

***Ulex europaeus* Lektininin Kan Grubu Bağlama Özgüllüğü**

Ali ATEŞ¹, Yeşim ÖZGÜR¹

Özet: *Bu çalışmada, Ulex europaeus bitkisinden elde edilen Ulex europaeus Agglutinin-I (UEA-I)'in insan kan grubu bağlama özgüllüğü ölçüldü. Bu deney için U tabanlı mikrotitrasyon kabı kullanıldı. 50µg/ml lektin çözeltisi, PBS (phosphate buffered saline) ile hazırlanarak başlangıç konsantrasyonu olarak alındı ve UEA-I'in seri sulandırılması ile insan kan grubu özgüllüğü belirlendi. Sonuç olarak, UEA-I'in %2'lik A grubu eritrositlerini 25µg/ml konsantrasyonda, B grubu eritrositlerini 6.25µg/ml konsantrasyonda, AB grubu eritrositlerini 50µg/ml konsantrasyonda ve O grubu eritrositlerini 1.57µg/ml konsantrasyonda aglutine ettiği belirlendi. Bu konsantrasyonlara bakılarak, UEA-I'in O grubu insan kanı eritrositlerine karşı spesifik olduğu tespit edildi.*

Anahtar kelimeler : **Lektin, İnsan kan grupları, Ulex europaeus, UEA-I**

Blood Group Binding Specificity of The Lectin, *Ulex europaeus*

Abstract: *In this study, it was measured the human blood group binding specificity of the Ulex europaeus Agglutinin-I (UEA-I) from Ulex europaeus. U-based microtitration plate was used for this experiment. 50µg/ml lectin solution was prepared with PBS and taken as a initiation concentration, and human blood group specificity of UEA-I was determined by use the serial dilution of lectin solution. As a result, it was observed that the UEA-I agglutinated the 2% A group erythrocytes at the concentration of 25µg/ml, the B group erythrocytes at the concentration of 6.25µg/ml, the AB group erythrocytes at the concentration of 50µg/ml and O group erythrocytes at the concentration of 1.57µg/ml. According to the results, it was determined that UEA-I is specific for O human blood group erythrocyte at that concentration examined.*

Key Words : **Lectin, Human blood groups, Ulex europaeus, UEA-I**

Giriş

Lektinler, en az iki şeker bağlama bölgesi ihtiva eden, immün orijinli olmayan, hücreleri aglutine eden, glikokonjugatları çöktüren, protein veya glikoprotein yapısında olan moleküllerdir [1]. Geçmiş yıllarda aglutinin, fitohemaglutinin, fitoaglutinin ve protektin gibi kelimeler, lektin yerine kullanılmışlarsa da, günümüzde lektin kelimesi daha çok tercih edilmektedir [1,2]. Lektinler başlangıçta bitkilerden elde edildiğinden, bitkilere özgü bileşikler olarak düşünülürdü. Fakat zamanla diğer canlılardan da lektinler elde edildi [3].

Spesifik karbohidrat bağlama özelliğinden dolayı lektinler, kompleks hücre ekstraktlarından glikoproteinlerin [4] ve enzimlerin [5] saflaştırılması, glikoprotein ve polisakaritlerin izolasyonu [6,7], hücre ekstraktları SDS-PAGE (soyum dodesil silfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile ayrıştırıldıktan sonra glikoproteinlerin tesbiti [8,9,10], kanser araştırmaları [11] ve hücre tiplenişi [12] gibi yaygın araştırma alanlarında güçlü vasıtalar olarak kullanılmaktadır.

¹ Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 42031 Kampüs/KONYA

Bu çalışma ile, lektinlerin spesifik şeker bağlama özelliğinden faydalanılarak, *Ulex europaeus* I lektininin (UEA I), insan kan grupları eritrositlerini aglutine etme aktivitesinin incelenmesi ve bu lektinin insan kan gruplarını ayırt etmede kullanılıp kullanılmayacağı amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan *Ulex europaeus* aglutinin-I (UEA-I), Sigma'dan (lot 120K4104, Sigma Chemical Company St. Louis/USA) satın alındı. PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.3) ile lektinin 1µg /µl olacak şekilde çözeltisi hazırlandı ve gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Hemaglutinasyon çalışması için insan kan gruplarına ait %2'lik eritrosit süspansiyonları kullanıldı. Kanlar, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'ndan taze olarak temin edildi. %2'lik eritrosit süspansiyonları kısaca aşağıdaki şekilde hazırlandı. Kan grupları tespit edildikten sonra kanlar, heparinli tüplerde 2000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst kısımda toplanan serum, dipteki hücreli kısım fazla hareketlendirilmeden atıldı. Eritrositleri yıkamak için geride kalan hücre hacminin yaklaşık üç katı kadar PBS tüplere ilave edilerek, tüpün ağzı bir parça parafilm ile kapatıldı ve tüp ters düz edildikten sonra 2000 rpm'de beş dakika santrifüje edildi. Santrifüjden sonra parafilm çıkartıldı ve tüpün üst kısmında biriken sarı renkli sıvı atıldı. Bu işleme tüpün üst kısmında renksiz parlak sıvı toplanana kadar devam edildi ve bu eritrositlerden PBS ile %2'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı.

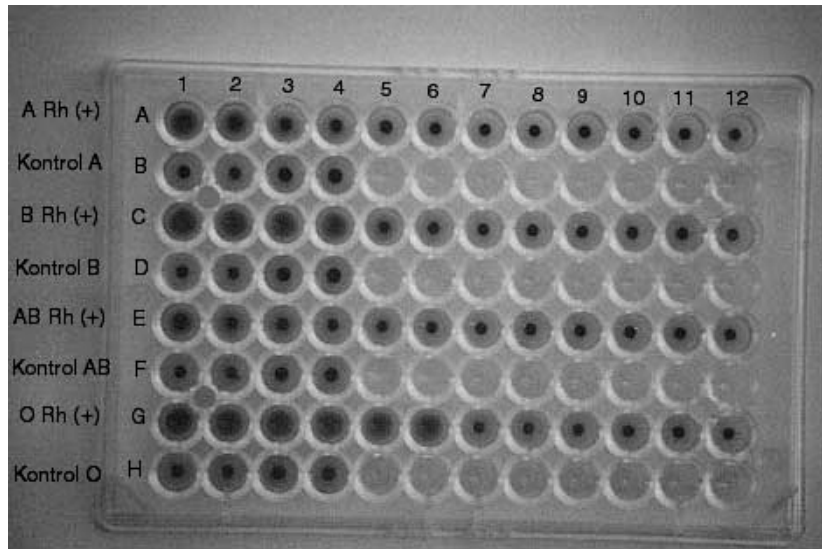
Hemaglutinasyon çalışmaları Frost [13] ve Castro *et al* [14]'a göre, 96 kuyucuklu U tabanlı mikrotitrasyon kabı (Nunc, Denmark) içerisinde gerçekleştirildi. Hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için yapılan ön denemelerde, 50 µg/ml lektin çözeltisi hemaglutinasyon için yeterli bulunduğundan, çalışmada 50 µg/ml lektin çözeltisi kullanılmıştır.

Hemaglutinasyon aktivitesinin tayini için mikrotitrasyon kabının A₁, C₁, E₁ ve G₁ kuyucuklarına 50'şer µl lektin çözeltisi, A₂'den A₁₂, C₂'den C₁₂, E₂'den E₁₂ ve G₂'den G₁₂'ye kadar olan kuyucuklara ise 25'er µl PBS konularak seri dilüsyon yapıldı. En son kuyucuklardan 25'er µl alınarak dışarı atıldı. Daha sonra A kuyucuklarına A, C kuyucuklarına B, E kuyucuklarına AB, G kuyucuklarına O grubu eritrosit süspansiyonundan 25'er µl ilave edildi. Kan gruplarının kontrolü her grubun hemen altındaki kuyucuk serisinde yapıldı.

Mikrotitrasyon kabı oda sıcaklığında (22 °C) bir saat inkübasyona bırakıldıktan sonra sonucun fotoğrafı çekildi. Lektinli ve lektinsiz ortamda hücrelerin fotoğrafları da çekilerek, ikinci bir kontrol kullanıldı.

Araştırma Sonuçları

Ulex europaeus aglutinin I'nin, insan A, B, AB ve O kan grubu eritrositlerini aglutine etme aktivitesi araştırıldı ve elde edilen sonuçların fotoğrafı çekildi (şekil 1).



Şekil 1. %2'lik UEA-I'nin insan A, B, AB ve O kan grup eritrositlerini aglutinasyonu.

Tablo 1. Lektinin seri dilüsyonu sonucu mikrotitrasyon kabının A, C, E ve G sıralarındaki her kuyucukta bulunan lektin miktarı (µg/ml)

KANLAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A, B, A, B, O												
A Rh(+)	50 µg/ml	25 * µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	3.13 µg/ml	1.57 µg/ml	0.79 µg/ml	0.40 µg/ml	0.20 µg/ml	0.10 µg/ml	0.05 µg/ml	0.03 µg/ml
Kontrol A	25µl PBS + 25 µl A Rh(+)	25µl PBS + 25 µl A Rh(+)	50 µl A Rh(+)	50 µl A Rh(+)	50 µl PBS	50 µl PBS						
B Rh(+)	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 * µg/ml	3.13 µg/ml	1.57 µg/ml	0.79 µg/ml	0.40 µg/ml	0.20 µg/ml	0.10 µg/ml	0.05 µg/ml	0.03 µg/ml
Kontrol B	25µl PBS + 25 µl B Rh(+)	25µl PBS + 25 µl B Rh(+)	50 µl B Rh(+)	50 µl B Rh(+)	50 µl PBS	50 µl PBS						
AB Rh(+)	50 * µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	3.13 µg/ml	1.57 µg/ml	0.79 µg/ml	0.40 µg/ml	0.20 µg/ml	0.10 µg/ml	0.05 µg/ml	0.03 µg/ml
Kontrol AB	25µl PBS + 25 µl AB Rh(+)	25µl PBS + 25 µl AB Rh(+)	50 µl AB Rh(+)	50 µl AB Rh(+)	50 µl PBS	50 µl PBS						
O Rh(+)	50 µg/ml	25 µg/ml	12.5 µg/ml	6.25 µg/ml	3.13 µg/ml	1.57 * µg/ml	0.79 µg/ml	0.40 µg/ml	0.20 µg/ml	0.10 µg/ml	0.05 µg/ml	0.03 µg/ml
Kontrol O	25µl PBS + 25 µl O Rh(+)	25µl PBS + 25 µl O Rh(+)	50 µl O Rh(+)	50 µl O Rh(+)	50 µl PBS	50 µl PBS						

Şekil 1'de görülen mikrotitrasyon kabı incelendiğinde tabanı tamamen örtülü olan kuyucuklarda aglutinasyonun gerçekleştiğini, tabanında nokta şeklinde bir görüntü bulunan kuyucuklarda ise aglutinasyonun gerçekleşmediğini göstermektedir.

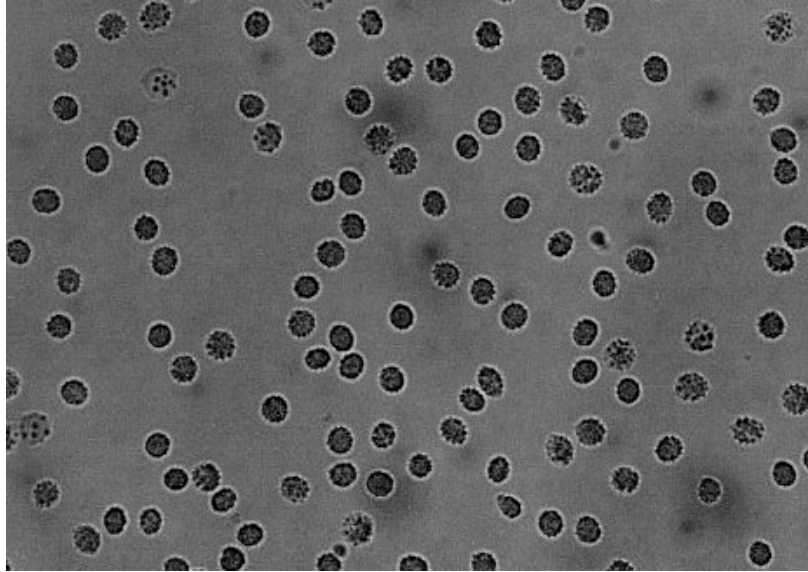
Bu araştırma sonuçlarına göre; UEA-I'in %2'lik A grubu eritrositlerinin aglutinasyonu (A₁ kuyucuğundan A₁₂ kuyucuğuna kadar) incelendiğinde, UEA-I'in A grubu insan kanı eritrositlerini aglutine etmesi için gerekli olan en düşük dozun 25µg/ml olduğu tespit edildi (Tablo 1). UEA-I'in %2'lik B grubu eritrositlerinin aglutinasyonu (C₁ kuyucuğundan C₁₂ kuyucuğuna kadar) incelendiği zaman; mikrotitrasyon kabının C₁, C₂, C₃ ve C₄ kuyucuklarında aglutinasyonun gerçekleştiği, C₅'den C₁₂'ye kadar olan kuyucuklarda ise aglutinasyonun gerçekleşmediği görülmektedir. Buna göre UEA-I'in B grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük UEA-I dozunun 6.25µg/ml olduğu tespit edildi (Tablo 1).

UEA-I'in %2'lik AB grubu eritrositlerinin aglutinasyonu (E₁ kuyucuğundan E₁₂ kuyucuğuna kadar) incelendiğinde ilk kuyucukta (E₁) belli belirsiz bir aglutinasyonun olduğu gözlenmektedir. Diğer kuyucuklarda aglutinasyon meydana gelmemiştir. Buna göre UEA-I'in %2'lik AB grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük miktarının 50µg/ml olduğu görülmektedir (Tablo 1).

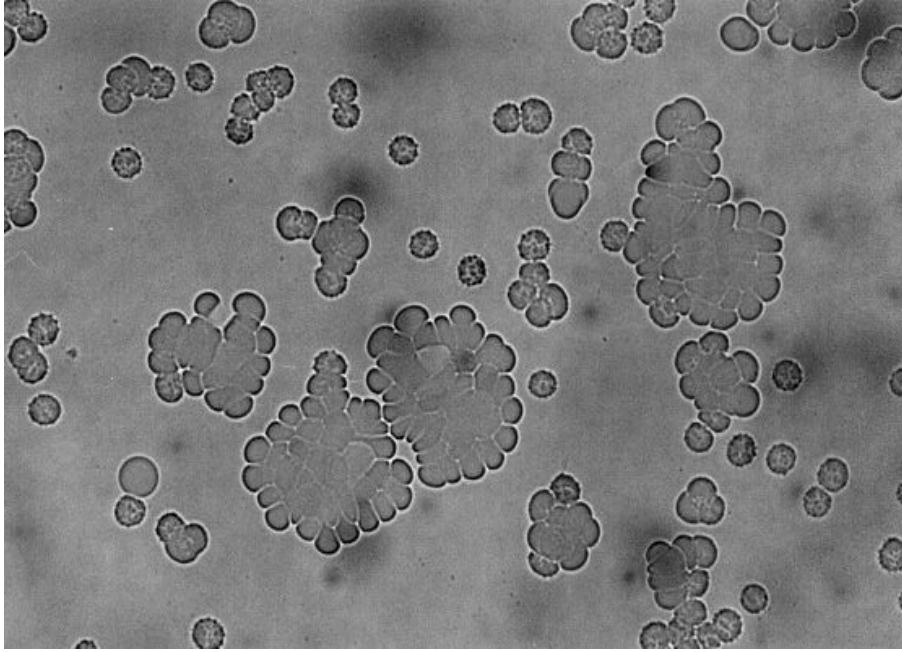
UEA-I'in %2'lik O grubu eritrositlerinin aglutinasyonu (G₁ kuyucuğundan G₁₂ kuyucuğuna kadar) incelendiği zaman G₁'den G₆'ya kadar olan kuyucuklarda aglutinasyonun gerçekleştiği, G₇'den G₁₂'ye kadar olan kuyucuklarda ise aglutinasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Buna göre; UEA-I'in %2'lik O grubu insan kanı eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük dozun 1.57µg/ml olduğu belirlendi. (Tablo 1).

Hemaglutinasyon çalışmaları gerçekleştirilirken aglutinasyonun UEA-I'den mi kaynaklandığı yoksa hazırlanmış olan eritrosit süspansiyonu veya PBS içerisindeki herhangi bir maddenin mi aglutinasyona sebep olduğunu anlamak için kontrol grupları hazırlanmıştır. A kan grubunun kontrolü yapılırken B₁ kuyucuğu ile B₂ kuyucuğuna 25'er µl PBS ve 25'er µl A grubu kanı birlikte, B₃ ile B₄ kuyucuklarına da 50'şer µl A grubu eritrosit süspansiyonu ayrı ayrı konulmuştur. Aynı şekilde diğer üç grubun da kontrolü yapılmış fakat bunlar için A kan grubu yerine kendi grupları konmuştur. Deney sonucunda her dört grubun kontrol gruplarında hiçbir aglutinasyon gözlenmemiş, eritrositler nokta şeklinde mikrotitrasyon kabının tabanına çökmüştür (Şekil 1).

Hemaglutinasyonun en iyi şekilde gözleendiği O grubu eritrositlerinin %5'lik süspansiyonu hazırlanarak iki ayrı lama birer damla damlatıldı. Kan damlalarının birinin üzerine bir damla PBS, diğerine de bir damla 50 µg/ml'lik UEA-I çözeltisi konularak temiz bir lamelle kapatıldı. Oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra mikroskop altında fotoğrafları çekildi. Aglutine olan ve olmayan hücrelerin görüntüleri Şekil 2 ve Şekil 3'de görülmektedir.



Şekil 2. Hemaglutine olmayan eritrositler, x400.



Şekil 3. UEA-I'in O grubu eritrositlerin hemaglutinasyonu, x400.

Tartışma

Lektinlerin en temel özelliği, insan ve hayvan eritrositlerinin yüzeylerindeki özgül reseptörlere bağlanarak, aglutinasyona neden olmalarıdır. Aglutinasyon olayı; lektinlerin protein kısımlarının hücre (eritrosit, bira mayası, bakteri, virüs vs.) yüzeyinde bulunan, oligosakkarit zincirindeki şeker ünitelerine spesifik olarak çapraz bağlanması ile oluşmaktadır [15,16]. Lektinlerin spesifik karbohidratlarla olan bağlanmaları ve aglutinasyon aktiviteleri temelde antijen ile antikorların bağlanmasına benzemekle birlikte, lektinlerin şekerlerle olan bağlanmaları ve aglutinasyon aktiviteleri antikorlara göre daha basittir. [17].

Ulex europaeus bitkisinin tohumlarının aynı kan grubu'na (O grubu), fakat farklı karbohidratlara karşı spesifisite gösteren ve UEA-I ve UEA-II olarak adlandırılan iki farklı izolektini içerdiği, UEA-I'in L-fukoz'a karşı, UEA-II'nin ise N-asetilsitobioz'a karşı spesifisite gösterdiği bilinmektedir [18].

Bu çalışmada, UEA-I'in hazır preparatı kullanılmış olup, UEA-I'in insan A, B, AB ve O kan grupları eritrositlerinin aglutine etme aktivitesi ölçülmüş ve UEA-I'in bu kan gruplarını hangi oranda hemaglutine ettiği tespit edilmiştir. UEA-I'in A grubu insan kanı eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan en düşük miktarının 25µg/ml, B grubu için 6.25µg/ml, AB grubu için 50µg/ml ve O grubu eritrositleri için 1.57µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Bu dozlar incelendiği zaman, UEA-I'in O grubu insan kanı eritrositlerini, diğer üç gruba oranla oldukça düşük konsantrasyonda aglutine ettiği ve UEA-I'in O grubu için daha spesifik olduğu görülmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular, Horejsi ve Kocoürek [19], Pereira ve arkadaşları [18], Delbaere ve arkadaşları [20] bulgularıyla uygunluk göstermektedir. Horejsi ve Kocoürek (19), UEA-I'in A, B ve O kan gruplarının eritrositleri ile olan hemaglutinasyonunu incelemiş ve UEA-I'in O grubunu 1,2 µg/ml de aglutine ettiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise UEA-I'in O grubunu 1.57µg/ml'de aglutine ettiği tespit edilmiştir. Farklılık muhtemelen kullanılan lektinin saflığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca çalışmamızın sonuçları, *Ulex europaeus* aglutinin-I'in, O kan grubu antijeninde bulunan az sayıdaki

glikoproteinlerin ortaya çıkarılmasında ve bu antijenlerde bulunan kompleks tip oligosakkaritlerin küçük parçalara ayrılmasında oldukça kullanışlı olduğunu rapor eden Matsui ve arkadaşlarının [21], bulguları ile de desteklenmektedir. *Lotus tetranogolobus* aglutinini (LTA) ile yapılan bir çalışmada [22], LTA'nın %2'lik O grubu eritrositlerini 33 µg/ml konsantrasyonda aglutine ettiği ve bu aglutinasyonun inhibisyonunun L-fukoz tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir. UEA-I ile LTA aynı şekere (L-fukoz) karşı spesifite gösterirken, UEA-I'in %2'lik O grubu eritrositlerini aglutine etmek için gerekli olan dozu (1.57µg/ml) oldukça düşüktür. UEA-I ile LTA'nın hem aynı şekere karşı spesifite göstermeleri hem de UEA-I'in O grubu eritrositlerini LTA'ya göre daha düşük dozda aglutine etmesi UEA-I'i; O grubu eritrositlerini A, B ve AB grubu eritrositlerinden ayırmada, LTA'ya oranla daha kullanışlı hale getirdiği söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular, *Ulex europaeus* bitkisinden elde edilen UEA-I'in, O grubu insan eritrositlerine karşı yüksek spesifite gösterdiğini, bu nedenle de O grubu insan eritrositlerini diğer gruplardan ayırmak için kullanılabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., and Sharon., **What Should Be Called a Lectin?** Nature, 285:66 (1980).
2. Dixon, H.B.F., **Defining a Lectin.** Nature, 292:192 (1981).
3. Goldstein, I.J. and Poretz, R.D., **Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins.** In "The Lectins" (Eds. Liener, I.E., Sharon, I.J.). Academic Pres. Orlando. 33-248 (1986).
4. Iwase, H., Kato, Y., and Hotta, K., **Ovalbumin Subfractionation and Individual Difference in Ovalbumin Microheterogeneity.** J. Biol. Chem., 256; 5638-5642 (1981).
5. Dulaney, J.T. **Binding Interaction of Glycoproteins with Lectins.** Molecular and Cellular Biochemistry. 21.43-63 (1979).
6. Fujita-Yamaguchi, Y., Choi, S., Sakamoto, Y. and Itukara, K., **Purification of Insulin Receptor with Full Binding Activity.** J. Biol. Chem., 258, 5045-5049 (1983).
7. Shibita, S., Peters, B.P., Roberts, D.D., Goldstein, I., and Liotta, L.A., **Isolation of Laminin by Affinite Chromatography on Immobilised *Griffonia simplicifolia*-I Lectin.** FEBS LETT.; 142:194-198 (1982).
8. Ateş, A., O'Farrell, M.K. and Bağcı, H., **Proliferation-Related Expression of Glycoproteins of Swiss Mouse 3T3 Fibroblasts.** Tr.J.of Biology, 18, 123-131 (1994).
9. Glass, W.F., Briggs, R.C. and Hnilca, L.S., **Use of Lectins for Detection Electrophoretically Separated Glycoproteins Transferred onto Nitrocellulose Sheets.** Anal. Biochem., 115, 219-224 (1981).
10. Hawkes, R., Niday, E., and Gordon, J., **A Dot Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies.** Anal. Biochem.;199:142-147 (1982).
11. Dennis, J.W., **Partial Reversion of the Metastatic Phenotype in a Wheat Germ Agglutinin-Resistant Mutant of Murine Tumour Cell Line MDAV-D2 Selected with *Bandeiraea simplicifolia* Seed Lectins.** J.N.C.I., 74, 1111-120 (1985).
12. Gilboa-Galber, N., Mymon, H., and Oren, A., **Typing of Halophilic Archaea and Characterization of Their Cell Surface Carbohydrates by Use of Lectins.** FEMS Microbiol. Lett.;163:91-97 (1998).
13. Frost, R.G., Reitherman, R.W., Miller, A.L., and O'Brien, J.S., **Purification of *Ulex europaeus* Hemagglutinin-I by Affinite Chromatography.** Analytical Biochemistry., 69,170-179 (1975).
14. Castro, V.M., Boman, H.G., and Hammerstrom, S., **Isolation and Characterization of a Group of Isolectins with Galactose/ N-Acetyl Galactosamine Specificity from Hemolymph of the Giant Silk Mont *Hyalophora cecropia* (American cockroach).** Fur. J. Biochem.;168:75-82 (1987).
15. Slifkin, M., and Doyle, R.J., **Lectins and Their Application to Clinical Microbiology.** Clin. Microbiol. Rev. 3: 197-218 (1990).

16. Mc Kenzie, A.N.J., and Preston, T.M., **Biological Characterization of the *Calliphora vomitoria* Agglutinin**. Dev. Comp. Immunol., 16, 85-93 (1992 b).
17. Guyton, A.C., and Hall, J.E., **Textbook of Medical Physiology**. Acta, 304:93-102
18. Pereira, M.A.E., Kisailus, E.C., Gruezo, F., Kabat, E.A., **Immunochemical Studies on the Combining Site of the Blood Group H-Specific Lectin-I from *Ulex europaeus* Seeds**. Arch. Biochem. Biophys., 185,108-115 (1978).
19. Horejsi, V., and Kocourek, J., **Studies on Phytohemagglutinin. Some Properties of the Anti-H Specific Phytohemagglutinin of the Furze Seeds (*Ulex europaeus* L.)**. Biochim. et Biophys. Acta, 336:329-337 (1974).
20. Delbaere, L.T.J., Vandonselaar, M., and Prasad, L., **Molecular Recognition of a Human Blood Group Determinant by a Plant Lectin**. Can. J. Chem., 68:1116-1121 (1990).
21. Matsui, T., Hamako, J., Ozeki, Y., and Titani, K., **Comparative Study of Blood Group-Recognizing Lectins Toward ABO Blood Group Antigens on Neoglycoproteins, Glycoproteins and Complex-Type Oligosaccharides**. Biochemica et Biophysica Acta;1525(1-2): 50-57 (2001).
22. Pereira, M.A.E., **Lectin from *Lotus tetragonolobus* Seeds**. Biochem.13,3184-3192 (1974).

Ulex europaeus Lektininin Kan Grubu Bağlama Özgüllüğü