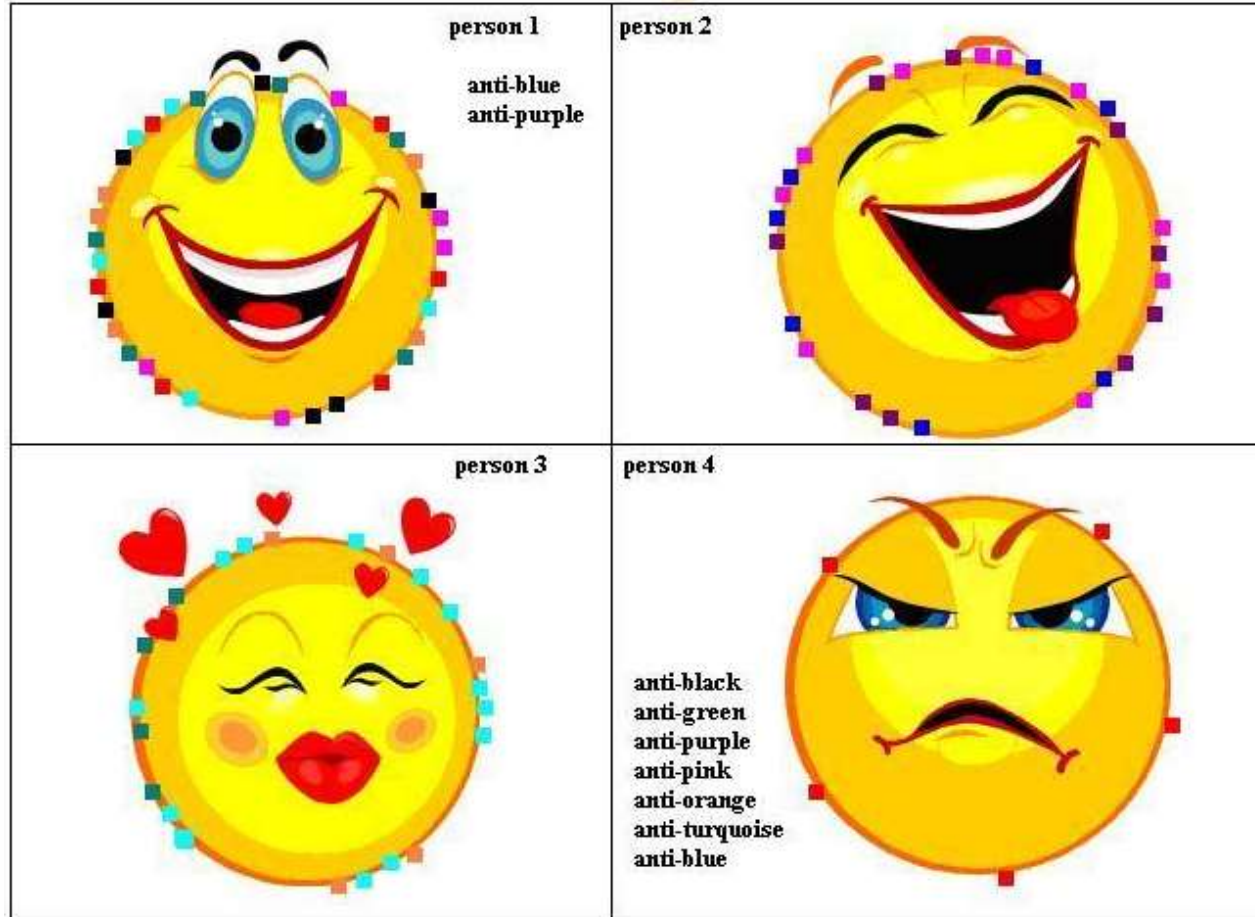
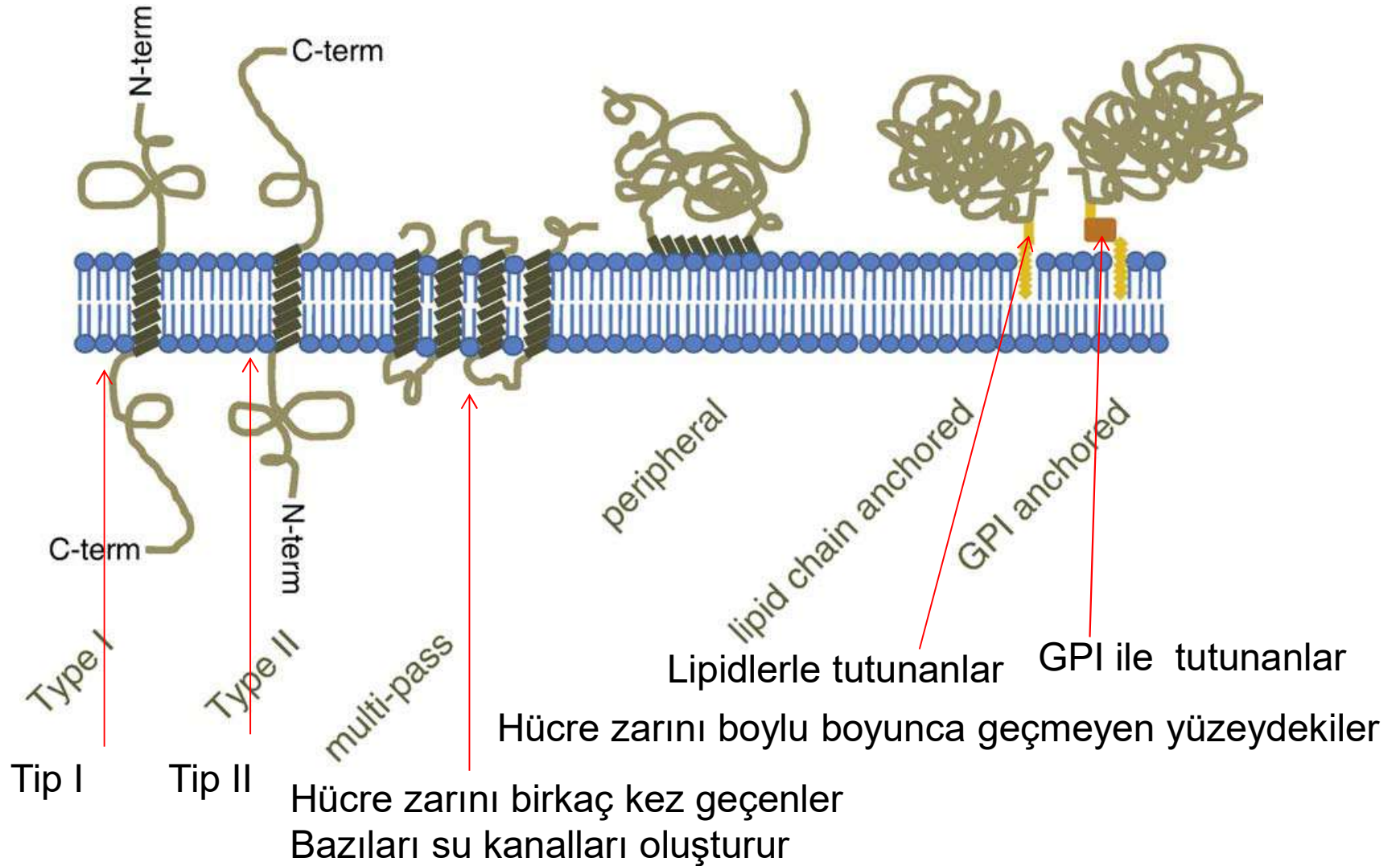


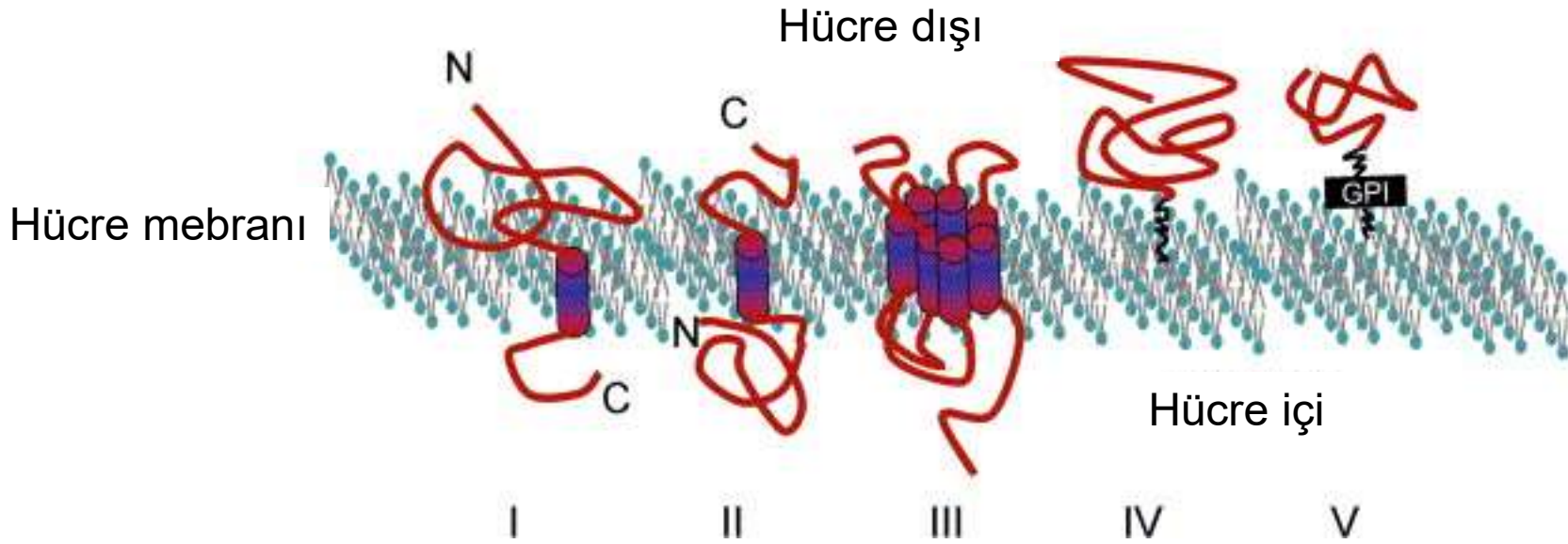
Hücre Yüzey Antijenleri

Her hücrenin yüzeyinde kendine özgü antijenler bulunur



Hücre yüzey proteinleri farklı yapısal özellikler gösterir

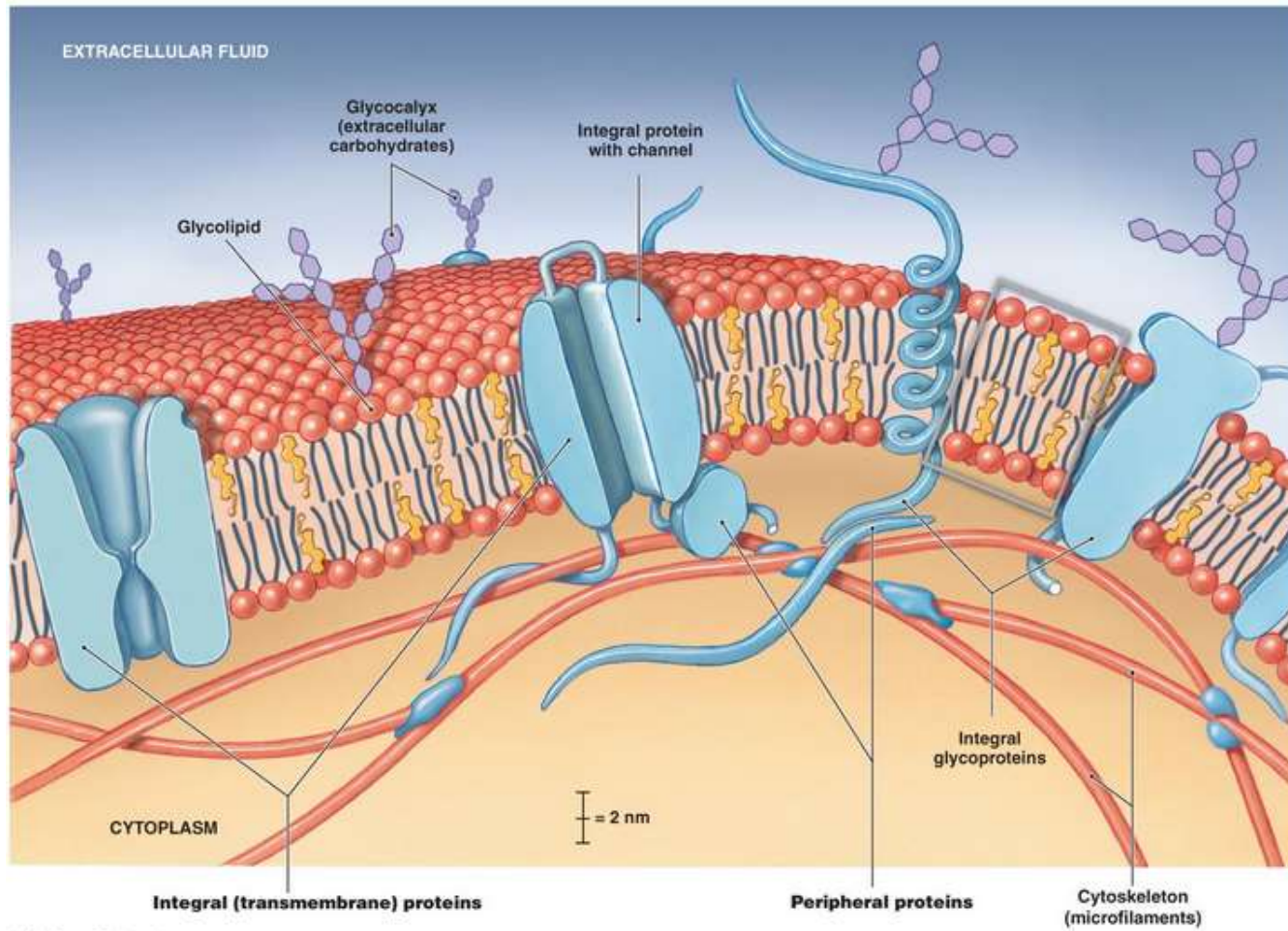




Şekil 1 Beş tip membran proteininin şematik görünümü:

- (I) Tip-I membran protein,
- (II) Tip-II membran protein,
- (III) çok geçişli transmembran protein,
- (IV) lipid bağı ile tutunan membran proteini, ve (V) GPI-aracılığı ile tutunan membran proteini.

Structure of the plasma membrane



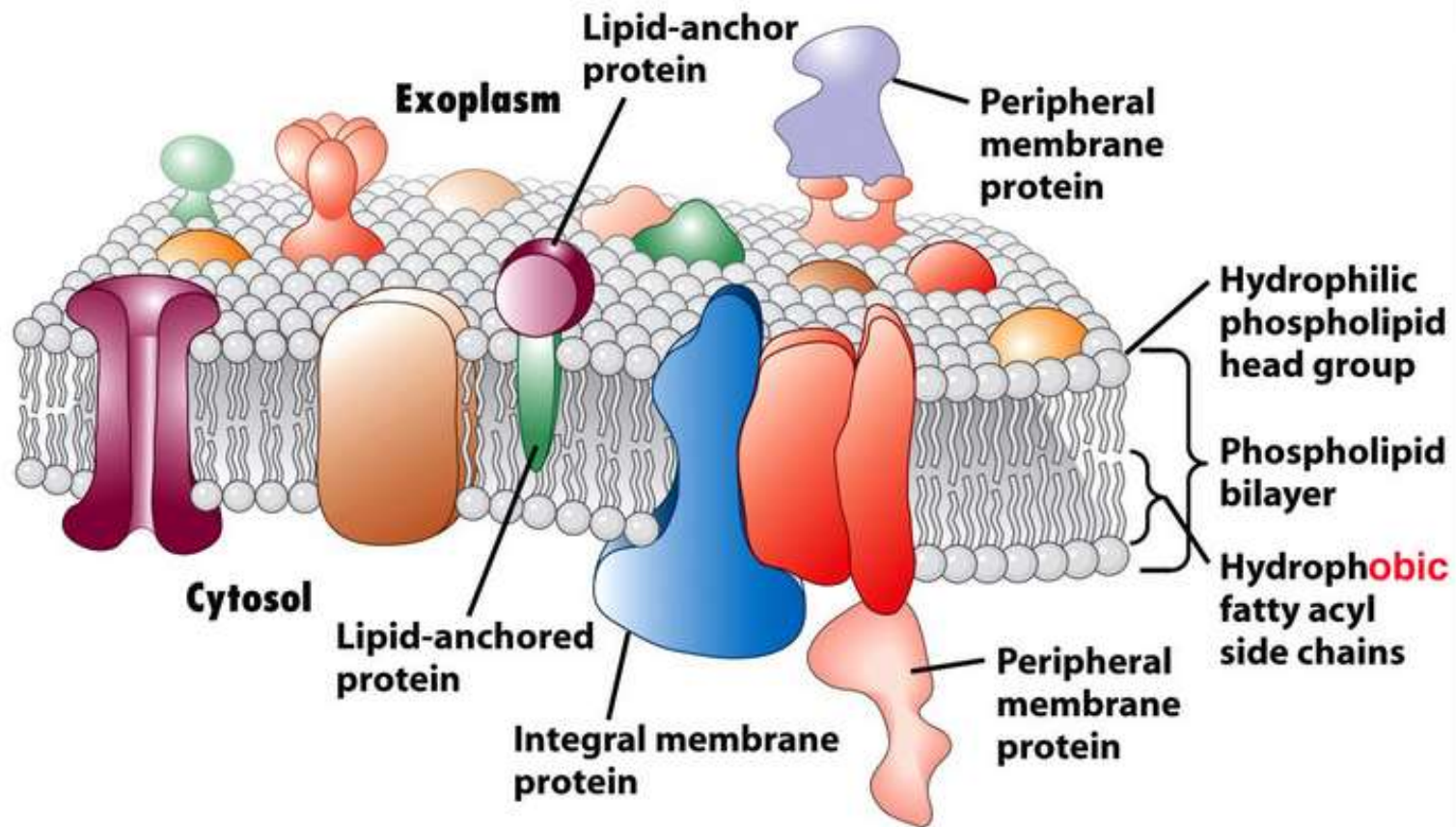
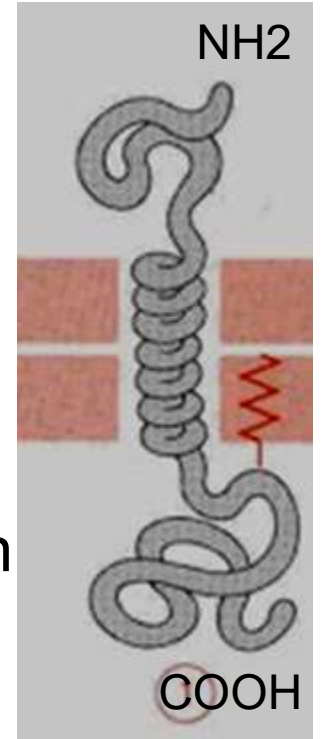


Figure 10-1
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

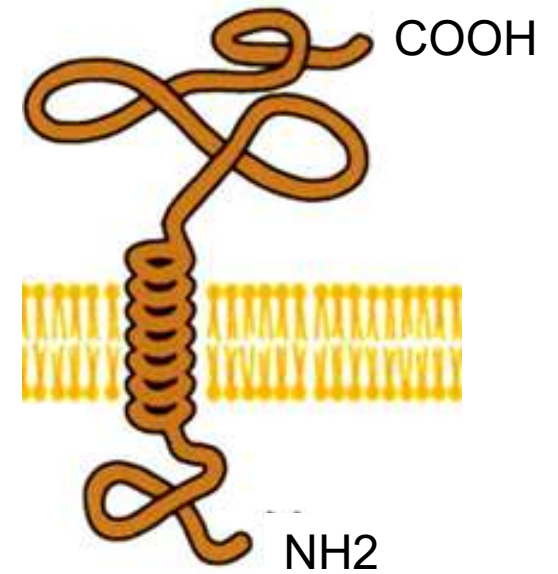
Tip I Transmembran Proteinler

- Sitoplazmada **COOH(karboksil)** kısmı
- Hücre dışında **NH2(amino)** kısmı bulunur.
- Fonksiyonları
 - Hücre yüzey reseptörleri
 - Ligandlar (hücre hücre etkileşiminde, sinyallerin iletiminde önemli)
- Pek çoğu immunglobulin ailesinden
- Örn: T-hücre reseptörü (TCRalfa/beta)



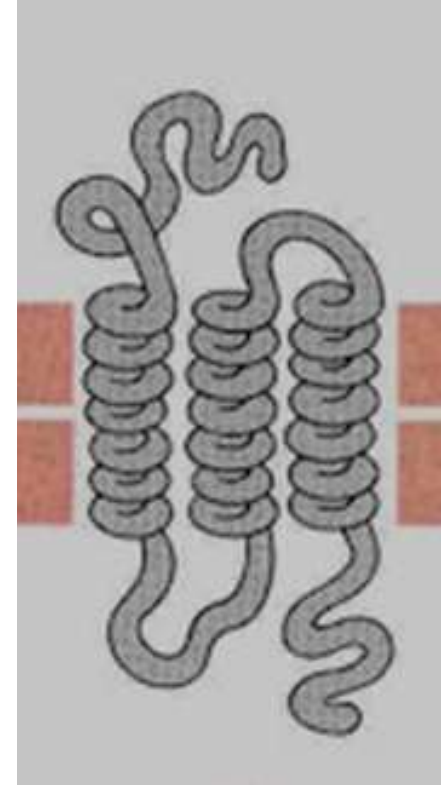
Tip II Transmembran proteinler

- NH₂ (amino) kısmı hücre içinde, COOH(karboksil) ucu hücre dışında
- Hücre içindeki bölümleri kısadır
- Hücre yüzeyinden salınabilirler(serbestleşebilir).



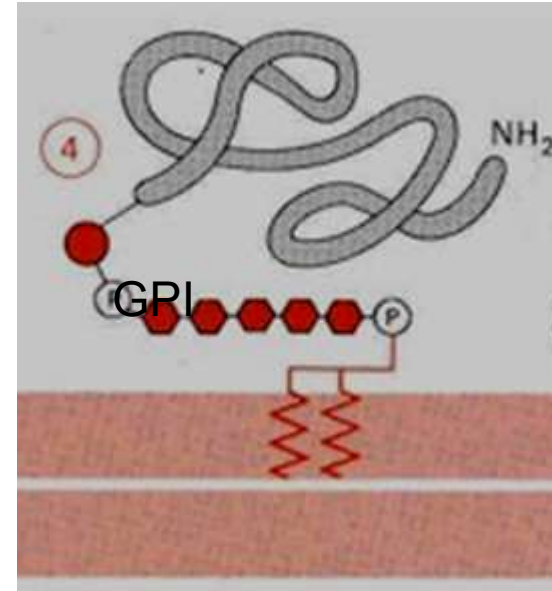
Tip III Transmembran proteinler

- Plazma membranını birden fazla kez geçebilir (çaprazlayabilir).
- Örn:
 - Çoklu ilaç direnci proteinleri
 - B hücrelerdeki CD20 kasiyum kanalı oluşturur.



Tip IV ve Tip V

- Hücre zarını geçmezler
- COOH uçları ile Plazma membranına tutunurlar. (lipidler veya Glikozil-fosfoinozitol(GPI) çapasını kullanırlar)



Hücre yüzey proteinleri












Fonksiyonları

- Hücre hücre ilişkisi
- Sinyal iletimi
- Moleküllerin, iyonların, suyun taşınması
- Hücre yüzey bütünlüğünü sağlamak ve hücreyi dış etkilere korumak

- Hücrelerin kimlikleri olarak da rol alırlar
- Fonksiyonları taşıdıkları üniteler, yapıları ile yakından ilişkilidir

- Her hücre tipinin yüzeyinde kendine özgü proteinler (Hücre yüzey antijenleri) bulunur.
- **Monoklonal antikolar** kullanılarak hücrelerin yüzeyindeki bu antijenler belirlenebilir.
- Bu antijenleri tanımlamak için Cluster of differentiation (**CD**) ifadesini takip eden rakamlar kullanılır

CD Nomenklatur	Hücre tipi	Antijen
CD1a	Kortikal timositler, B hücreler ve Dendritik hücre alt grupları	β 2 mG ve MHC benzeri proteinlere tutunabilir
CD2	T ve NK	Eritrositlerle rozet yapan bu moleküldür
CD3	Olgun T hücreler	T hücre reseptörü (TCR) ile ilişkide
CD4	Helper T hücreler, monositler, immatur miyeloid hücreler	MHC II için reseptör rolü var
CD5	Timositler, olgun T, B hücre alt grupları	T hücre çoğalması ile ilişkili
CD7	T, NK hücreler, bazı genç miyeloid hücreler	40 kD protein
CD8	Sitotoksik T, NK hücre alt grubu	MHC I için reseptördür
CD10	Öncü B hücreler, nötrofiller	nötral endopeptidaz
CD11b	Monosit, Nötrofil, NK hücre	Adezyon molekülü.
CD11c	Monosit, Nötrofil, NK, B hücre alt grupları	Adezyon
CD13	Miyeloid hücreler	Aminopeptidaz N
CD14	Monositler	LPS (Lipopolisakkarit) Reseptör
CD15	Nötrofil	X-hapten. 3-fucosyl asetyl laktosamine

		Key Markers - Human	Key Markers - Mouse
T Cell		CD3 CD4 CD8	CD3 CD4 CD8
B Cell		CD19 CD20	CD45R/B220 CD19 CD22 (B cell activation marker)
Dendritic Cell		CD11c CD123	CD11c CD123
NK Cell		CD56	CD335 (NKp46)
Stem Cell/ Precursor		CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>	CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>
Macrophage/ Monocyte		CD14 CD33	CD11b/ Mac-1 Ly-71 (F4/80)
Granulocyte		CD66b	CD66b Gr-1/Ly6G Ly6C
Platelet		CD41 CD61 CD62	CD41 CD61 (Integrin β 3) CD9 CD62P (activated platelets)
Erythrocyte		CD235a	CD235a Ter-119
Endothelial Cell		CD146	CD146 MECA-32 CD106 CD31 CD62E (activated endothelial cells)
Epithelial Cell		CD236	CD326 (EPCAM1)

Normal B Hücre Gelişimi

	İmmatür Erken	İmmatür orta	İmmatür geç	Antijen görmemiş	Foliküler merkez	Marginal zon	Plazma hücre
CD45	+	+	+	+	+	+	+
TdT	+	+	+	+	+	+	+
CD34	+	+	+	+	+	+	+
CD10	+	+	+	+	+	+	+
CD38	+	+	+	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+	+	+	+
CD22	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DR	+	+	+	+	+	+	+
IgD	+	+	+	+	+	+	+
IgM	+	+	+	+	+	+	+
Kappa	+	+	+	+	+	+	+
Lambda	+	+	+	+	+	+	+

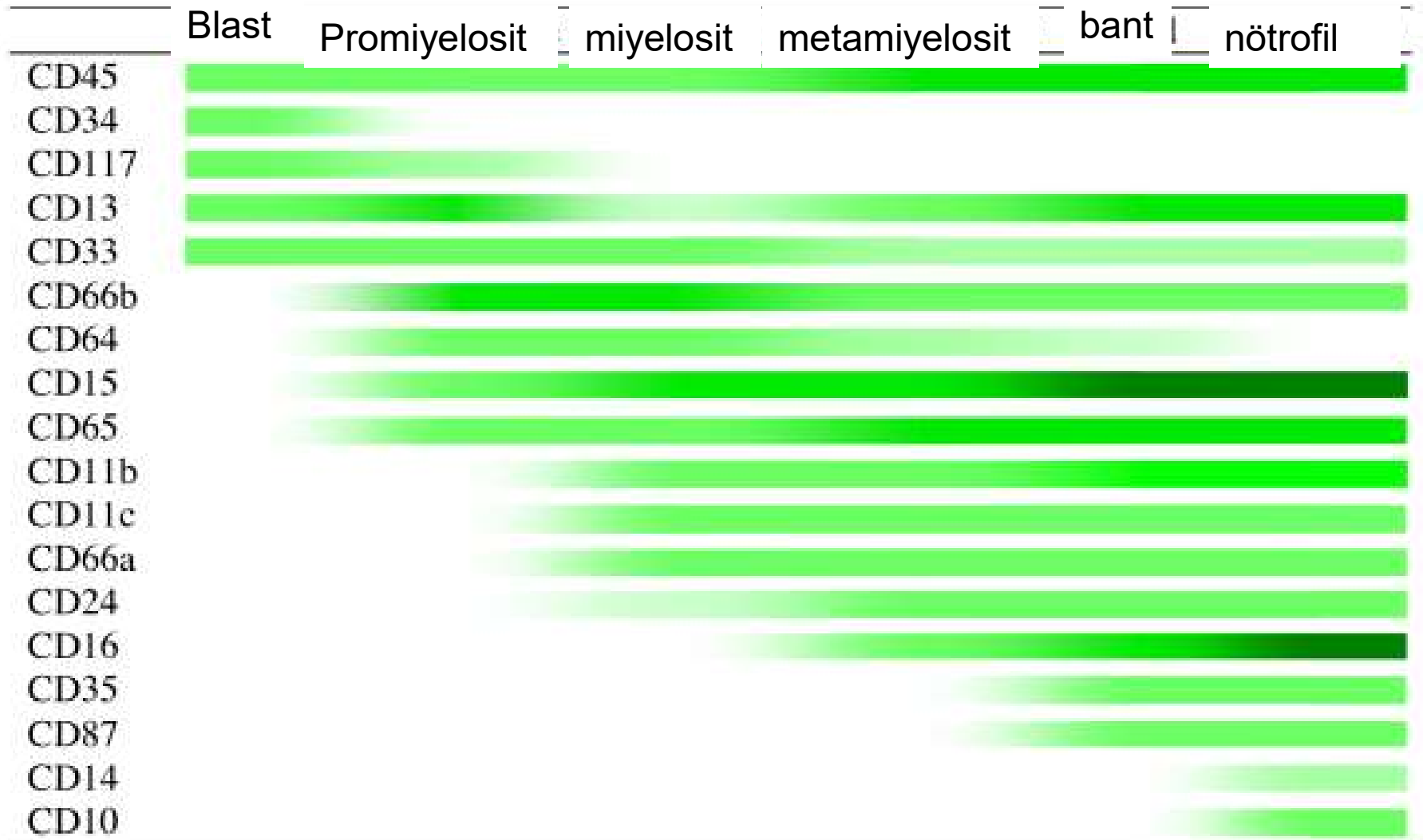
Wood and Borowitz (2006) Henry's Laboratory Medicine

XVI Uygulamalı FCM Eğitimi, Haziran 2010

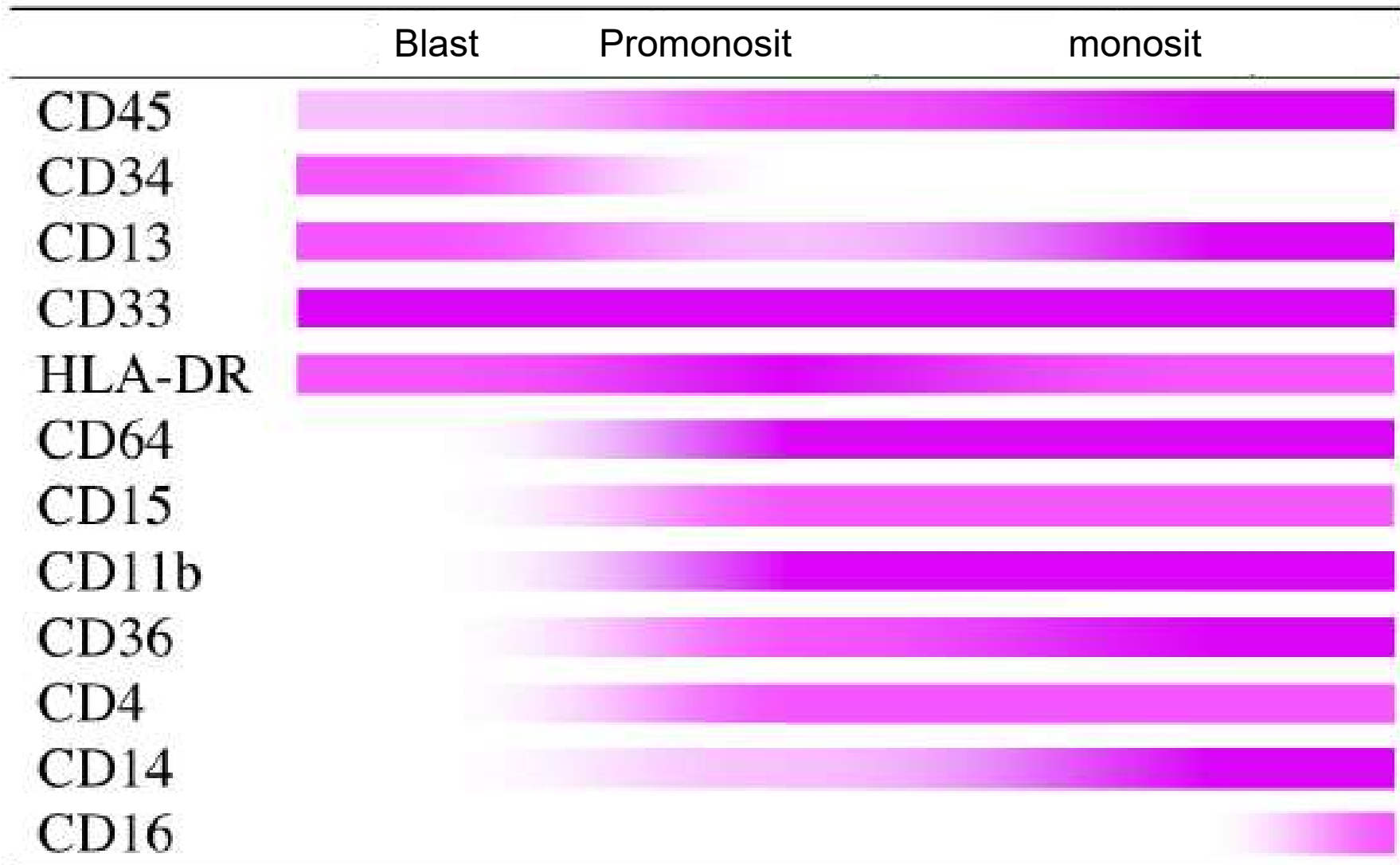
Normal T Hücre Gelişimi

	Protimosit	İmmatür timosit	Timosit	olgun Timosit	Olgun T Hücre
CD45	+	+	+	+	+
CD34	+	+	+	+	+
TdT	+	+	+	+	+
CD7	+	+	+	+	+
CD2	+	+	+	+	+
CD5	+	+	+	+	+
cCD3	+	+	+	+	+
CD4	+	+	+	+	+
CD8	+	+	+	+	+
CD3	+	+	+	+	+
TCR	+	+	+	+	+

Normal Granulosit Gelişimi



Normal Monosit Gelişimi



Wood and Borowitz (2006) Henry's Laboratory Methods

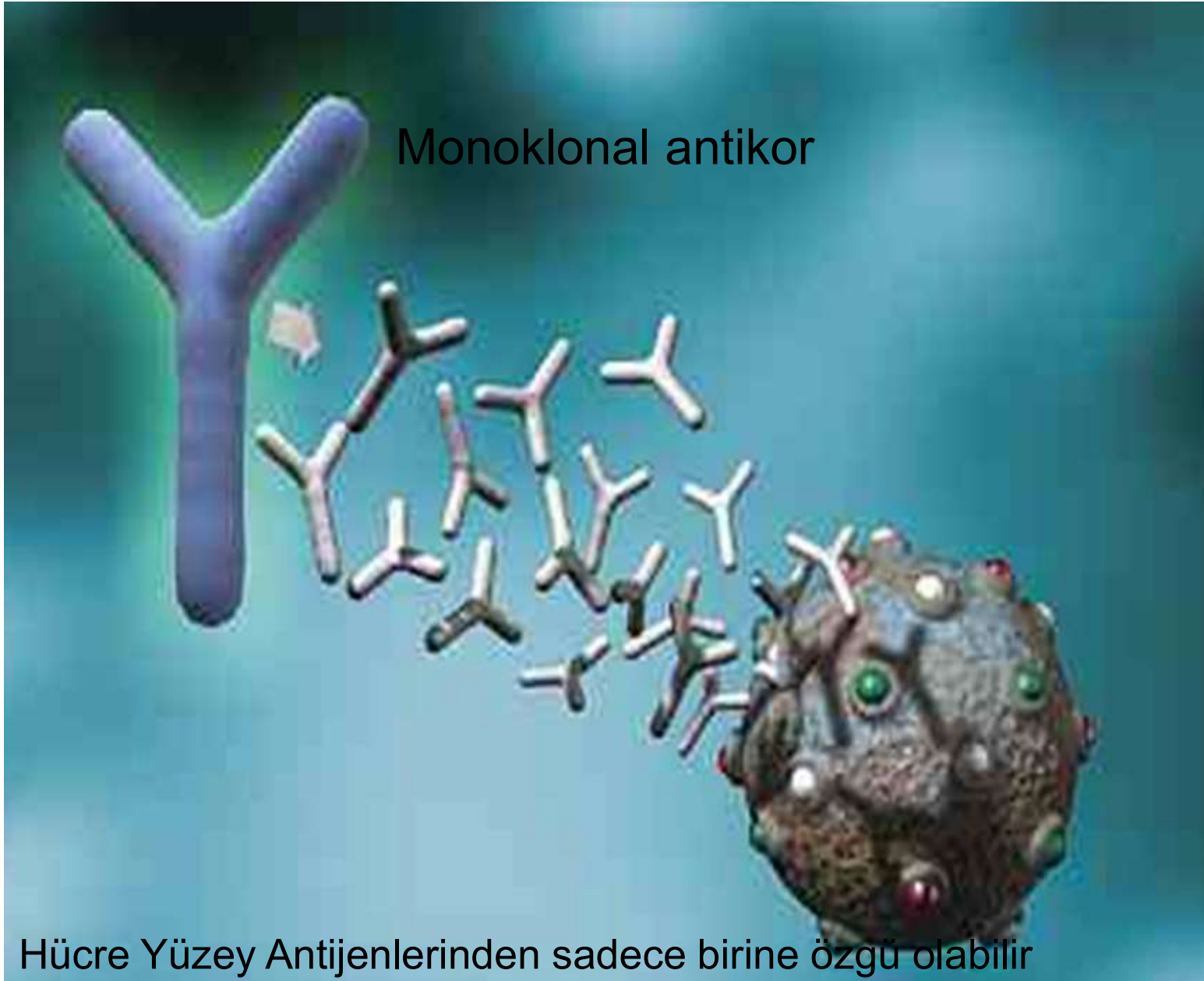
XVI Uygulamalı FCM Eğitimi, Haziran 2010

Normal Eritrosit Gelişimi

	Blast	Proeritroblast	Bazofilik	<u>Poly/Ortho</u>	Retikulosit	Olgun eritrosit
CD45	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD34	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
HLA-DR	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD38	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD117	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD71	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
CD36	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
<u>CD235a</u> Glikoforin A	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████

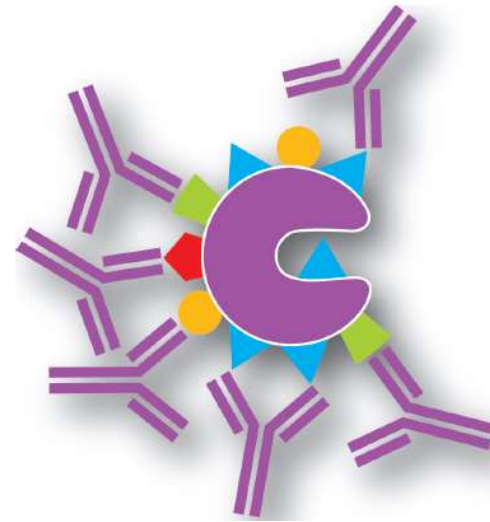
Wood and Borowitz (2006) Henry's Laboratory Medicine

XVI Uygulamalı FCM Eğitimi, Haziran 2010

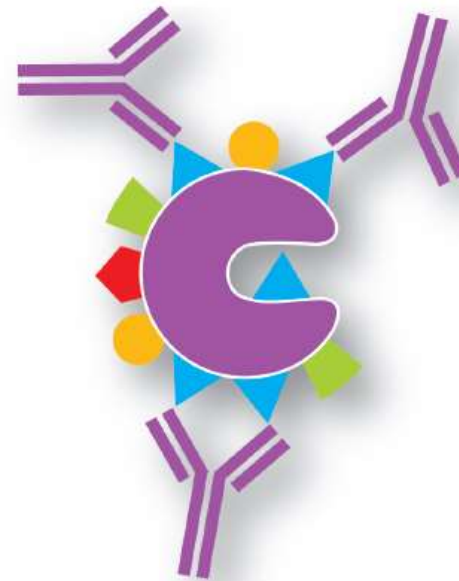


Antikorlar

- Poliklonal

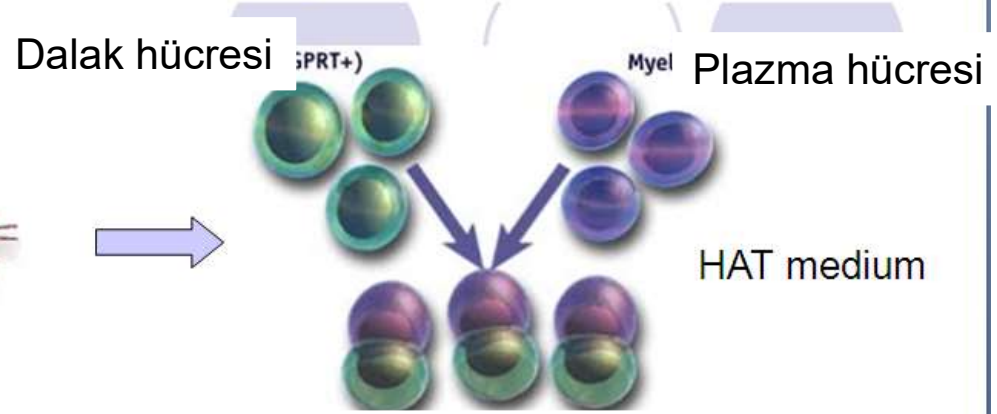
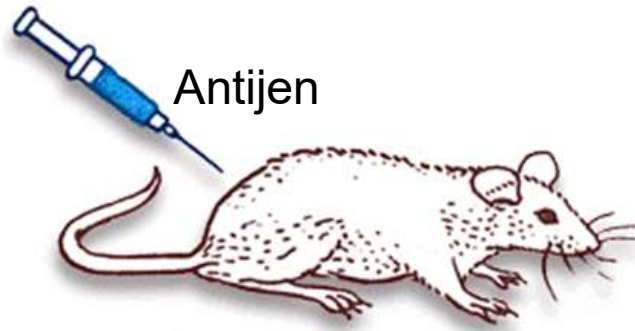


- Monoklonal

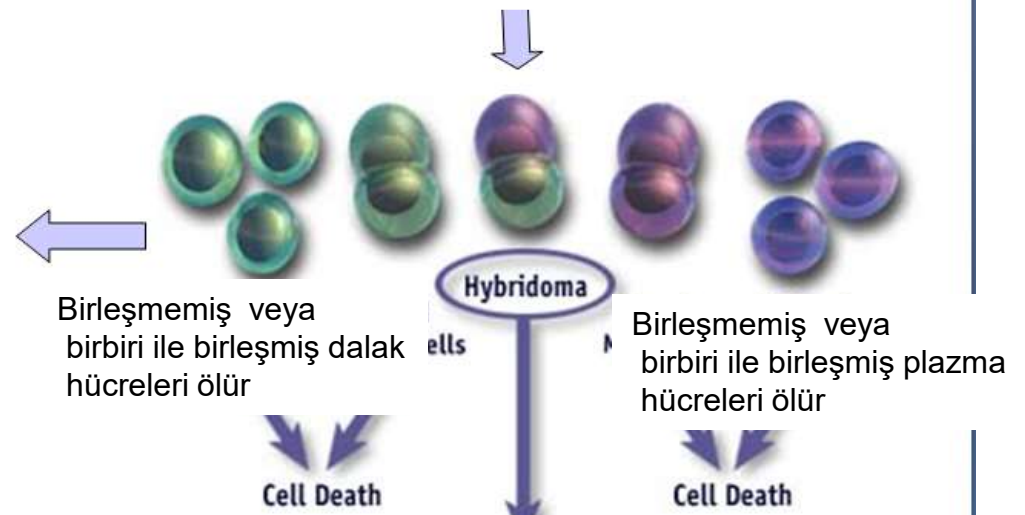


Monoklonal antikorlar, tek bir hücre serisinin ürettiği tek bir antijene özgün olan antikorlardır

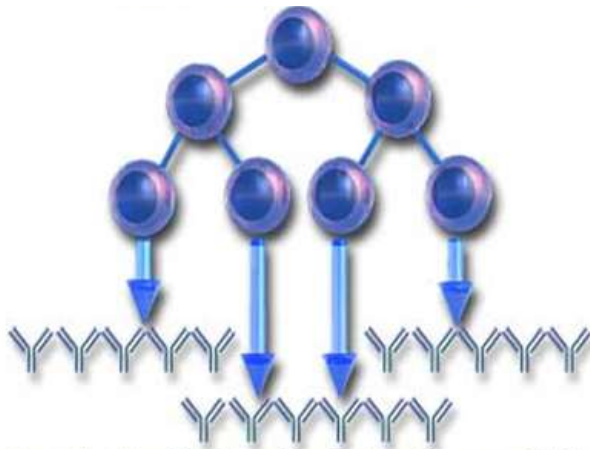
Monoklonal Antikor Üretimi



Hücrelerin füzyonu gerçekleşir



Tek tip hücrenin çoğalması (klonal hücre)



Sadece verilen antijene özgü antikor geliştiren hücreler çoğalır

Çoğalır

HGPRT: hipoksantin fosforibozil transferaz. HAT: Hipoksantin Aminopterin Timidin

Hatırlatma:

Hücre yüzey proteinleri Fonksiyonları

- Hücre hücre ilişkisi
- Sinyal iletimi
- Moleküllerin, iyonların, suyun taşınması
- Hücre yüzey bütünlüğünü sağlamak ve hücreyi dış etkilerden korumak
- **Hücrelerin kimliklerini belirlemede kullanılırlar**
- Fonksiyonları taşıdıkları üniteler, yapıları ile yakından ilişkilidir

Yüzey Antijenleri, Hücreleri tanımak için kullanılır

- Tüm lökositler **CD45** pozitiftir.
 - CD3 T lenfositlerde bulunur
 - CD4 T helper, CD8 Tsitotoksik olanlarda
 - CD19, CD20 B lenfositlerde
 - CD33, CD14, Monositlerde (CD16 zayıf+)
 - CD33, CD16 Granulositlerde
 - CD41, CD42, CD61, CD62 trombositlerde (CD45 yok)
 - CD71, CD36 eritrositlerde (CD45 yok)
- Bu moleküler çeşitli yöntemler ile belirlenebilirler.
 - Akım sitometri
 - İmmunhistokimyasal boyalar
- Bu moleküllerin bir kaçınının pozitif ve negatifliğine göre hücre tiplerini ayırt edebiliriz.

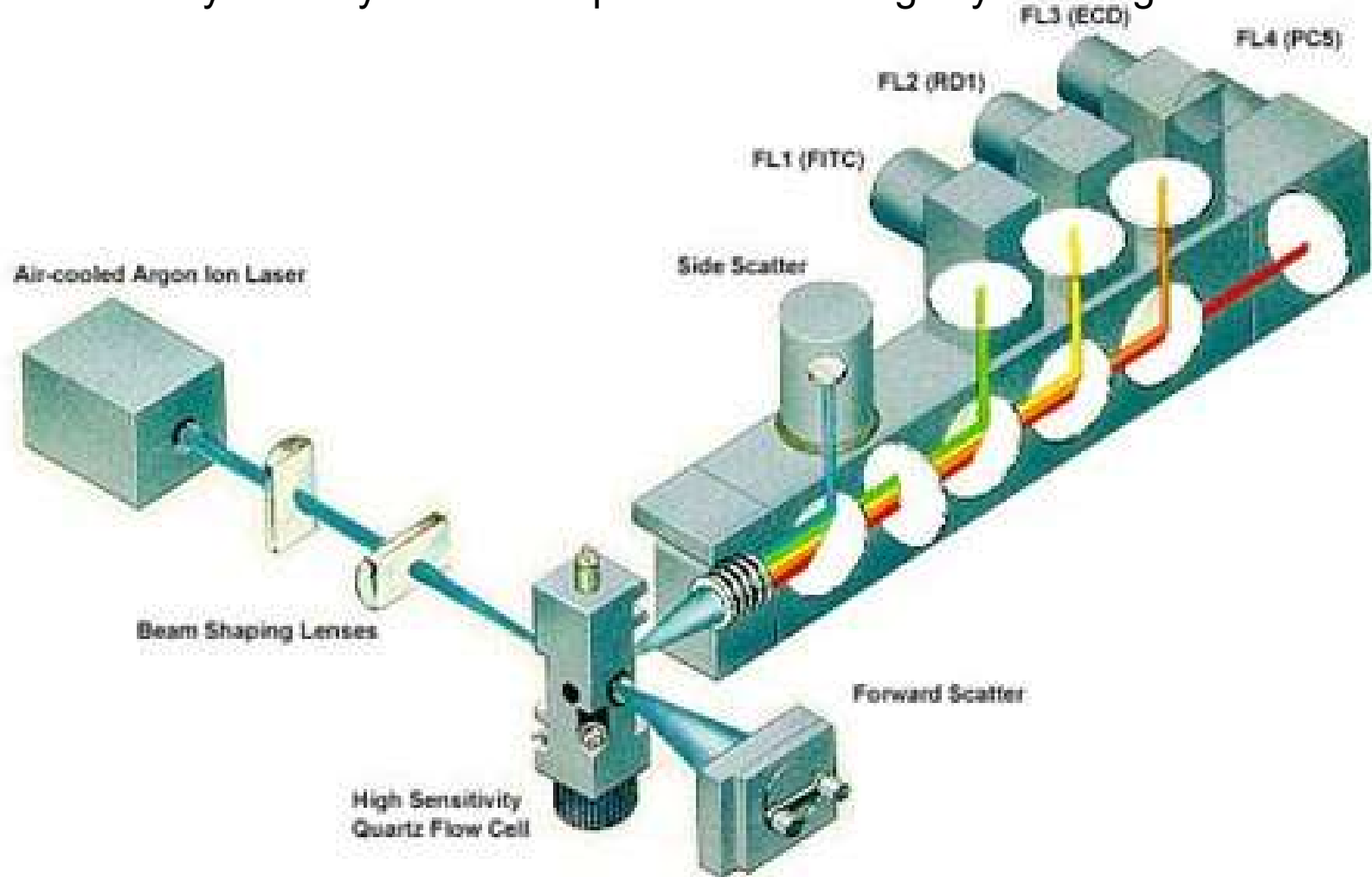
CD Nomenklatur	Hücre tipi	Antijen
CD1a	Kortikal timositler, B hücreler ve Dendritik hücre alt grupları	β 2 mG ve MHC benzeri proteinlere tutunabilir
CD2	T ve NK	Eritrositlerle rozet yapan bu moleküldür
CD3	Olgun T hücreler	T hücre reseptörü (TCR) ile ilişkide
CD4	Helper T hücreler, monositler, immatur miyeloid hücreler	MHC II için reseptör rolü var
CD5	Timositler, olgun T, B hücre alt grupları	T hücre çoğalması ile ilişkili
CD7	T, NK hücreler, bazı genç miyeloid hücreler	40 kD protein
CD8	Sitotoksik T, NK hücre alt grubu	MHC I için reseptördür
CD10	Öncü B hücreler, nötrofiller	nötral endopeptidaz
CD11b	Monosit, Nötrofil, NK hücre	Adezyon molekülü.
CD11c	Monosit, Nötrofil, NK, B hücre alt grupları	Adezyon
CD13	Miyeloid hücreler	Aminopeptidaz N
CD14	Monositler	LPS (Lipopolisakkarit) Reseptör
CD15	Nötrofil	X-hapten. 3-fucosyl asetyl laktosamine

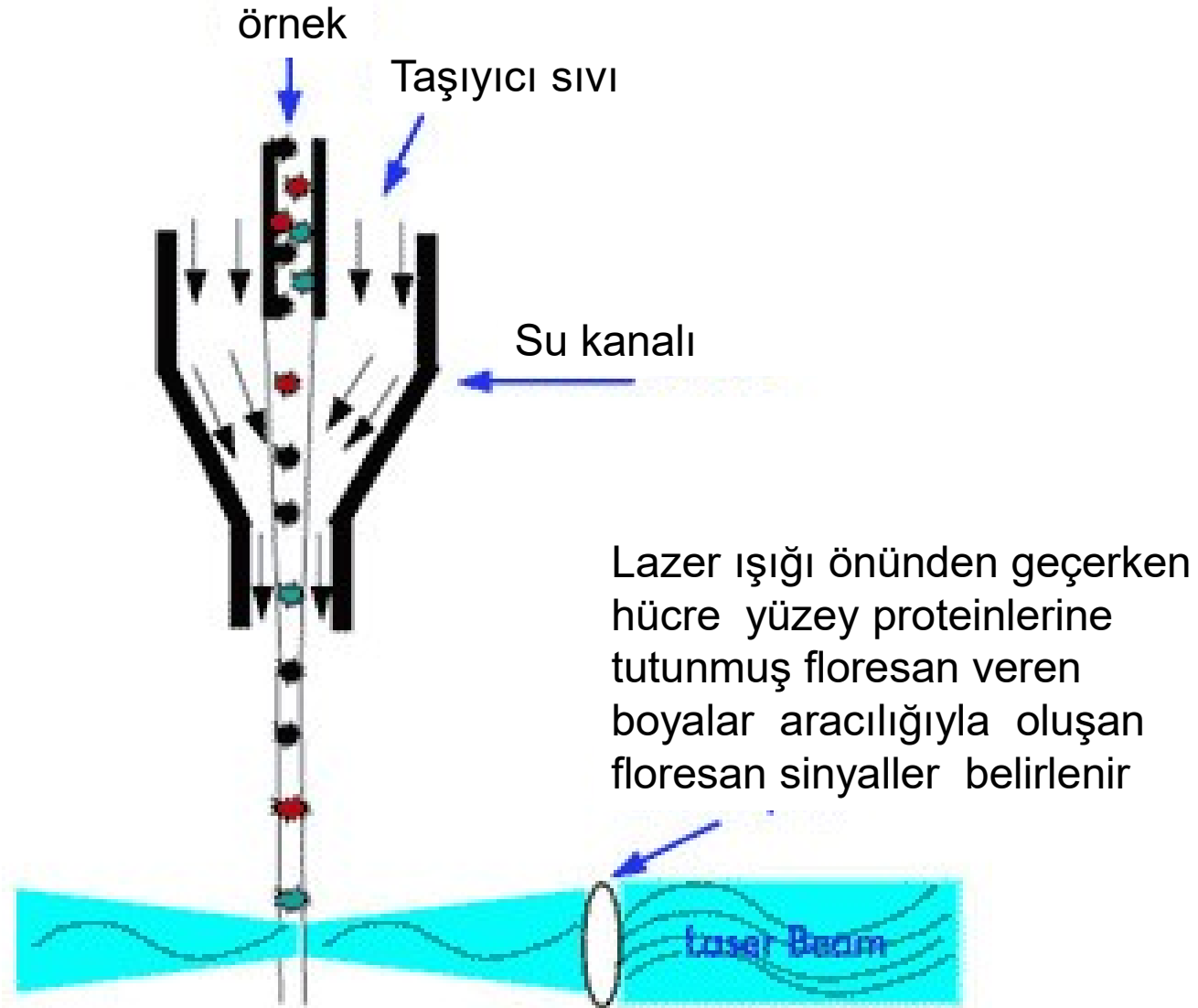
Akan HÜcre Ölçer



Akan Hücre Ölçer

Hücreler floresanla işaretli antikorlar ile işaretlendikten sonra lazer önünden geçirilir ve verdikleri sinyaller kaydedilerek toplanan veriler bilgisayarda değerlendirilir

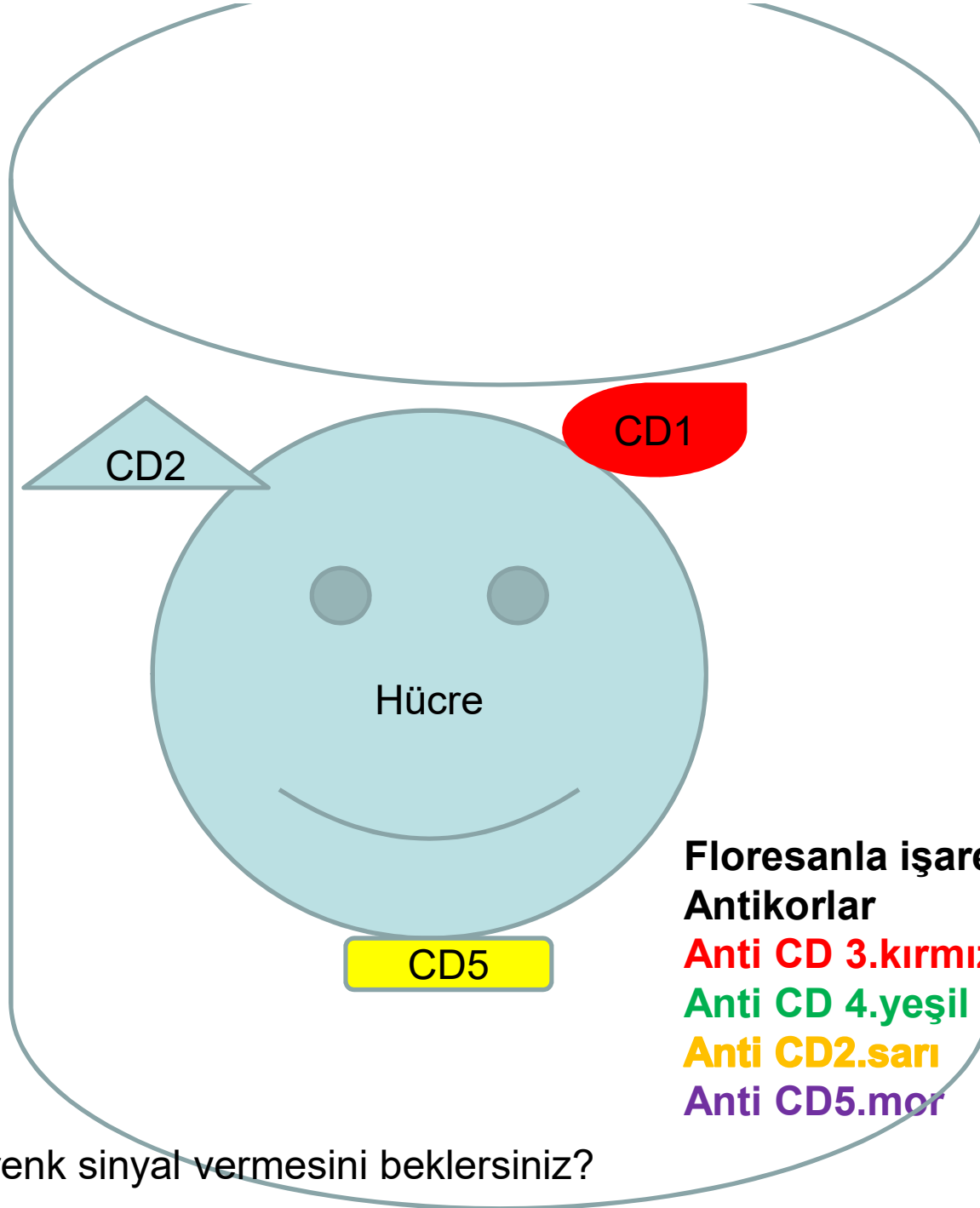




İşlemler***

- Hücrelerin monoklonal antikolar ile işaretlenmesi (hücre ve antikor bir tüpe eklenerek bekletilir . Bu sürede hücre yüzeyindeki bir antijene uygun bir antikor varsa bu antikor özgün olduğu antijene /hücreye bağlanır)
- Yıkama ile bağlanmayan antikoların hücreden uzaklaştırılması (santrifüj edip üstteki sıvı dökülüp PBS tamponu eklenerek tekrar santrifüj edilerek yapılır)
- Hücrelerin lazer önünden geçirilmesi ve oluşturdukları sinyallerin toplanması
- Toplanan Sinyallerin/verilerin analiz edilmesi

Deney Tüpü

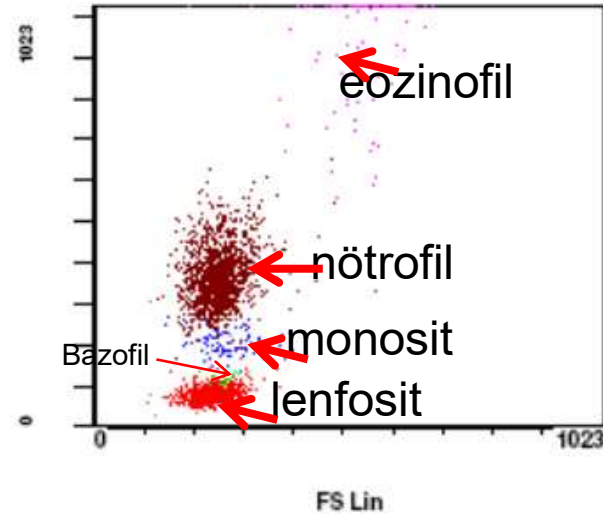
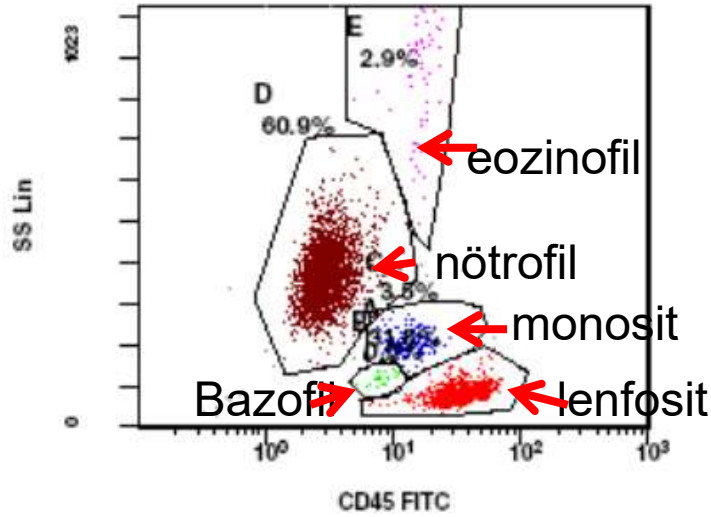


Hücrenin ne renk sinyal vermesini beklersiniz?

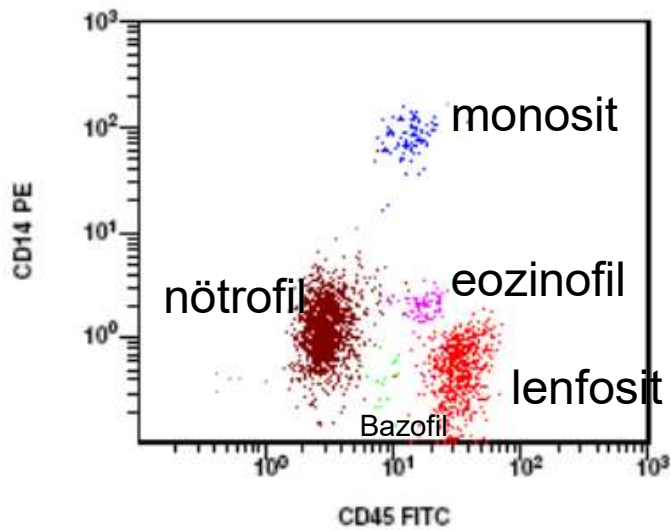
Işık Saçılımı



Hücrenin floresan, ışık saçılım özellikleri Hücrenin kimliği ve yaşı ile ilişkilidir



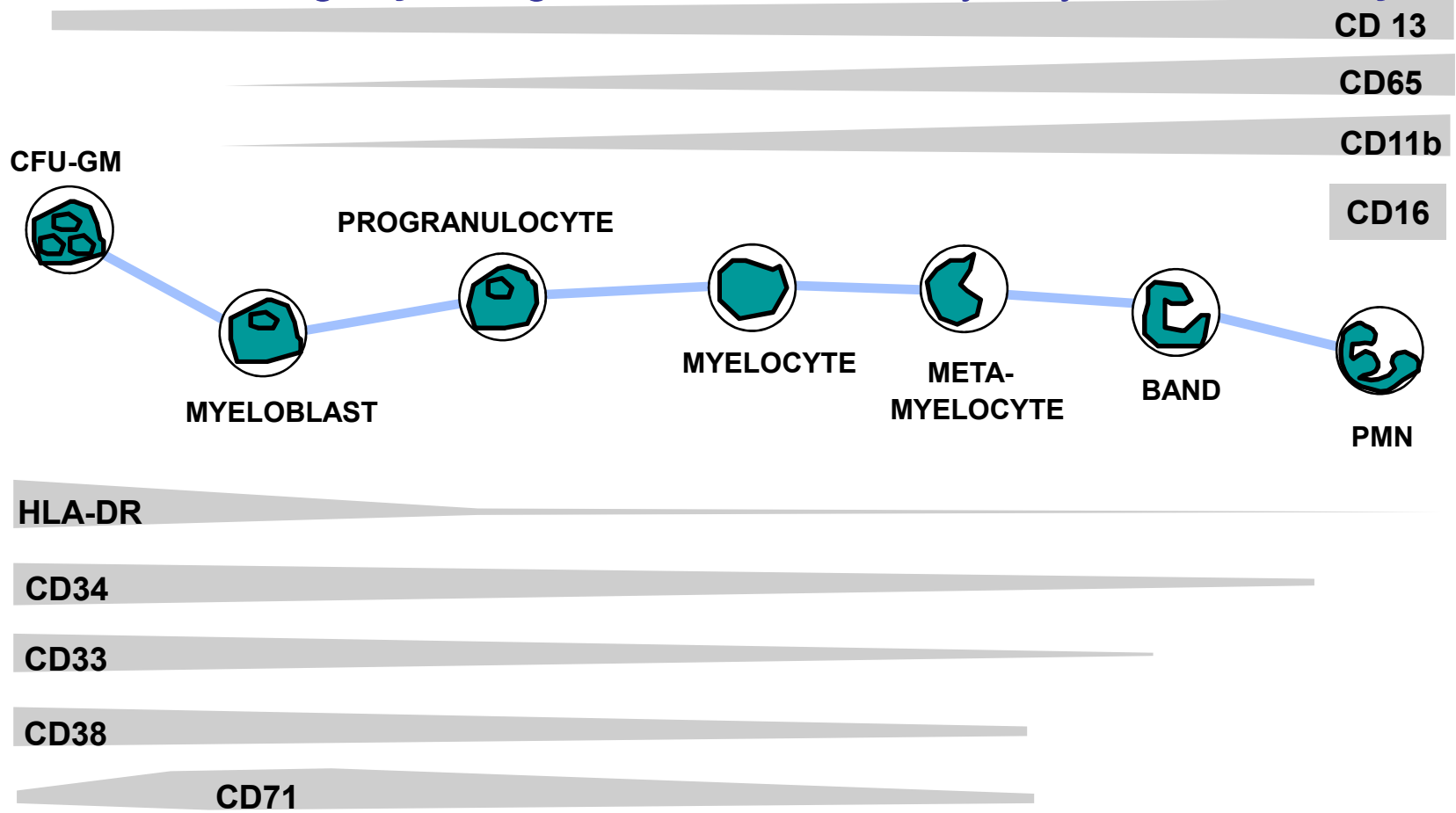
[Ungated] SADIK KAHRAMAN PR 2211 2006-11-22 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



Hücrenin floresan özellikleri Hücrenin kimliği ve yaşı ile ilişkili

Örnek: Miyelomonositer Seri Hücrelerde Antijen Dağılımı

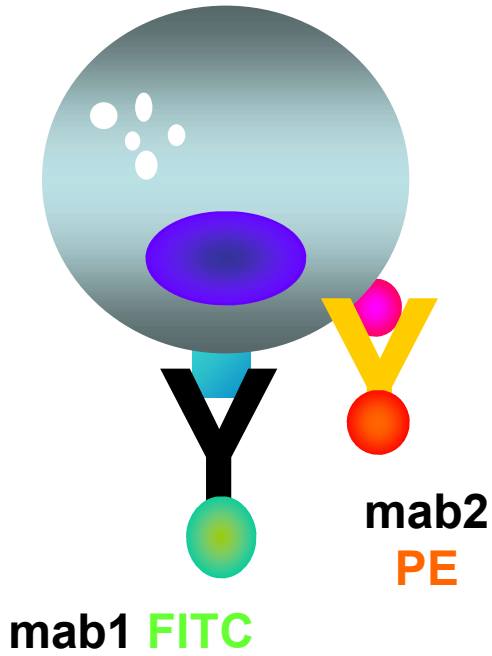
!!!! Hücreler genç ve olgun hallerinde farklı yüzey molekülleri taşırlar



Kaynak:Purdue Cytometry Labs

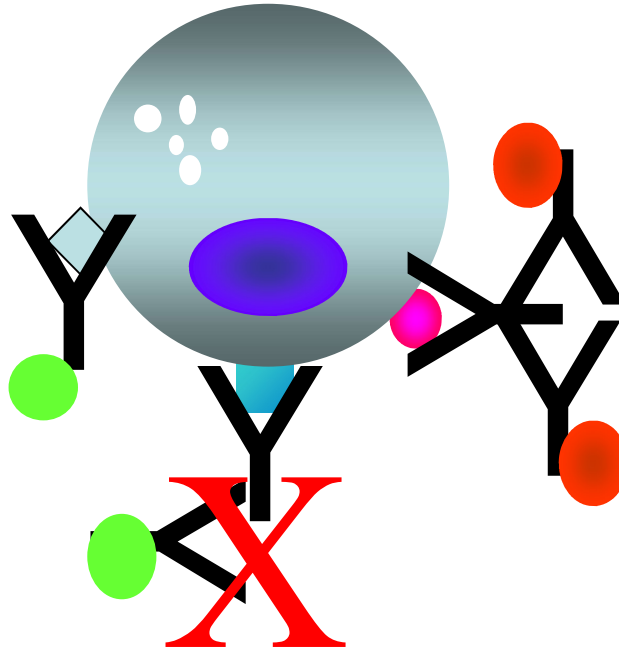
Boyama Teknikleri

Doğrudan



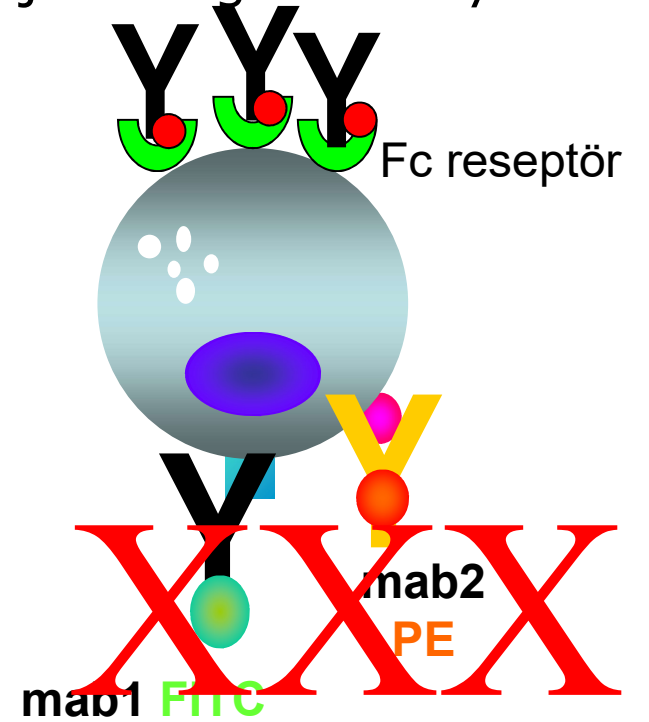
Hızlı ve çok parametreyi
birarada değerlendirmeye
uygun

Dolaylı



Aynı anda birden fazla
parametre için bu yöntem
kullanılmaz

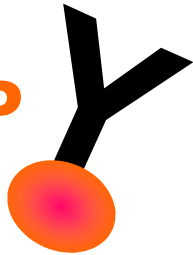
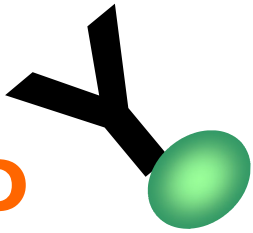
Antijene özgün olmayan



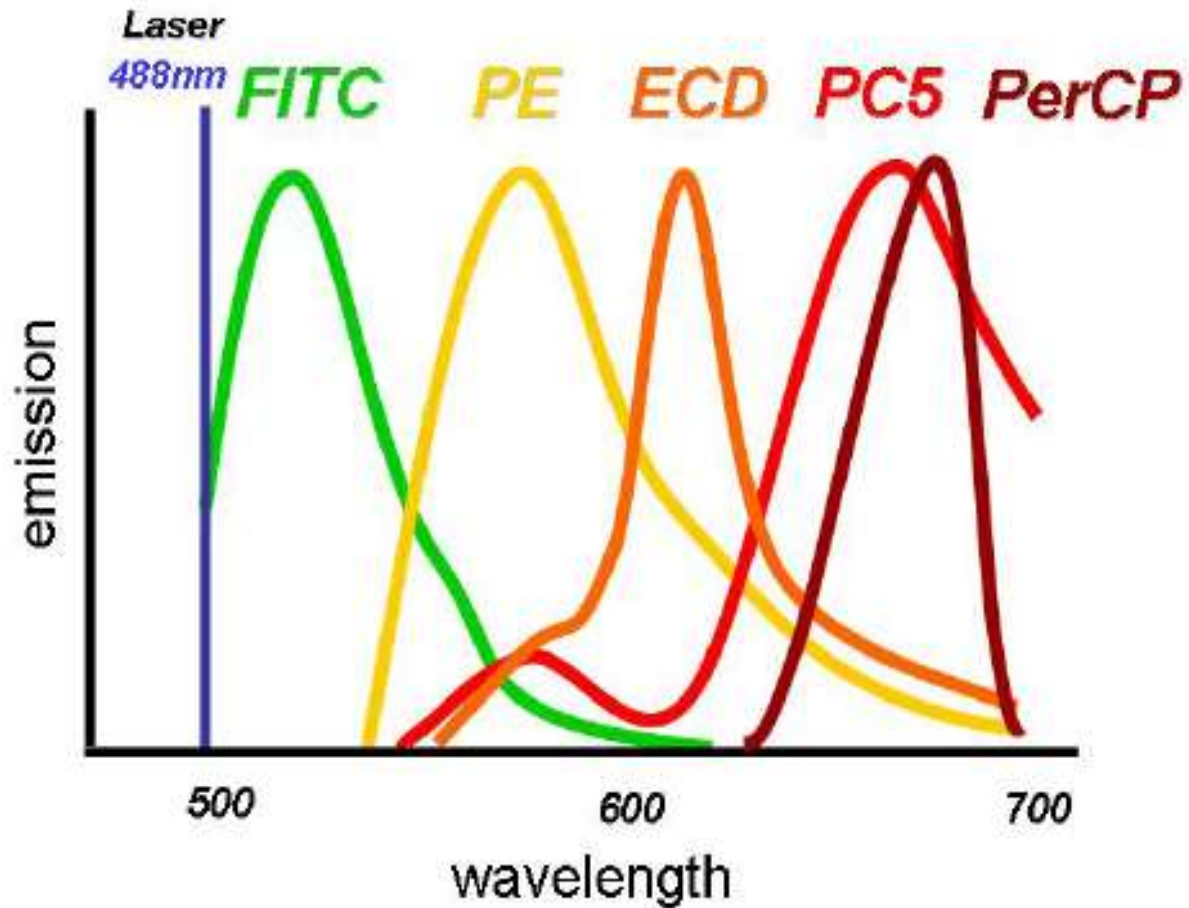
Tesbit edilen floresan,
hatalı sinyaldir Antikor
antijene bağlanmamıştır

Fluorokromlar

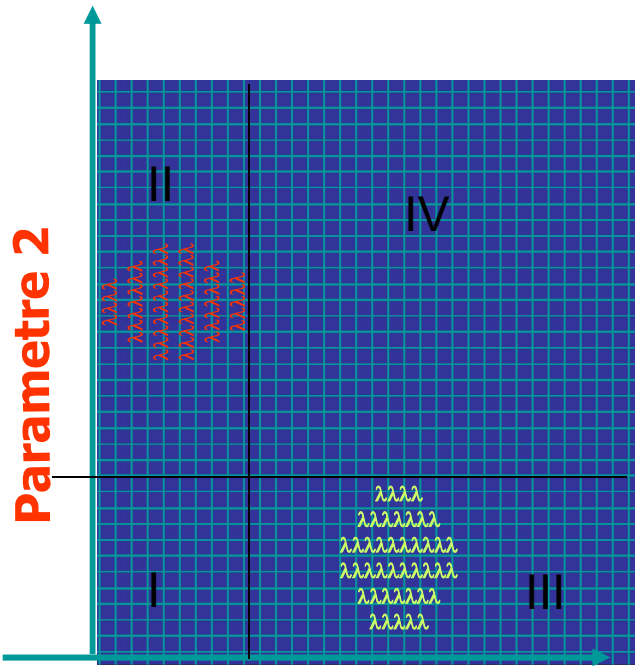
Fluorokrom	Eksitasyon	Emisyon	Molekül Ağ.
FITC	488 nm	520 nm	389 Da
PE	488 nm	578 nm	240 000 Da
ECD	488 nm	613 nm	250 000 Da
PC5	488 nm	668 nm	105 000 Da
PerCP	488 nm	688 nm	35 000 Da
APC	613 nm	665 nm	105 000 Da



Fluorokrom Seçenekleri

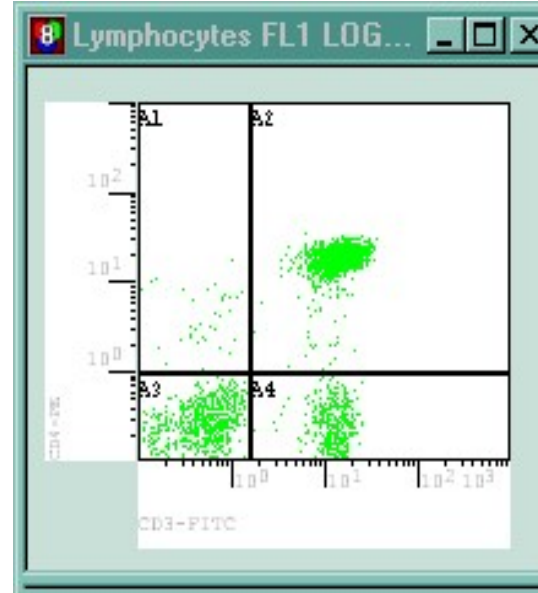


Sinyallerin analizi: Dot-Plot

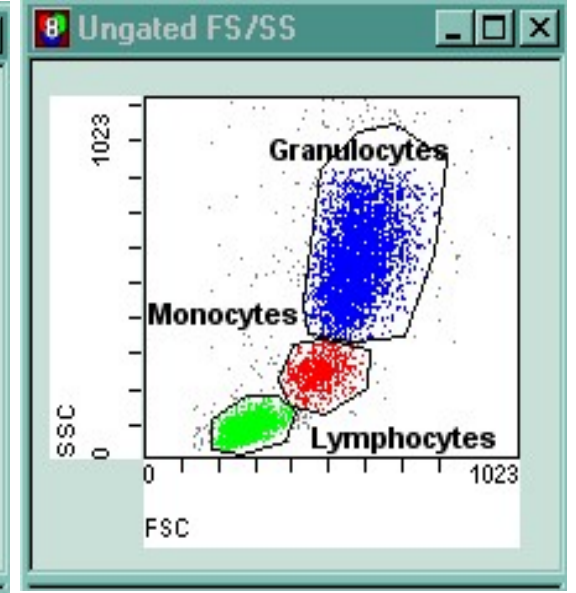


Parametre 1

İki renkli analiz:



Işık saçılımı:
Morfoloji hakkında
bilgi verir



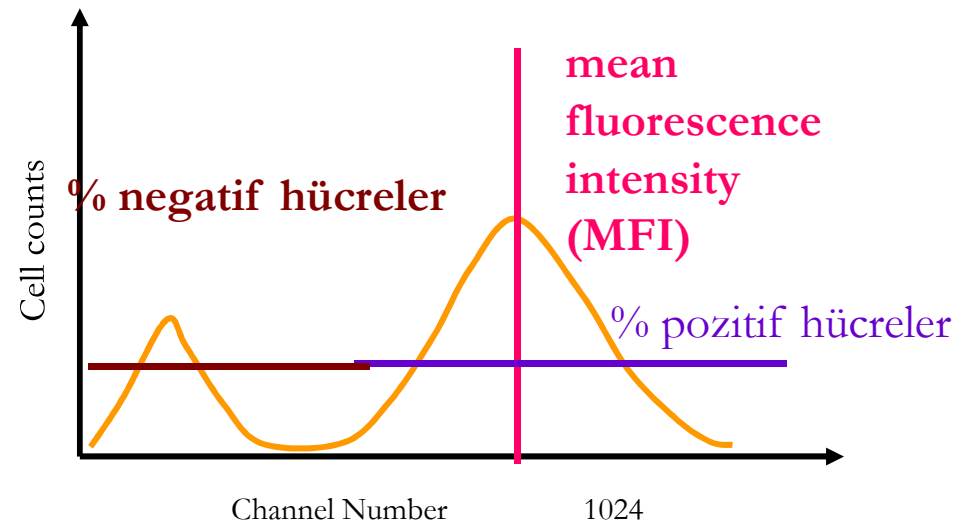
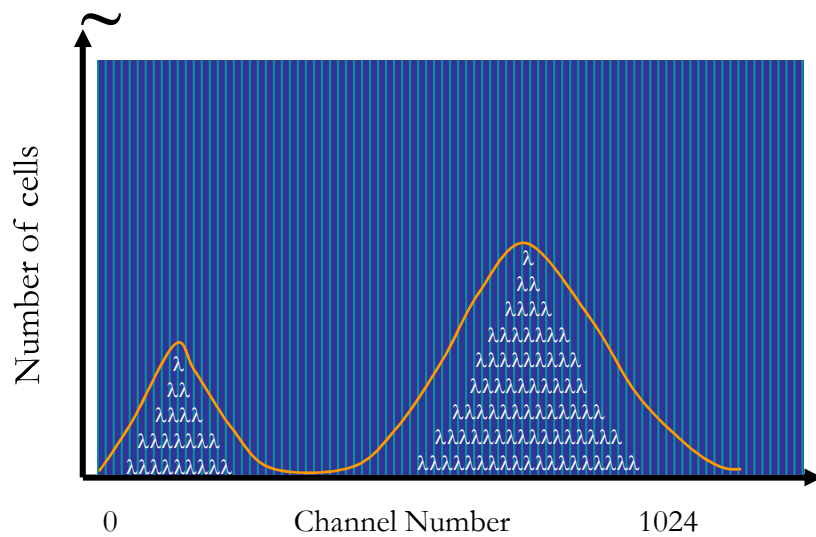
I: parametre 1ve 2 yok, II : sadece parametre 2 var, III: sadece parametre I var,
IV: parametre 1 ve 2 birlikte varlar

Verilerin Analizi

Histogram

% Negatif & % Pozitif hücreler

Antijen yoğunluğu ~ “Mean Fluorescence Intensity”



- Analizler yapılırken:
Hücrelerin genç ve olgun tipleri farklı antijenleri taşıyabilir, gençken taşıdıklarını kaybedebilir, şiddeti azalabilir ya da artabilir. Gençken taşımadıklarını olgunlaştıkça kazanabilir, şiddeti azalabilir ya da artabilir
- Taşıdıkları antijen çeşidi(sayısı) kadar, bu çeşitli antijenlerin herbirinin miktarları da değişebilir

İmmun Fenotiplendirme

Hücre yüzey Antijenlerine bakarak hücrelerin tanınması, onların kimliklerinin, kişiliklerinin tanınması işlemi için kullanılan bir tanımlamadır