemiş ligandın bağlanma sırasında reseptöre karşı yarışmalarının farklı oluşundandır (98). Ancak bu çalışmada kullanılan ³H-Con A ile natif Con A arasında değişik tür hücrelerin lektin reseptörlerine bağlanma açısından bir fark bulunmadığının hem literatürde belirtilmesi (99), hem de mikrohemaaglutinasyon yöntemiyle saptanmış olması elde edilecek heterojenitenin kesin olarak reseptör heterojenitesi olduğunu ortaya koymaktadır.

Scatchard eğrileri bağlanma eğrisinin her iki ucunu da gösterdiği için bağlanma esnasında olabilecek eser miktardaki özgül olmayan bağlanma bile eğrinin doğrusallığını bozar ve sanki düşük afiniteli yüksek sayıda reseptörler varmış gibi bir görünüm verir. Bu açıdan en sağlıklı sonuçları en düşük doygunluk noktalarından elde etmek daha doğrudur. Bu tip doğrusal olmayan Scatchard eğrilerinin bir başka nedeni ise pozitif veya negatif kooperativite veya reseptör heterojenitesidir. Bu çalışmada elde edilen önemli afinite değişiklikleri genellikle en düşük doygunluk noktalarından elde edildiğinden yöntemin en güvenilir bölgesine düşmektedir.

Hücre yüzeyinde bulunan glikoprotein yapısındaki reseptörlerin tanımlanmasında ve irdelenmesinde kullanılabilecek işaretlenebilir, özgül, standard kabul edilebilecek bir ligandın bulunmasına karşın tepkimenin ikinci bileşeni olan hücre (reseptörleri) aynı derecede özgül ve standard kabul edilemez. Gerek hücre türlerinin gerekse bir hücrenin değişik şartlardaki yüzey özelliklerinin heterojenliği bağlanma deneyleri ile reseptör

sayı ve afinitelerinin saptanmasını zorlaştırmaktadır. Hernekadar doku kültürü tekniklerinin ilerlemesi tek tip hücre ile çalışma olanağını büyük ölçüde sağlamışsa da hücre zarının dinamiği kültür hücrelerinde bile istenen standartlığa ulaşmayı engellemektedir. Bu parametreyi olabileceğince değişmez tutabilmek için pek çok araştırmacı çalışmalarında sürekli hücre kültürleri kullanmışlardır (78,100,101,102). Oysa gerek viral enfeksiyon gerekse viral transformasyondan ileri gelen değişiklikleri incelemeye, normal kabul edilen bu hücreler sürekli kültür olabilmek için bazı yüzey özelliklerini değiştirmişlerdir. Örneğin fare 3T3 hücreleri bugün bütün dünyada "normal" hücre modeli olarak kabul edilmesine karşın tümörojenez özellikler taşıdığı saptanmıştır (103). Diğer taraftan tamamen normal kabul edilebilecek birkaç pasajdan fazla üretilmemiş kültür hücreleri spontan transformasyon, büyüme şartlarına ve tek tabakalaşma (monolayer) yüzdesine aşırı bağımlılık gibi sakıncaları ile bağlanma deneylerinde "kullanılmaz" olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu çalışmada yukarıda anlatılan bütün sakıncaları içermesine karşın ikinci pasaj MEF hücreleri bağlanma deneylerinin zaman, derişim, sıcaklık, özgül inhibitöre duyarlılık gibi parametrelerin standardizasyonunda kullanılmıştır. Şekil 9 ve 10 incelendiği zaman bu hücreler düzgün bir hiperbolik bağlanma eğrisi ve buna bağlı olarak tek fazlı bir Scatchard doğrusu göstermektedirler. Bağlanma deneylerinin şartlarının saptanmasında da gerek zaman bağımlılığı gerek derişim bağımlılığı ve gerekse özgül inhibitör etkilerinin incelenmesinde beklenen kinetik kurallara uygun sonuçlar elde edilmiştir. Reseptör sayısı ve afiniteleri açısından incelendiğinde oldukça geniş sınırlar arasında değişen değerlerle karşılaşmıştır ($K_a = 1.52 \pm 0.65 \times 10^6 M^{-1}$, $N = 15.54 \pm 8.40 \times 10^6$ reseptör/Hücre). Bu sonucun aşağıda sayılan parametrelerden birinin değişmesine bağlı olduğu kanısındayız; a) kullanılan sıçan embriyosunun yaşı, b) tek tabakalaşma yüzdesi, c) tek tabakalaşma için geçen zaman süreci (ortamın besinsel gücüne bağımlıdır),

d) ortamın pH'sındaki ufak değişiklikler. Hernekadar MEF hücreleri unaploid karakterde hücreler olduğundan daha üniversal bir model olarak karşımıza çıkmaktaysa da yukarda sayılan nedenlerden ötürü enfeksiyonun ve transformasyonun incelenmesinde sürekli kültürler özellikleri açısından ağırlık kazanmaktadır.

Doku kültürü işlemlerinin belki de en önemlisi ve özellikle de bağlanma deneylerinde en etkili olanı hücrelerin kültür ortamından sökülmesidir. Bunun için kullanılan iki ana yöntem; tripsinizasyon ve EDTA ile muameledir. Bu çalışmada tek tabakalaşma yüzdesi yaklaşık % 95'in üzerinde olan hücreler her iki yöntemle de ayrı ayrı sökülmiş ve bu yöntemlerin afinite ve reseptör sayılarına etkisi araştırılmıştır. Bu etkiler ilerde transformasyon tartışmasında tekrar ele alınacaktır.

Bu çalışmanın ikinci kısmında akut, kronik ve onkojenik viral enfeksiyonların hücre yüzeyinde yaptığı değişiklikleri glikoprotein yapısındaki Con A reseptörlerinin sayı ve afiniteleri açısından irdelemek, model sistemle saptanan şartlardan yararlanılarak incelendi. Akut ve kronik enfeksiyon için heteroploid insan akciğer hücreleri (LU-106), onkojenik transformasyon için ise bebek hamster böbrek hücreleri (BHK/C13) kullanıldı. İnsan akciğer hücreleri kronik enfekte hücre kolonilerinin saf ve yüksek verimle elde edilebildiği hücreler olduğundan, bebek hamster böbrek hücreleri ise transforme hücre kolonilerinin tek tip olarak ayrılabilirdiği hücreler olduğundan seçilmişlerdir.

Daha önce de belirtildiği gibi kızamık akut olarak enfekte ettiği hücrelerden tomurcuklanarak olgunlaşır. Tomurcuklanma işleminden önce viruse özgül glikoproteinler hücre zarına monte edilirler. Bu özgül glikoproteinler virusun zarf yapısında yer alan glikoproteinlerdir. Ancak kronik enfekte taşıyıcı (kızamık virusu genomunu ve bazı antijenlerini taşıyan

hücre) hücrelerde bazı viral antijenlerin sentezine rağmen virus olgunlaşamaz. Özellikle hücre yüzeyinde virus tarafından meydana getirilebilen değişikliklere rağmen virus olgunlaşamaz. Virusun olgunlaşmamasının nedeni akut olarak enfekte hücrelerden farklı proteinlerin ekspresyonuna bağlı olabilir. In vitro olarak düşünülen bu farklılık bizim çalışmamızdaki Con A bağlama özellikleri ile de açıkça görülmektedir. Ancak bu farklılıkları oluşturan nedenlerin viral proteinlerden mi yoksa viral enfeksiyon sonucunda taşıyıcı hücrelerde ortaya çıkan "cryptic" bölgelerden mi olduğunu saptamak için yüksek titrede kızamık virusu antiserumu kullanılarak yapılacak deneylere gereksinim vardır. Böylece akut ve kronik enfekte hücrelerin benzer ve farklı antijenik özellikleri anlaşılacaktır. Ayrıca kızamık virusunun oluşturduğu subakut siklerozan pan ensefalitli hasta serumu kullanılarak akut ve kronik enfekte hücrelerdeki ortak viral antijenler, kronik enfeksiyonun oluş mekanizmasında geçerli olabilecek şekilde karşılaştırılabilir, böylece SSPE ile kızamık virusu arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına katkıda bulunabilecektir.

Tablo 3'te görüldüğü gibi "normal" LU-106 hücreleri çok yüksek afiniteli ($4.01 \times 10^8 M^{-1}$) 8.9×10^5 adet reseptör içerirken, kronik enfekte hücrelerde bu tip reseptörlerin afiniteleri yaklaşık yirmi kez düşmekte sayıları ise üç kez artmaktadır. Akut enfekte hücrelere 3H -Con A bağlanması Scatchard yöntemiyle irdelendiğinde üç fazlı bir Scatchard doğrusu elde edilmiştir. Bu üç faz üç ayrı tip reseptörü göstermektedir. Toplam reseptör sayısı "normal" hücrelerde yaklaşık 6.5 milyon iken akut enfekte hücrelerde bu sayı 13.5 milyona ulaşmaktadır ki bu yeni glikoproteinlerin zara yerleştirilmesi yani viral antijen ekspresyonu olarak değerlendirilmiştir. Kronik enfekte hücrelerde 8.5 milyon civarında olan toplam reseptör sayısı bu tip enfeksiyonda bazı viral antijenlerin eksikliği ni vurgulamaktadır.

Hücre zarının pek çok özellikleri transformasyon yani in vitro tümörleşme sonucu değişirse de bunlardan pek azı neoplastik durumun geçerli belirtileri olarak bildirilmiştir (38,104). Transforme hücrelerin ve özellikle virus transforme hücrelerin "transforme" olduklarının delillerinden biri de 1970-1975 arasında geliştirilmiş yöntemlerle saptanan lektinler aracılığı ile aglutine olma özelliğidir (31,32,74,75,76). Bu tip hücreler genellikle "normal" türlerine göre çok daha düşük lektin derişimlerinde aglutinasyon gösterirler. Bu genel kuralın dışında kalan pek çok hücre türü de daha sonraki yıllarda tarif edilmiş (105,106) ve aglutinasyon yönteminin transforme hücre zarı özelliklerini saptamada genel bir bilgi sağlanmasına karşın mekanizma aydınlatıcı özgül bilgiler sağlayamayacağı anlaşılmıştır. Çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına karşın aglutinasyonun lektin reseptörlerinin dağılımlarının değişmesinden mi, mobilitelerinin değişmesinden mi yoksa yeni "criptic" bölgelerin ortaya çıkmasından mı kaynaklandığı henüz kesinlik kazanmamıştır (31,32,74,75,76). Özellikle bir çok hücre türünün proteolitik enzimlerle kısa süreli muamelesinden sonra aglutinasyon özelliklerinin artması transformasyonla proteoliz arasındaki benzerliklerin araştırılmasına neden olmuşsa da yine kesin bir sonuca ulaşılamamıştır.

Bu çalışmada daha özgül bir yaklaşım amaçlanmış normal, transforme ve proteolize uğratılmış hücrelerin reseptör sayı ve afiniteleri saptanmıştır. Tablo 5 ve Tablo 6 karşılaştırmalı olarak incelenecek olursa proteolizden sonra kullanılan tüm hücre tiplerinde (MEF, LU-106 ve BHK) reseptör sayı ve afiniteleri bakımından önemli farklılıklar görülecektir. Proteoliz sonucu MEF hücrelerinde yüksek afiniteli 1.06×10^6 adet yeni reseptör ortaya çıkmıştır. Toplam reseptör sayısı bakımından hernekadar bir düşme görülüyor gibiyse de bu daha önce belirtilen ve MEF hücrelerinin özelliğinden ortaya çıkan yüksek standard sapmadan kaynaklanmaktadır.

Ancak toplam reseptörlerin afinitesinde diğer hücrelerde de görüldüğü gibi bir azalma görülmektedir. LU-106 ve BHK hücrelerinde ise proteolize bağlı değişiklikler çok daha belirgindir. Bu hücrelerin reseptör sayıları proteoliz sonucu 2-3 kat artarken afiniteleri bir kaç kez düşmektedir.

Polyoma ile transforme hücrelerde ise değişiklik proteolizle ortaya çıkan durumdan farklıdır. Transformasyon sonucu BHK hücrelerinin Con A reseptörleri sayısında bir düşme gözlenirken, bu reseptörlerin Con A'ya karşı afinitelerinde 3-5 kat artış görülmektedir (Tablo 4). Bu bulgular proteoliz ile transformasyonun en azından kullanılan hücre türü için farklı mekanizmalar içerdiğini vurgulamaktadır.

Pek çok araştırmacı değişen aglutinasyon özelliği ile lektin reseptörlerinin sayısı arasında ilişki kurmaya çalışmışsa da bu konuda birbirinden farklı görüşler ortaya çıkmıştır. Araştırmacıların bir kısmı transformasyondan sonra aglutinasyonun artmasına karşın lektin reseptörlerinin sayısında herhangi bir değişiklik olmadığını söylemektedirler (77,78). Noonan ve Burger adlı araştırmacılar ise transformasyon sonucu Con A reseptörlerinin sayısının büyük ölçüde arttığını söylemektedirler (79). Nicolson vd. ise normal BHK, polyoma ile transforme BHK ve sıcaklığa hassas polyoma ile transforme BHK hücreleri ile yaptıkları çalışmalar sonucunda transforme hücrelerin normallere göre daha düşük lektin derişimlerinde aglutine olmalarına karşın, daha az sayıda *Ricinus communis* aglutini (RCA_1) reseptörü içerdiğini saptamışlardır (80). Bu sonuç bizim bulgumuzla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada reseptör sayılarından çok glikoprotein yapısındaki bu reseptörlerin belki lipid çevresindeki belki de tersiyer ve kuartern yapılarındaki değişiklikleri yansıtan afiniteleri üzerinde durulmuştur. Transformasyon sürecinde bir hücre yüzeyini hemen değiştirmemektedir.

Kalıcı değişikliklerin gözlenebilmesi için onkojenik bir virus tarafından gerçekleştirilen transformasyondan sonra en az bir mitoz aralığı ile belirlenen hücre döngüsünün geçmesi gerekmektedir. Bu yüzden gerek abortif transformasyonlar sonucu gerekse proteaz sonucu gözlenen aglutinasyon değişiklikleri diğer bir deyişle ani değişiklikler transformasyon sonucu olan kalıcı değişikliklerle eş tutulmamalıdır. Reseptör afinitelerindeki değişiklikler kanımızca büyük ölçüde hücre zarının lipid çift tabakasındaki özgül fosfolipid değişikliklerine bağlıdır, çünkü bir proteinin şu veya bu bağlama bölgesindeki bir değişiklik daima o proteinin tersiyer ve bununla ilişkili olarak kuarterner yapısındaki değişikliklere bağlıdır. Zarsal proteinlerde hidrofobik bölgelerle zara tutunma son derecede özgül bir bağlanma olduğundan zarsal bir proteinin yapısındaki bir değişiklik genelde zar çevresinde bir değişikliğe neden olur veya bu değişikliğin bir nedenidir. O halde yaklaşık 6 kat değişik afiniteye neden olan transformasyonda reseptör proteininin hala zar da kalabilmesi ancak gömülü olduğu lipid çift tabakasındaki değişikliklerle el ele gitmesi halinde anlam kazanır. Bu önerinin kesin kanıtı izole transforme hücre zarlarının fosfolipid kompozisyonu, asimetrisi ve mobilitesinin ölçümü ve transforme zarlardan saflaştırılan yüksek afiniteli reseptörlerin tersiyer ve kuarterner yapılarının aydınlatılması ile ortaya çıkacaktır. Günümüzde biyokimyada kullanılan yöntemler her iki tür çalışmaya da olanak vermektedir.

Ö Z E T

Bu çalışmada fare embryo fibroblastları (MEF), heteroploid insan akciğer hücreleri (LU-106), bebek hamster böbrek hücreleri (BHK) ve Afrika yeşil maymunu böbrek hücreleri (Vero) kullanılarak, hücre yüzeyinde bulunan glikoprotein yapısındaki Con A reseptörlerinin sayı ve afinitelerinin saptanmasına çalışıldı. ³H-Con A kullanılarak mikrofüj tekniği ile yapılan bağlanma deneyleri sonucunda elde edilen değerler Scatchard yöntemiyle değerlendirildi.

MEF ve Vero hücrelerinin tek tip reseptör içerdiği elde edilen Scatchard doğrularının tek fazlı olmasından anlaşıldı.

İki fazlı bağlanma eğrisine sahip LU-106 hücrelerinin kızamık virusu ile akut ve kronik enfeksiyonunun Con A reseptörlerinin sayı ve afinitelerini etkilediği saptandı. Normal LU-106 hücrelerinde yüksek ve düşük afiniteli 2 tip reseptör varken, akut enfeksiyondan sonra üçüncü tip olarak yeni reseptörlerin ortaya çıktığı anlaşıldı. Kronik enfeksiyonda ise yeni tip reseptörler ortaya çıkmamasına karşın normal hücrede bulunan reseptörlerin sayı ve afinitelerinde büyük değişiklikler gözlemlendi. Reseptör sayı ve afinitelerindeki bütün bu değişiklikler enfeksiyonun tipi ve kızamık virusu antijenlerinin hücre yüzeyinde belirmesi gözönünde tutularak tartışıldı.

BHK hücrelerinin onkojenik DNA virus grubuna dahil polyoma virusu ile transformasyonu sonucunda, normal BHK hücrelerinin yüzeyinde bulunan Con A reseptörlerinin sayılarındaki azalmaya karşın afinitelerindeki büyük artışın reseptör proteininin tersiyer ve kuarterner yapısındaki değişikliklere bağlı olarak hücre zarının lipid çift tabakasındaki özgül fosfolipid değişikliklerinden kaynaklandığı düşünüldü.

Çeşitli hücrelerin (MEF, LU-106, BHK) proteolitik bir enzim olan tripsin ile muamelesi sonucunda hücre Con A reseptörlerinin sayısında önemli bir artışa karşın afinitelerinde düşüş gözlemlendi. Bu sonuç transformasyon ile proteolizin en azından kullanılan hücre tipine bağlı olarak farklı mekanizmalar sonucunda meydana geldiği görüşünü kuvvetlendirdi.

K A Y N A K L A R

1. Stillmark, H., *Inang. Dis. Dorpat.*, 3, 59 (1888).
2. Sumner, J.B., ve Howell, S.F., *J. Bacteriol.*, 32, 227, (1936).
3. Bird, G.W.C., *Brit. Med. J.*, 15, 165 (1959).
4. Boyd, W.C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 169, 168 (1970).
5. Pardoe, G.I., ve Uhlerbruck, G., *J. Med. Lab. Technol.*, 27, 249 (1970).
6. Jones, D.B. ve Johns, C.O., *J. Biol. Chem.*, 28, 67 (1916).
7. Agrawal, B.B.L., ve Goldstein, I.J., *Biochem. J.*, 96, 230 (1965).
8. Agrawal, B.B.L., ve Goldstein, I.J., *Biochem. Biophys. Acta*, 147, 262 (1967).
9. Olson, M.O.J., ve Liener, I.E., *Biochemistry*, 6, 105 (1967).
10. Kabat, E.A., ve Mayer, M.M., *Experimental Immunochem. Thomas Co.*, Springfield, III. p: 114-116 (1961).
11. Sumner, J.B. ve Howell, S.F., *J. Biol. Chem.*, 115, 583 (1936).
12. Agrawal, B.B.L., ve Goldstein, I.J., *Can. J. Biochem.*, 46, 1147 (1968).
13. Kalb, A.J., ve Levitzki, A., *Biochem. J.*, 109, 669 (1968).
14. Brewer, C.F., Marcus, D.M., ve Grollman, G.P., *J. Biol. Chem.*, 249, 4614 (1974).
15. Von Goldhammer, E., ve Zorn, H., *Eur. J. Biochem.*, 44, 195 (1974).
16. Mckenzie, G.H., Sawyer, W.H., ve Nichol., L.é., *Biochem. Biophys. Acta.*, 263, 283 (1972).

17. Hassing, G.S., ve Goldstein, I.J., *Eur. J. Biochem.*, 16, 549 (1970).
18. Gordon, J.A., ve Marquardt, M.D., *Biochem. Biophys. Acta*, 332, 136 (1974).
19. Huet, C., Lonchamp, M., Huet, M., ve Bernadac, A., *Biochem. Biophys. Acta*, 365, 28 (1974).
20. Doyle, R.J., Pittz, E.P. ve Woodside, E.F., *Carbohydrate Res.*, 8, 89 (1968).
21. Pflumm, M.N., ve Beychok, S., *Biochemistry*, 13, 4982 (1974).
22. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J., Hassing, G.S. ve So, L.L., *Biochemistry*, 7, 4211 (1968).
23. Edmundson, A.B., Ely, K.R., Sly, D.A., Westholm, F.A., *Biochemistry*, 10, 3554 (1971).
24. Wang, J.L., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J., ve Edelman, G.M., *J. Biol. Chem.*, 250, 1490 (1975).
25. Recke, G.N., Jr., Becker, J.W., ve Edelman, G.M., *J. Biol. Chem.*, 250, 1525 (1975).
26. Barber, B.H. ve Carver, J.P., *J. Biol. Chem.*, 248, 3353 (1973).
27. Grimaldi, J.J. ve Sykes, B.D., *J. Biol. Chem.*, 250, 1618 (1975).
28. Hardman, K.D. ve Ainsworth, C.F., *Biochemistry*, 12, 4442 (1973).
29. Alter, G.M., ve Magnuson, J.A., *Biochemistry*, 13, 4038 (1974).
30. Goldstein, I.J., Reichert, C.M., ve Misaki, A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 234, 283 (1974).
31. Lis, H., ve Sharon, N., *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 541 (1973).
32. Nicolson, G.L., *Int. Rev. Cytol.*, 39, 89 (1974).
33. Cuatrecasas, P., *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 169 (1974).
34. Cuatrecasas, P., ve Hollenberg, M.D., *Adv. Prot. Chem.*, 30, 251 (1976).
35. Nicolson, G.L., *Biochem. Biophys. Acta*, 457, 57 (1976).
36. Singer, S.J., ve Nicholson, G.L., *Science*, 175, 720 (1972).

37. Hong, K., ve Hubbell, W.L., *Biochemistry*, 12, 4517 (1973).
38. Oseroff, A.R., Robbins, P.W., ve Burger, M.M., *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 647 (1973).
39. Pardee, A.B., *Biochem. Biophys. Acta*, 417, 153 (1975).
40. Hynes, R.O., *Biochem. Biophys. Acta*, 458, 73 (1976).
41. Nicolson, G.L., *Biochem. Biophys. Acta*, 458, 1 (1976).
42. Hubbard, A.L., ve Cohn, Z.A., *J. Cell Biol.*, 55, 390 (1972).
43. Riflein, D.B., Compans, R.W., ve Reich, E., *J. Biol. Chem.*, 247, 6432 (1972).
44. Blumenfeld, O.O., Gallop, P.M., ve Liao, T.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 242 (1972).
45. Gahmberg, C.G., ve Hakomori, S.I., *J. Biol. Chem.*, 248, 4311 (1973).
46. Itaya, K., Gahmberg, C.G., ve Hakomori, S.I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 1028 (1975).
47. Yurchenko, P.D., Ceccarini, C., ve Atkinson, P.H., *Methods Enzymol.*, 50, 175 (1978).
48. Helenius, A., ve Simmons, K., *Biochem. Biophys. Acta*, 415, 29 (1975).
49. Dejter-Juszynski, M., Harpaz, N., Flowers, H., ve Shanon, N., *Eur. J. Biochem.*, 83, 363 (1978).
50. Rozenblatt, S., Gorecki, M., Shure, H., ve Prives, C.L., *J. Virol.*, 29, 1099 (1979).
51. Wild, T.F., ve Dugre, R., *Gen. Virol.*, 39, 113 (1978).
52. Hall, W.W., Kiessling, W. ve Menles, U.T., *Nature*, 272, 460 (1978).
53. Hall, W.W., Lanb, R.A., ve Choppin, P.W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 76, 2047 (1979).
54. Wechsler, S.L., ve Fields, B.N., *Nature*, 272, 458 (1978).
55. Heinz, F.C., ve Wagner, R.R., "Comprehensive Virology", Plenum Press Newyork and London, C.10, S.339 (1977).
56. Hellström, K.E., ve Helström, I., *Adv. Immunol.*, 18, 209 (1974).

57. Herberman, R.B., *Adv. Cancer Res.*, 19, 207 (1974).
58. Sanbrook, J., *Adv. Cancer Res.*, 16, 141 (1972).
59. Bryant, M.L., Stoner, G.N., ve Metzger, R.P., *Biochem. Biophys. Acta*, 343, 226 (1974).
60. Perdue, J.F., Kletzien, R., ve Wray, V.L., *Biochem. Biophys. Acta*, 266, 505 (1972).
61. Roblin, R.O., Albert, S.O., Gelb, N.A., ve Black, P.H., *Biochemistry*, 14, 347 (1975).
62. Bosmann, H.B., Case, K.R., ve Morgan, H.R., *Exp. Cell. Res.*, 83, 15 (1974).
63. Mahita, A., ve Shimojo, H., *Biochem. Biophys. Acta*, 304, 571 (1973).
64. Inbar, M., ve Shinitzky, P., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 71, 2128 (1974).
65. Hakamori, S.I., *Adv. Cancer Res.*, 18, 265 (1975).
66. Hakamori, S.I., Saito, T. ve Vogt, P.K., *Virology*, 44, 609 (1971).
67. Gahmberg, C.G., ve Hakamori, S.I., *J. Biol. Chem.*, 250, 2447 (1975).
68. Robbins, P.W., *Am. J. Clin. Pathol.*, 63, 671 (1975).
69. Gahmberg, C.G., Kiehn, D., ve Hakamori, S.I., *Nature*, 248, 413 (1974).
70. Yamada, K.M., ve Weston, J.A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 71, 3492 (1974).
71. Keski-Oya, J., Vaheri, A., ve Ruoslahti, E., *Int. J. Cancer*, 17, 261 (1976).
72. Glick, M.C., Rabinowitz, Z., ve Sachs, L., *J. Virol.*, 13, 967 (1974).
73. Bosmann, H.B., ve Hall, T.C., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 71, 1833 (1974).
74. Colland, J.G., ve Temmink, J.H.M., *J. Cell. Sci.*, 19, 21 (1975).
75. Burger, M.M., *Fed. Proc.*, 32, 91 (1973).
76. Rapin, A.M.C., ve Burger, M.M., *Adv. Cancer Res.*, 20, 1 (1974).
77. Trowbridge, I.S., ve Hilborn, D.A., *Nature*, 250, 304 (1974).

78. Phillips, P.G., Furnanski, P., ve Lubin, M., *Exp. Cell Res.*, 86, 301 (1974).
79. Noonan, K.D., ve Burger, M.M., *J. Biol. Chem.*, 248, 4286 (1973).
80. Nicolson, G.L., Locorbiere, M., ve Eckhart, W., *Biochemistry*, 14, 172 (1975).
81. Bretten, R., Wicker, R., ve Bernhard, W., *Int. J. Cancer*, 10, 397 (1972).
82. Huet, Ch., Lonchamp, M., Huet, M., ve Bernadac, A., *Biochem. Biophys. Acta*, 365, 28 (1974).
83. Cuatrecasas, P., *Biochemistry*, 12, 1312 (1973).
84. Poste, G., ve Reeve, P., *Nature*, 247, 469 (1974).
85. Agrawal, B.B.L., ve Goldstein, I.J., *Biochem. Biophys. Acta*, 133, 376 (1967).
86. "Chemical Notes", Packard Instrument, Co., Inc. (1970).
87. Bray, G.A., *Anal. Biochem.*, 1, 279 (1960).
88. Bachi, T., ve Schnebli, H.P., *Exp. Cell Res.*, 81, 175 (1975).
89. Paul, J., "Cell and Tissue Culture", Edinburgh, Churchill Livingstone, 5. Baskı, S.95 (1975).
90. Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660 (1949).
91. De Petris, S., ve Raff, M.C., *Eur. J. Immunol.*, 4, 130 (1974).
92. Inbar, M., ve Sachs, L., *Nature*, 233, 710 (1969).
93. Cline, M.J., ve Livingstone, D.C., *Nature (New Biol.)*, 232, 155 (1971).
94. Ozanne, B., ve Sambrook, J., *Nature (New Biol.)*, 232, 156 (1971).
95. Gunther, G.R., Wang, J.L., Yahara, I., Cunningham, B.A., ve Ederman, G.M., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 70, 1012 (1973).
96. Gordon, J.A., ve Young, R.K., *J. Biol. Chem.*, 254, 1932 (1979).
97. Chang, K.J., Jacobs, S., ve Cuatrecasas, P., *Biochem. Biophys. Acta*, 406, 293 (1975).
98. Cuatrecasas, P., ve Hollenberg, M.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 31 (1974).

99. Bittiger, H., ve Schnebli, H.P., "Concanavalin A as a Tool", London, John-Wiley and Sons. 1976.
100. Feller, M., Richardson, C., Behnke, D.W., ve Gruenstein, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 1027 (1977).
101. Kramer, R.H., ve Canellakis, E.S., Biochem. Biophys. Acta, 551, 328 (1979).
102. Monsigny, M., Sene, C., ve Obrenovitch, A., Eur. J. Biochem., 96, 295 (1979).
103. Boone, C.W., Science, 188, 68 (1975).
104. Weiss, L., "The Cell Periphery, Metastasis and Other Contact Phenomena" (Neuberger, A. ve Tatum, E.L., editörler), C.7 (1967).
105. Berman, L.D., Int. J. Cancer, 15, 973 (1965).
106. Glimelius, B., Nilsson, K., ve Pontén, J., Int. J. Cancer, 15, 888 (1975).

