Archive of SID

تعیین و جداسازی پروتئین CD59 از پلاسمای منی انسان*

دکتر عباس رضایی[1]، دکتر محمدحسین نصر اصفهانی، دکتر محمود هاشمی‌تبار،
دکتر حمید بهرامیان، فرزاد عریضی

چکیده مقاله

مقدمه. CD59 یکی از پروتئین‌های تنظیم کنندهٔ چرخهٔ کمپلمان است که با ممانعت از تشکیل کمپلکس حمله کننده به غشا نقش مهاری خود را اعمال می‌کند. استفاده درمانی از این پروتئین در جلوگیری از عوارض پاتولوژیک ناشی از فعال شدن بدون کنترل سیستم کمپلمان و در جلوگیری از رد عضو پیوندی بصورت فوق حاد حایز اهمیت است. در این تحقیق تعیین و جدا سازی CD59 از منابع پروستازومی محلول در پلاسمای منی انجام شد.

روشها. مطابق استانداردهای WHO از ۶ فرد نرمواسپرمی مایع منی تهیه و پلاسمای منی آن جدا گردید. پروستازوم‌های موجود در پلاسمای منی با اولتراسانتریفوژ رسوب داده شدند و فراکسیون پروستازومی با استفاده از ستون سپوروز، ژل فیلتراسیون شد. با استفاده از آنتی بادی منوکلونال علیه حضور CD59(ME43) و تکنیک Dot-Blot حضور پروتئین در فراکسیون‌های بدست آمده از ستون سپوروز مورد ارزیابی قرار گرفت. وزن ملکولی و درجهٔ خلوص پروتئین بوسیله SDS-PAGE و سپس Western Blot تعیین شد.

نتایج. پروتئین فوق فقط در فراکسیون‌های ناحیه ML ۶/۵، ML ۱۵ آشکار گردید. وزن ملکولی آن بر اساس سایز مارکر در فراکسیون‌های فوق بترتیب ۶۵ و ۲۱ کیلو دالتون بود. درجهٔ خلوص آن براساس SDS-PAGE نیز متفاوت بود. در فراکسیون ML ۶/۵ دو باند و در فراکسیون ML ۱۵ یک باند مشخص گردید.

بحث. تمام روش‌های استخراج قبلی CD59 مبتنی بر لیز غشای اریتروسیت‌ها توسط حلالها بوده و این نقش فیزیولوژیک پروتئین را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. در این تحقیق از منابع پروستازومی موجود در مایعات ژنیتال استفاده گردید تا بدون استفاده از حلالها پروتئین جداسازی شود.

• *واژه‌های کلیدی.* CD59، پروتئین‌های تنظیم کننده چرخهٔ کمپلمان، پلاسمای منی.

مقدمه

سیستم کمپلمان با تشکیل کمپلکس C5b-9 یا کمپلکس حمله‌کننده به غشاء (MAC:Membrane Attack Complex) نقش مهمی در دفاع از بدن علیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند، اما گاهی خود موجب پیدایش بسیاری از عوارض پاتولوژیک در نتیجه فعال شدن مهار نشدهٔ کمپلمان می‌شود(۱، ۲). CD59 یکی از انواع پروتئین‌های تنظیم کنندهٔ کمپلمان (CRP) است. وزن ملکولی آن ۱۸ تا ۲۰ کیلو دالتون است و یک گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوسیتول پروتئین (GPI-Anchor) است(۳) که با سد دو مسیر کلاسیک و آلترناتیو از طریق باندشدن به ملکولهای C8,C9 و بلوک فرایند اضافه شدن ملکولهای فوق به کمپلکس C5b-7، مانع تشکیل (MAC) می‌شود(۴). سلولهای سرطانی با استفاده ازاین خاصیت وبا افزایش بروز CD59 مانع لیز با واسطه کمپلمان می‌شوند(۵، ۶). این پروتئین برای از فعال شدن بدون کنترل کمپلمان باید به‌طور وسیعی بر روی سلولهای مختلف بافتی و در مایعات مختلف بدن حضور داشته باشد (۷، ۸). افزایش حضور این پروتئین بر روی سلولهای عصبی گرفتار آلزایمر و سلولهای مزانکیال گرفتار گلومرونفریت، مؤید افزایش شدت درگیر شدن مکانیزمهای تنظیمی و مدولاسیون سیستم کمپلمان دراین افراد است(۹، ۱۰). در جایی که سلول نتواند به میزان کافی CD59 را بروز دهد، بلافاصله تحت تأثیر اثرات تخریبی کمپلمان از بین می‌رود.

نقش CD59 در امر پیوند عضو و جلوگیری از دفع عضو به صورت فوق حاد نیز مهم می‌باشد و حتی راه را برای پیوند عضو حیوانی هموار کرده را بر روی Xenograft است(۱۱). ساخت حیوانات ترانس ژنیک از گونه خوکچه که با دستکاری ژنتیکی قادر است به مقدار CD59 سلولهای خود بسیار زیاد بروز دهد، به‌دلیل توانایی ذاتی مهار کمپلمان، به‌عنوان یک مدل مناسب در پیوند اعضای حیوانی مطرح شده‌است(۱۲).

علاوه‌براین، وجود مقادیر متنابهی CD59 در دستگاه تناسلی و مایعات مجاری تناسلی زن و مرد مؤید نقش حفاظتی آن در حمایت از سلولهای ژرمینال و همچنین در فرآیند لقاح است (۱۳، ۱۴). براین‌اساس در ایمونولوژی ناباروری استفادهٔ درمانی از این پروتئین در مدل تحقیقی باب در جدیدی را باز نموده است.نقش در CD59 جلوگیری از سقطهای ناشی از فعال شدن کمپلمان، افزایش حرکت اسپرم در حضور ، CD59 محیطهای in vitro و in vivo افزایش نفوذپذیری اسپرم به‌داخل تخمک، بهبود فرآیند لقاح در دستگاه تناسلی زن و جلوگیری از آسیبهای سطح غشاء اسپرماتوزوا به شکل آزواسپرمی و الیگواسپرمی، حکایت از اثرات درمانی

---

* این طرح با شماره ۷۷۰۷۴ در دفتر هماهنگی امور پژوهشی ثبت شده‌است و هزینهٔ آن از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی استان اصفهان پرداخت گردیده‌است.

۱ - گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی استان اصفهان، اصفهان.

www.SID.ir

Archive of SID

احتمالی CD59 در درمان ناباروری دارند(۱۵، ۱۶).

در این مطالعه با توجه به اثرات درمانی وسیعی که CD59 دارد، از دانه‌های پروستازومی موجود در پلاسمای منی انسان که منبعی غنی از ذخایر (CRP) به حساب می‌آیند، پروتئین CD59 جداسازی شد.

روشها

مطابق استانداردهای WHO، ۶ نمونهٔ نرمال از مرکز باروری اصفهان انتخاب شد. پس از انجام تست‌های عملکرد و مورفولوژی، مایع منی در دور ۲۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا پلاسمای منی از اسپرم‌ها جدا شود. سپس جداسازی لایه لایه‌ای پلاسمای منی توسط اولتراسانتریفوژ (مدل Beckman RC-5C) انجام شد. پلاسمای منی ابتدا در دور ۱۴۰۰۰ g به‌مدت ۲۰ دقیقه و سپس سوپ رویی به‌مدت ۱ ساعت در دور ۲۰۰/۰۰۰ g سانتریفوژ شد تا دانه‌های پروستازومی رسوب کنند و در آخر پلیت حاوی پروستازوم‌ها را در یک میلی لیتر PBS تعلیق و برای ژل فیلتراسیون استفاده شد (۱۷).

ژل فیلتراسیون توسط دستگاه FPLC و با استفاده از ستون Superose 6HR از شرکت فارماسیا با حجم ۳۰ ml و فاز متحرک PBS ۰/۳M و Flow Rate ۰/۰۱ انجام شد. فراکسیون‌ها به‌میزان ۰/۵ ml جمع‌آوری و در طول موج ۲۸۰nm طیف سنجی شده‌اند (۱۸). فراکسیون‌های مختلف با OD بالا جمع آوری و در ۷۰- نگهداری شدند.

از تکنیک Dot-Blot برای آشکار ساختن CD59 در فراکسیونهای به‌دست آمده از ستون سپوروز به‌شرح ذیل استفاده شد:

۱ـ آنتی بادی منوکلونال (mAb) موشی علیه CD59(MEM43) از شرکت Serotec Oxford UK.

۲ـ آنتی بادی ضد موش mAb Goat anti-mouse HRP conjugated از شرکت Sigma

۳ـ کاغذ نیترو سلوز، DAB و تمامی معرفهای لازم تکنیک فوق و Western-Blot, SDS-PAGE از شرکت بیوژن – مشهد تهیه گردید.

۱۰ میکرولیتر از فراکسیون‌های جمع آوری شده را برای اثبات حضور CD59 بروی کاغذ نیتروسلولز ریخته و پس از خشک شدن کاغذ را به لولهٔ فالکون ۱۵ml منتقل نمودیم. نمونه‌ها با BSA ۰/۰۱ درصد در PBS/Tween ۰/۰۵ درصد بلوک شدند. سپس با ۱۵ml آنتی بادی اولیه و با رقت ۲ µg/ml و به‌مدت ۱/۵ ساعت تیمار شدند و در مرحلهٔ بعد با ۱۵ml آنتی بادی ثانویه گونژوگه به پروکسیداز به‌مدت ۱ ساعت تیمار شدند. پس از هر مرحله ۳ بار با محلول PBS/Tween ۰/۰۵٪ هر بار بمدت ۵ دقیقه شستشو انجام شد و در نهایت از سوبسترای DAB جهت ایجاد واکنش رنگی به میزان PBS ۱۰mg/۱۰ml حداکثر بمدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

برای تعیین درجه خلوص فراکسیونها از تکنیک SDS-PAGE بر طبق متد Lammeli استفاده شد (۱۹). ژل تفکیک کننده ۱۰ درصد و هماهنگ‌کننده ۵ درصد با روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد.

نمونه‌های رنگ‌آمیزی نشده برای تعیین حضور CD59 به کاغذ نیتروسلولز و سپس به تانک ترانسفر Western Blot به‌مدت یک شب با آمپراژ ۲۰ mA منتقل شدند و پس از اطمینان از حصول انتقال نمونه به کاغذ، نمونه‌ها به لولهٔ فالکون منتقل شدند و مانند پروسهٔ DOT-Blot با آنتی بادیهای اولیه و ثانویه و سپس سوبسترای DAB واکنش رنگی ایجاد شد که معرف حضور CD59 در نمونه فراکسیون‌ها است.

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین در نمونه‌های بدست آمده از اولتراسانتریفوژ و ژل فیلتراسیون از روش برادفورد استفاده شد، از BSA به عنوان استاندارد و جذب نوری در طول موج ۵۹۵nm با اسپکتروفتومتر قرائت شد.

نتایج

روش ما در جداسازی CD59 بر پایهٔ Rooney(۱۹۹۶) بود(۱۱). مایع منی پس از اولتراسانتریفوژ و رسوب دانه‌های پروستازومی در PBS تعلیق شد و برای ژل فیلتراسیون آماده شد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام فراکسیونهای بدست آمده از اولتراسانتریفوژ برابر ۱۵ـ۳۵mg/ml بود.

نتایج ژل فیلتراسیون بر حسب شکل و محل پیک‌ها در ۶ نمونه‌ای که انجام شد، در هر مورد اندکی اختلاف را نشان داد. اما فراکسیون اول در ناحیه ۶/۵ml، فراکسیون دوم در ناحیهٔ ۱۲/۵ml و فراکسیون سوم در ناحیه ۱۵ml بود. یعنی در محل پیکها اندکی تفاوت وجود داشت. به‌طوریکه در اکثر نمونه‌ها پیک دوم در ناحیه ۱۵ml بود (نمودار ۱).

نتایج حاصل از Dot-Blot نشان داد که در ۴ نمونه از فراکسیون‌های فوق فقط فراکسیون اول و دوم و در دو نمونه فراکسیون اول و سوم پاسخ مثبت علیه CD59 نشان دادند. علی رغم اختلاف محل پیک‌ها، جمع‌آوری فراکسیون‌ها بر حسب ناحیه (میلی لیتر) از مزیت بالای برخوردار است. یعنی فراکسیون‌های ناحیه ۱۵ml و ۶/۵ml در تمام نمونه‌ها صرفنظر از محل پیکها (خصوصاً اختلاف محل پیک دوم و سوم) در Dot-Blot پاسخ مثبت علیه CD59 نشان دادند و شدت واکنش رنگی در فراکسیون دوم یا ناحیه ۱۵ml از شدت بیشتری برخوردار بود.

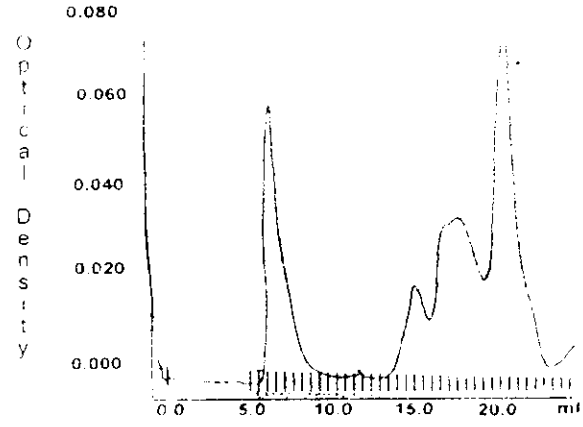
نتایج SDS-PAGE از فراکسیون اول ۲ باند روشن در ناحیه ۵۵kDa و۵۶ و فراکسیون دوم یک باند روشن را در ناحیه ۲۱KDa آشکار ساخت و نتیجه حاصل از فراکسیون دوم باند روشنی را در ناحیه ۲۱KDa نشان داد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام در نمونه‌های فراکسیون CD59 حاصل از ستون سپوروز غلظتی برابر با ۴۰ـ۵۰µg/ml را نشان داد.

بحث

در این مطالعه تخلیص جزئی CD59 به روش جداسازی لایه لایه‌ای پلاسمای منی بوسیله اولتراسانتریفوژ و سپس ژل فیلتراسیون انجام شد. Rooney و همکاران (۱۹۹۶) با جداسازی لایه لایه‌ای پلاسمای منی و رسوب پروستازومها در دور ۲۰۰۰۰۰g نشان داد که CD59 در فراکسیون

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱. نمودار ژل فیلتراسیون مایع منی با استفاده از ستون سپوروز.

ته‌نشین پروستازومی و فراکسیون سوپ رویی فاقد پروستازوم (NPF) هر دو وجود دارد و الگوی فراکسیونی که با استفاده از ستون سپوروز از لایه NPF(Non Prostasome Fractuon) بدست آورد دقیقاً مشابه الگویی بود که ما از فراکسیون پروستازومی بدست آوردیم یعنی در هر دو تحقیق ناحیه ۱۵ml و ۶/۵ml پاسخ مثبت علیه CD59 نشان دادند.

استفاده از فراکسیون پروستازومی برای جداسازی این پروتئین اگرچه با از دست رفتن مقداری CD59 در سوپ رویی است (۱۷)، اما این روش قادر است بدون اضافه کردن هر نوع مادهٔ مهار کننده و یا دترجنت پروستازوم‌ها را که حاوی مقادیر متنابهی از (CRP) هستند برای استفاده از ستون کروماتوگرافی در اختیار بگذارد. فراکسیون‌های اول و دوم که +CD59 بودند، برای ارزیابی درجه خلوص پروتئین‌ها در هر فراکسیون توسط SDS-PAGE آزمون شدند. نتایج سنجش نشان داد که فراکسیون اول خالص نبوده و حداقل ۲ فراکسیون پروتئینی قابل تفکیک به‌وسیله SDS-PAGE را نشان می‌دهد اما فراکسیون دوم نسبتاً خالص بوده و فقط یک باند روشن را در ناحیه ۲۱KDa نشان داد. وزن ۶۵ کیلو دالتونی پروتئین موجود در فراکسیون اول با وزن CD59 همخوانی ندارد، لذا بنظر می‌رسد پروتئین موجود در فراکسیون اول جزو بزرگتری از ساختمان CD59 باشد که بدلیل شباهت ساختمانی با آن (۲۰)، با آنتی بادی منوکلونال علیه آن واکنش متقاطع ایجاد نموده است.

به‌طورکلی هدف از جداسازی پروتئین تهیه شکل نسبتاً خالص پروتئین برای تهیه پروتئین استاندارد در اندازه‌گیری CD59 در مایع منی بود و لذا با توجه به ناخالصی کمتر فراکسیون دوم استفاده از آن پیشنهاد شد.

روش دیگری که بسیاری از محققین برای تخلیص CD59 استفاده کرده‌اند عبارت است از لیز غشای سطحی سلول و استخراج منابع CD59 آن است، این روش اولین بار توسط Sugita استفاده شد. وی این پروتئین را از عصاره غشای اریتروسیت‌های انسانی استخراج کرد و آنرا P18 یا Membrane Attack Complex Inhibitory Factor (MACIF) نام نهاد (۲۱). استخراج پروتئین توسط هولگین با نام Membrane Inhibitor of Reactive Lysis (MIRL) انجام شد(۲۲). سپس توسط اوکادا با نام Membrene Gomologus Restriction Factor 20 (HRF20) انجام شد (۲۳). و در اواخر توسط Meri استخراج و واژگان Protectinas که حکایت از عملکرد پروتئین دارد برای آن پیشنهاد شد (۲۴). Hughes پروتئین فوق را از منابع غشای اریتروسیت‌های موش صحرایی و Van Den Berg از گوسفند و سپس از خوکچهٔ هندی استخراج کردند (۱۸،۲۳،۲۵). استخراج پروتئین از منابع غشایی در تمام روش‌های فوق مبتنی بر روش کلاسیک SDS- PAGE است. مزیت نسبی این روش عدم استفاده از دترجنت‌ها و SDS بود که باعث بر هم زدن ساختمان پروتئین و کاهش فعالیت فیزیولوژیک آن می‌شود (۲۶). این موضوع در ارزیابی فعالیت پروتئین در محیط in vitro بسیار اهمیت دارد، مانند ارزیابی فعالیت مهار کنندگی کمپلکس (MAC) و یا ارزیابی آسیبهای وارد به اسپرماتوزوا به شکل کاهش حرکت و افزایش لیز سلولی با واسطه سیستم کمپلمان.

شاید مناسبترین روش برای تخلیص پروتئین CD59 در حجم کم استفاده از Affinity کروماتوگرافی باشد (۲۷) که در مطالعه حاضر به دلیل در اختیار نبودن میزان کافی از آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD59 از روش فوق صرفنظر گردید.

در پایان ذکر این نکته لازم است که پژوهش حاضر بخشی از تحقیقی است که در آن غلظت پروتئین CD59 در پلاسمای منی انسان در گروههای نرمال و غیر نرمال اندازه‌گیری شده است.

جداسازی CD59 بمنظور تهیه استاندارد برای اندازه‌گیری پروتئین فوق مورد استفاده قرار گرفت. اما فعالیت فیزیولوژیک و اثرات درمانی این پروتئین در محیطهای in vitro و in vivo مورد بررسی قرار نگرفت که پیشنهاد می‌شود در بررسیهای بعدی این مهم انجام شود.

قدردانی و تشکر

از همهٔ همکارانی که به‌نحوی ما را در این تحقیق یاری کردند تقدیر و تشکر می‌نماییم.

مراجع

1- Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP; CD46). Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. J Immunol. 1996;156(11):4415-21.

2- Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. Pharmacol Rev. 1998;50(1):59-87.

3- Zhang HF, Yu J, Chen S, Morgan BP, Abagyan R, Tomlinson S. Identification of the individual residues that determine

www.SID.ir

Archive of SID

human CD59 species selective activity. J Biol Chem. 1999;274(16):10969-74.

4- Rollins SA, Zhao J, Ninomiya H, Sims PJ. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. J Immunol. 1991;146(7):2345-51.

5- Yu J, Caragine T, Chen S, Morgan BP, Frey AB, Tomlinson S. Protection of human breast cancer cells from complement-mediated lysis by expression of heterologous CD59. Clin Exp Immunol. 1999;115(1):13-8.

6- Brasoveanu LI, Fonsatti E, Visintin A, Pavlovic M, Cattarossi I, Colizzi F, Gasparollo A, Coral S, Horejsi V, Altomonte M, Maio M. Melanoma cells constitutively release an anchor-positive soluble form of protectin (sCD59) that retains functional activities in homologous complement-mediated cytotoxicity. J Clin Invest. 1997;100(5):1248-55.

7- Nose M, Katoh M, Okada N, Kyogoku M, Okada H. Tissue distribution of HRF20, a novel factor preventing the membrane attack of homologous complement, and its predominant expression on endothelial cells in vivo. Immunology. 1990;70(2):145-9.

8- Meri S, Waldmann H, Lachmann PJ. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. Lab Invest. 1991;65(5):532-7.

9- Vedeler C, Ulvestad E, Bjorge L, Conti G, Williams K, Mork S, Matre R. The expression of CD59 in normal human nervous tissue.Immunology. 1994;82(4):542-7.

10- Nangaku M, Meek RL, Pippin J, Gordon KL, Morgan BP, Johnson RJ, Couser WG. Transfected CD59 protects mesangial cells from injury induced by antibody and complement. Kidney Int. 1996;50(1):257-66.

11- Morgan BP. Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. Immunol Today. 1995 ;16(6):257-9.

12- Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. Nat Med. 1995;1(9):964-6.

13- Simpson KL, Holmes CH. Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. Immunology. 1994;81(3):452-61.

14- Taylor CT, Johnson PM. Complement-binding proteins are strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes. Mol Hum Reprod. 1996;2(1):52-9.

15- Rooney IA, Oglesby TJ, Atkinson JP. Complement in human reproduction: activation and control. Immunol Res. 1993;12(3):276-94.

16- Kapur DK, Ahuja GK. Immunocytochemistry of male reproductive organs. Arch Androl. 1989;23(3):169-83.

17- Rooney IA, Heuser JE, Atkinson JP. GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells. J Clin Invest. 1996;97(7):1675-86.

18- Hughes TR, Piddlesden SJ, Williams JD, Harrison RA, Morgan BP. Isolation and characterization of a membrane protein from rat erythrocytes which inhibits lysis by the membrane attack complex of rat complement. Biochem J. 1992;284 (Pt 1):169-76.

19- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(259):680-5.

20- Zalman LS. Homologous restriction factor. Curr Top Microbiol Immunol. 1992;178:87-99.

21- Sugita Y, Tobe T, Oda E, Tomita M, Yasukawa K, Yamaji N, Takemoto T, Furuichi K, Takayama M, Yano S. Molecular cloning and characterization of MACIF, an inhibitor of membrane channel formation of complement. J Biochem (Tokyo). 1989;106(4):555-7.

22- Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. J Clin Invest. 1989;84(1):7-17.

23- Okada N, Harada R, Fujita T, Okada H. A novel membrane glycoprotein capable of inhibiting membrane attack by homologous complement. Int Immunol. 1989;1(2):205-8.

24- Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ. Human protectin (CD59), an

www.SID.ir

Archive of SID

18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. Immunology. 1990;71(1):1-9.

25- van den Berg CW, Harrison RA, Morgan BP. A rapid method for the isolation of analogues of human CD59 by preparative SDS-PAGE: application to pig CD59. J Immunol Methods. 1995;179(2):223-31.

26- Rushmere NK, Tomlinson S, Morgan BP. Expression of rat CD59: functional analysis confirms lack of species selectivity and reveals that glycosylation is not required for function. Immunology. 1997;90(4):640-6.

27- Morgan BP. Isolation and characterization of the complement-inhibiting protein CD59 antigen from platelet membranes. Biochem J. 1992;282 (Pt 2):409-13.

www.SID.ir