

*Panel 4 sunularından*

### **İMMÜNOLOJİDE YENİ GELİŞMELER**

Yöneten: **Emin KANSU**

- Hücre yüzey antijenleri (CD sistemi)'nin immünolojiye katkıları

**Emel E. DEMİRALP**

- Genomiks ve immünoloji

**Dicle GÜÇ**

- Görevini tamamlayan immün yanıt nasıl durur ?  
(Viral immünite örneği)

**Selim BADUR**

## HÜCRE YÜZEY ANTİJENLERİ (CD SİSTEMİ)'NİN İMMÜNOLOJİYE KATKILARI

Emel E. DEMİRALP

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji-İmmünoloji Bilim Dalı, Altunizade, İSTANBUL  
demiralp@marmara.edu.tr

### ÖZET

*Başkalaşım Kümeleri (Cluster of Differentiation, CD) Sistemi, monoklonal antikorlarla tanımlanan lökosit antijenlerinin isimlendirilmesinde kullanılan sistematik bir yaklaşımdır. CD adlandırması hem insan lökosit antijenleri hem de fare ve sıçanlardaki homologları için kullanılır. Monoklonal antikorlar, çalışma gruplarına sunulur ve farklı lökosit popülasyonlarındaki işaretleme özelliklerine göre gruplanır. Belli aralıklarla toplanan Uluslararası Çalışma Grubu, bu sınıflama içindeki antijenlere farklı CD numaraları verir. Başlangıçta sadece lökosit antijenlerini sınıflamak için kullanılan bu sistem bugün endotel hücreleri, sitokin reseptörleri ve bazı intraselüler moleküller için de kullanılmaktadır. 2008'e kadar sekiz defa toplanmış olan Uluslararası Çalışma Grubu bugüne kadar 350 farklı anijeni isimlendirmiştir.*

**Anahtar sözcükler:** CD sistemi, insan lökosit antijenleri, monoklonal antikorlar

### SUMMARY

#### Contribution of Cluster of Differentiation (CD) System to Immunology

*Cluster of Differentiation (CD) is a systematic approach for naming of leucocyte antigens identified by monoclonal antibodies. CD nomenclature is used for both human leucocyte antigens and also their homologs in rat and mouse. Monoclonal antibodies made by different groups are proposed to the International Workshop, classified according to their specifications and named in agreement with the results from various laboratories. Recently, the CD numbering is extended to endotelial antigens as well as cytokine receptor, some of intracellular antigens and even other antigens from other cells and therefore, the name of the International Council for Human Leucocyte Differentiation Antigen (HLDA) was changed as Human Cell Differentiation Molecules (HCDM) in 2004. About 350 different cell antigens have been included in CD system in the workshops organized by HCDM (HLDA) Council, so far.*

**Keywords:** cluster of differentiation, human leucocyte antigens, monoclonal antibody

İmmün sistem hücreleri izole davranışlara sahip değildir. İşlevlerini yerine getirebilmek için birbirleriyle, endotelial ve stromal hücreleri de içeren birçok hücreyle, hücre matriksiyle ve çok sayıda suda-erir molekülle etkileşmek durumundadır. Hücre yüzey molekülleri, immün sistem hücrelerinin çevresiyle haberleşmesinde merkezi öneme sahiptir. Bu moleküllerin ilgili karışıtına bağlanmasıyla gerçekleşen değişim, hücre içi aracı moleküller ile çekirdeğe iletilir ve o hücrenin başkalaşım, aktivasyon, çoğalma ya da ölüm gibi davranışlarını belirler.

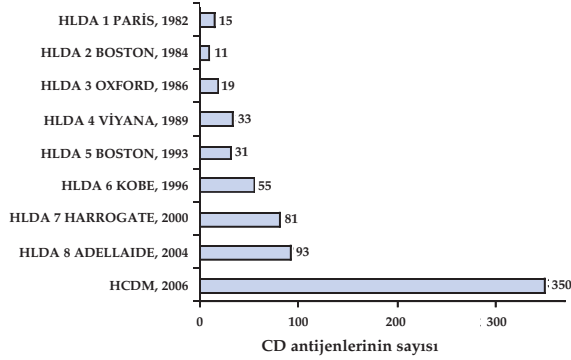
#### Tarihçe

Lökosit yüzey molekülleri çalışmaları In-

san Lökosit Başkalaşım Antijenleri (Human Leucocyte Differentiation Antigens, HLDA) Çalışma Grupları olarak bilinen bir seri toplantıyla organize edilir<sup>(1,2)</sup>.

İlk HLDA Çalışma Grubu 1982'de Pariste toplanmış o zamana kadar tanımlanmış antikorları karşılaştırarak değerlendirmiştir. Birinci ve ardı sıra gerçekleşen çalışma grubu toplantılarındaki ortak yaklaşım, üretilmiş antikorların çok sayıda laboratuvar tarafından kör olarak çalışılması ile değerlendirme yapılmasıdır. Bu yaklaşım, antikor özgüllüğü ve kullanılabilirliğinin bağımsız olarak onaylanması ve geçerli olmasını sağladığı için, geliştirilen antikorların araştırma, tanı ve tedavide güvenle kullanılma-

ları kuvvetle desteklenmiş olur. Günümüze kadar numaralandırılmış CD belirteçlerinin sayıları şekil’de özetlenmektedir.



**Şekil:** İnsan lökosit başkalaşım antijenleri grubunun (HLDA) çeşitli yıllarda gerçekleştirdikleri toplantılarda karakterizasyonları tamamlanarak numaralandırılmış başkalaşım kümelerinin (CD) sayıları.

### İnsan lökosit başkalaşım antijenleri (HLDA) komitesinin çalışma yöntemi

CD adlandırması dünyanın her yerinde kabul gören bir gruplama yöntemidir. İmmünoloji ve immünoloji dışı alanlarda yüzey molekülleriyle ilişkili konularda yayınlanan tüm dergiler CD adlandırmasını kullanır. Amerika’da bir antikorun tedavi amacıyla kullanılma izninin alınabilmesi için o antikorun mutlaka HLDA çalışma grubu tarafından onaylı olması şartı aranmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği, CD adlandırılmasının kullanılmasını bir zorunluluk olarak kabul etmiştir<sup>(3,4)</sup>.

CD adlandırması sistemi, ilk çalışma grubu toplantılarında sadece hücre yüzey antijenlerinin adlandırılması için kullanılmaktayken 2004 yılından itibaren immün sistem hücrelerinin başkalaşımında görev yapması şartı ile intraselüler antijenlerin bir kısmının da adlandırılmasında kullanılmaya başlanmıştır. Ana odaktan fazla uzaklaşmamak için başkalaşım işlevi olmayan, sinyal ileti moleküllerini de kapsayan çok sayıda intraselüler protein CD adlandırılması sistemi dışında tutulmaktadır.

Başkalaşım Kümeleri (Clusters of Differentiation, CD) adlandırması benzer reaksiyon paternine sahip antikorların gruplandırılarak tek bir numara ile belirtilmesi, istatistiksel yön-

tem olarak da ‘Cluster’ analizi yapılması esasına dayanır. Karakterizasyonları tamamlanmış CD1’den CD350’ye kadar numaralanmış bu antikorlar, bugün araştırma, tanı, hastalık takibi ve tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(5)</sup>.

Çalışma grubuna sunulan antikorlar, organizasyon laboratuvarlarında kodlandıktan sonra test laboratuvarlarına gönderilir. Bu laboratuvarlarda antikorlar çeşitli hücre tiplerinde kör olarak test edilir. Test laboratuvarları sonuçları, analiz için organizasyon laboratuvarlarına geri gönderir. Bu yaklaşımla, çeşitli deneysel koşullarda çalışabilen antikorlar seçilmiş olur. Çalışma gruplarının bir diğer önemli özelliği, antikorları, farklı çalışma özellikleri olan laboratuvarlara göndermesidir. Böylece, antikorun işlevsel özellikleri, epitop haritalaması, doku dağılımı, hastalık ilişkileri kolayca ve hızlıca tartışılabilir.

Başlangıçta antikorların doğrulama testleri, ‘western blotting’, immüno-presipitasyon gibi protein analizi yöntemleriyle yapılırken çalışma grubunun 3. toplantısından itibaren doğrulama testlerine cDNA kütüphanelerinde tanımlanmış antijenlerle kontrol etme yöntemi de ilave edilmiştir.

### Hücre yüzey moleküllerinin tanımlanmasında neredeyiz ?

İmmün işlevler üzerine bilginiz 15-20 yıl öncesiyle karşılaştırılmayacak kadar zenginleşmesine rağmen genomik ve proteomik verileri lökosit membran proteinlerinin hâlâ % 10-20’sini bilebildiğimizi göstermektedir. Geleneksel monoklonal antikor üretme teknikleri ile T hücrelerinin 100’den fazla yüzey antijeni olduğunu biliyoruz. Ancak, moleküler çalışmalar T hücresi aktive olduğunda 4000’in üzerinde yeni proteinin sentezlendiğini göstermiştir. Bu sayının % 20-30’unun hücre yüzey molekülleri olacağı tahmininden yola çıkarak daha yolun ne kadar başında olduğumuz anlaşılabilir. Neden yüzey antijenlerinin ancak % 10 ila 20’sini bilebiliyoruz sorusunun kuramsal yanıtı, hücre yüzey antijenlerini tanımlamakta kullanılan yöntemlerle ilişkili olabilir. İnsan lökosit antijenlerine karşı antikorların hemen tamamı fare immünizasyonu ile elde edilir. Eğer bir protein, fare

Tablo 1: Lökosit yüzey moleküllerinde bulunan belli başlı protein bükümleri (Domain).

	Yapı	İşlev	Örnek CD molekülü
<b>ABC transporter</b>	Nükleotid bağlama bükümüne bağlanmış çok sayıda transmembran bükümü	ATP'ye bağlı maddelerin membrandan geçişi	CD243, CD238
<b>Katherin</b>	İki tabakada yedi zincirin oluşturduğu bir beta sandviç yapı. Komşu bükümlere Ca <sup>++</sup> bağlanır	Adezyon	CD144, CD324, CD325
<b>C tipi lektin</b>	5 beta zinciri, 2 alfa heliks içeren dört ilmikli göreceli açık yapı	Kalsiyuma bağlı şeker bağlanması	CD62L, CD72, CD141, CD205, CD303
<b>CUB</b>	4 konserva sistein ile immünglobulin benzeri beta "barrel" yapı	Kompleman komponentleri	CD304
<b>DEATH</b>	6 alfa heliksten oluşan homotipik protein modülü	Kaspaz ve NF-kappaB üzerinden inflamasyon ve apoptoz düzenlenimi	CD95, CD261, CD271
<b>EGF</b>	Bir kısa ilmiğin takibettiği iki zincirli beta tabakası, 6 sistein içerir ve disülfid bağı oluşturur	Bilinmiyor	CD62L, CD97, CD141, CD339
<b>Fibronektin 2</b>	Disülfid bağları yapan sisteinler içerir. Fibronektinin kollajen bağlama bölgesidir	Protein bağlama	CD205, CD206, CD222
<b>Fibronektin 3</b>	6 beta zinciri antiparalel beta sandviç yapısını oluşturur. Ig C bölgesine benzer	Protein bağlama	CD122, CD130, CD171
<b>GPCR</b>	7 transmembran heliks, G protein bağlama ilmiği	Reseptörler	CD97, CD195, CD294
<b>Ig benzeri</b>	İki tabakada 7 zincirden oluşan bir beta sandviç katlanma. Genellikle disülfid bağlarıyla stabilize olur	Protein-protein ve protein-ligand etkileşimleri	CD3, CD19, CD50, CD80, CD171, CD226, CD300a
<b>LDLR</b>	Kompleman benzeri siteinden zengin	Çok sayıda ligand tekrarlar	CD91
<b>LINK</b>	İki alfa heliks, iki anti paralel beta zincirden oluşur	Hyaluronon bağlama bölgesi	CD44
<b>LRR</b>	Löseniden zengin 20-30 aminoasidin 2-45 motifinden oluşan, atnalı katlanma gösteren yapı	Protein-protein etkileşimleri	CD180, CD281
<b>Tirozin kinaz</b>	Sitoplazmik protein kinaz	Tirozin rezidüsüne fosfat ekler	CD117, CD136, CD167A, CD331
<b>SCR</b>	6 konserva sistein içeren 115 aa'e kadar uzayabilen, iyi korunmuş 4 büküm içeren yapı	Protein bağlanması	CD5, CD6, CD163
<b>SEMAFORİN</b>	Beta pervane topolojisinin varyantı	Kimyasal sinyalleri saptar ve yanıt verir.	CD100, CD108, CD136
<b>SUCHI</b>	Beta sandviç temelinde oluşmuş bir yapı	Protein bağlanması	CD21, CD25, CD35, CD62L
<b>TNF</b>	Merkezi beta tabakası	Timerik sitokin	CD153, CD154, CD178
<b>TNFR</b>	Zincir içi birbirine bağlı 6 sistein tekrarı	TNF ligand bükümlerini bağlar	CD30, CD40, CD95
<b>Fosfotirozin fosfataz</b>	Sitoplazmik tirozin spesifik fosfatazlar	Tirozin residülerindeki fosfatları uzaklaştırır	CD45, CD108

ve insanda identik ise geleneksel hibridoma yaklaşımı üretken olamayacaktır. Ancak yeni yöntemsel yaklaşımlar, yeni yüzey proteinlerinin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Bu bağlamda, evrimsel olarak farklı türlerde yüksek homolojiye sahip ya da identik moleküller, immünglobulin bağlama özelliklerine sahip geniş kütüphanelerde taranmalıdır.

### Hücre yüzey moleküllerinin yapı ve işlevleri

Lökosit membranlarında başkalaşımı gösteren pek çok molekül glikoprotein yapıdadır. Bu yapıda sayısız varyasyon vardır ama molekülde tanınabilir, sabit tema ve motifler de bulunur<sup>(6)</sup>. Proteinlerin yapısal özellikleri açıklama kutularında (I-III) özetlenmiştir. İşlev yapıya bağlıdır. Böylece yapısal özellikler işlevlerin tahmininde büyük önem taşır. Moleküler yapının üç boyutlu tanımlanması, nükleer manyetik rezonans ya da x-ışını kristalografisi gibi kompleks, zaman ve kaynak gerektiren yöntemlerle yapılabilir. Ama belirtilen nedenlerle, bu düzey-

de yapısal analiz az sayıda insan lökosit anijeni için gerçekleştirilebilmiştir. Ama proteinlerin üç boyutlu yapılarının tahmini, amino asit zincirlerinin diziliminin bilgisayarla analizi ile de mümkündür. Dizilerin analizi ile oluşan pek çok protein motifi tekrarlar gösterir ve bu tekrarlar proteinlerin yapı ve işlevlerinin gruplandırılmasında kullanılır. Her bir protein altünitesi belli bir işlevle ilişkilidir. Örneğin bazı protein bükümleri protein-protein bağlanmasıyla ilişkiliyken bazı bükümler kinaz aktivitesiyle ilişkilidir. İnsanda en az 20 farklı protein bükümü olduğu gösterilmiştir (Tablo 1).

### Hücre yüzey moleküllerinin tanı, tedavi ve araştırmada kullanımı

İnsan genomundaki dizinlerin tümüne ulaşabilmek şüphesiz insanlık adına çok büyük bir ilerlemedir. Ama bu derya gibi geniş bilginin kullanılabilmesi ve insanlığın faydalanabilmesi için daha bilmemiz gereken çok konu olduğu da tartışma götürmez bir gerçektir. İnsan

## I. PROTEİNLERİN YAPISAL ÖZELLİKLERİNİ TANIMLARKEN KULLANILAN TERİMLER

**Büküm (Domain):** Bir protein bükümü bir proteinin ayrı bir bölgesidir. Proteinler, menteşe bölgesi diye adlandırılan kısa ya da uzun zincirlerle birbirinden ayrılan birçok bükümden oluşur. Bükümlerin yapısal karakteristik özellikleri vardır ve bugüne kadar yaklaşık 20 farklı protein bükümü tanımlanmıştır.

**Modül:** Büküm terimi yerine kullanılabilir. Genellikle birçok farklı bükümü olan bir proteinin (modüler protein) bir bükümünü tanımlamak için kullanılır.

**Motif:** Bir büküm ya da motiften daha kısa zincirleri tanımlamak için kullanılır. Ancak bu zin-

cir belli bir yapısal ya da işlevsel özelliğe sahip olmalıdır.

**Aile:** Proteinler yapısal benzerliklerine göre aileler içinde gruplandırılır. Çok sayıda farklı bükümleri olan proteinler çok sayıda farklı aile içinde gruplandırılabilir. 'Aile' terimi hem gen hem de protein düzeyindeki benzerlikleri tanımlamak için kullanılır.

**Süper aile:** Süper aile terimi, belli anlamlarda benzerlikler gösteren birçok ailenin bir arada, daha geniş gruplandırılmasında kullanılan terimdir.

## II. KARBONHİDRAT YAPILAR

Karbonhidratlar lipid ve proteinlere bağlanabilir. Lökosit antijenlerinde sıklıkla bulunan karbonhidratlar; glukoz, galaktoz, mannoz, N-asetil galaktosamin (GalNac) ve sialik asid (N-asetil nöraminik asid)'dir.

Glikozaminoglikanlar (GAG) amino şekeri içeren disakkarit ya da daha uzun oligosakkaridlerdir. Amino şekeri genellikle glukozamin ya da galaktosamindir. Lökosit membranında bulunan başlıca GAG'lar kodroitin sülfat, heparin ve heparan sulfattır.

### III. PROTEİNLERİN MEMBRANA TUTUNMA BİÇİMLERİ

İntegral membran proteinleri lipid çift tabakayı geçer. En basit biçimde, bir integral protein bir ekstraselüler, bir membran uzanma ve bir sitoplazmik bölge içerir. Membranı geçme bölgesi genellikle çok sayıda hidrofobik amino asid içeren bir alfa heliks yapısıdır. Bazı proteinler, bu bölgede yüklü amino asidler taşıyabilir.

**Tip I İntegral membran proteinlerinin** amino terminali (N) hücre dışında, karboksi terminali (C) hücre içindedir.

**Tip II İntegral membran proteinlerinin** C terminali hücre dışında, genellikle kısa olan N terminali hücre içindedir. Membran içinde uzanan bölgesi protein salgılanması için bir dizi içerir.

**Tip III İntegral membran proteinleri** membra-

nı birçok kez geçer (2-7 kez).

**Tip IV İntegral membran proteinleri** Tip II gibi membranı birçok kez geçer. Ama Tip IV'de membranı geçen proteinler membranda bir hidrofobik delik açar.

**Tip V İntegral membran proteinleri**, membranı geçmezler ama C terminal bölgeleriyle glikozil fosfatidilinozitolere ilişirler (GPI bağlantısı).

Ek olarak, proteinler membrana diğer proteinler üzerinden tuz köprüleri, disülfid bağları ya da kovalan olmayan bağlarla da bağlanabilir.

Membranı geçmeyen ya da kısa sitoplazmik zinciri olan proteinler, hiçbir zaman sinyal iletili olamazlar. Birden fazla zinciri olan reseptörlerde de zincirlerden biri molekül yakalayıcı, diğeri sinyal iletilidir.

genom projesiyle tüm DNA dizinlerinin tanımlanmasından çok kısa bir zaman sonra araştırma odaklarının tekrar ürüne (proteine) ve işleve yönelmesi bu anlamda hiç de şaşırtıcı değildir. Onca detaylı bilgiye rağmen bugün antikorlar, hâlâ moleküllerin ekspresyon ve işlevlerini tanımlamak için son derece faydalı ve güncel araçlar olarak kullanılmaktadır. mRNA düzeyindeki çalışmalar, kantitatif analizlerde kesin ve tam doğru sonuçlara ulaşmak için değerli yöntemler olsa da mRNA miktarı ile bir hücrede güncel olarak varolan ve işlevi yerine getiren protein miktarı arasında direkt ve üniversal bir ilişki yoktur. Antikorları büyük çapta kullandığımız akım sitometrik yöntemler ve/veya video imaj analiziyle zenginleşen immünhistokimya-

sal çalışmalar tek hücre üzerinde çok sayıda protein ve işlevin doğru ve duyarlılıkla çalışmasını ve hatta uzaysal ilişkilerin tanımlanabilmesini sağlayan, gelişmiş yöntemlerdir. Agonist ya da antagonist antikorların varlığı, moleküllerin işlevlerinin ortaya çıkarılmasında kullanılan dinamik yöntemlerdir<sup>(7)</sup>. Ek olarak antikorlar, immün yanıtın dengesini değiştirmemiz gereken durumlarda terapötik ajanlar olarak kullanılabilir.

CD belirteçleri, hücrelerin lokalizasyon, kantitasyon ve tanımlanmasında, hastalık ve sağlık durumlarındaki işlevlerin analizinde sayısız faydalar sağlar. Tablo 2'de antikorların belli başlı kullanım alanları gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Lökosit belirteçlerine karşı antikorların belli başlı kullanım alanları.

Uygulama	Özellik	Örnek
Tanımlama	Çok parametrelî, multipleks	Akım sitometrik hücre analizi (Lösemi/lenfoma tanı, takip)
Lokalizasyon	Çok parametrelî	İmmünohistoloji
Kantitasyon	Çok parametrelî, multipleks	CBA, ELIZA, CD34
İzolasyon	Çok parametrelî	Hücre ayırma, protein pürifikasyonu
Tedavi	Özgüllüğü, gücü	Transplantasyon ve kanser tedavisinde örn: CD3, CD20

### KAYNAKLAR

1. Barclay AN, Brown MH, Alex Law SK et al: The Leucocyte Antigen Facts Book (2.ed.), Academic Press, New York (1997).
2. Human Cell Differentiation Molecules Organisation: <http://www.hcdm.org>
3. Protein Reviews on the Web (PROW). <http://mpr.nci.nih.gov/>
4. Zola H, Swart B: Human leucocyte differentiation

- antigens, Trends Immunol 2003;24(7):353-4.
5. Zola H, Swart B, Banham A et al: CD molecules 2006-human cell differentiation molecules, J Immunol Methods 2007;319(1-2):1-5.
  6. Zola H, Swart B, Nicholson I, Voss E: Leukocyte Membrane Molecules-An Introduction Leukocyte and Stromal Cell Molecules: The CD Markers, John Wiley and Sons Inc., New York (2007).
  7. Zola H, Swart B, Nicholson I et al: CD molecules 2005: human cell differentiation molecules, Blood 2005;106(9):3123-6.