جداسازی و تعیین برخی ویژگیهای پروتئین MCP (CD46) از پلاسمای منی انسانی

حمید بهرامیان M.Sc.☆♦، محمدحسین نصر اصفهانی Ph.D.★، عباس رضایی Ph.D.★،
محمود هاشمی تبار M.Sc.★، فرزاد عریضی M.Sc.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

★ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و جنین‌شناسی

♦آدرس مکاتبه: اصفهان، صندوق پستی ۱۷۶-۸۱۷۴۴، دانشگاه علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** جداسازی و تعیین برخی ویژگیهای پروتئین کوفاکتور غشایی (Membrane Cofactor Protein) از پلاسمای منی انسانی

* **مواد و روشها:** ٦ نمونه سمن نرمال را انتخاب و پس از جداسازی اسپرمها و ذرات، پلاسمای سمن به‌دست آمده را اولتراسانتریفوژ نموده، پروتئینهای موجود در پروستازومهای حاصل را بدون به‌کارگیری دترجنت و با استفاده از سیستم کروماتوگرافی Fast Performance Liquid Chormatography (FPLC) (ستون Superose 6HR) جداسازی شد. با به‌کارگیری آنتی‌بادی‌مونوکلونال علیه CD46 (J4-48) و با استفاده از تکنیک Dot blot وجود CD46 در سیستم کروماتوگرافی مشخص شد.

* **یافته‌ها:** وزن مولکولی CD46 در فراکسیون اول در موقعیت ٦/٥ میلی‌لیتر با استفاده از تکنیک SDS-PAGE (Sodium Dodesyle Solfate-PAGE) ٥٥ کیلو دالتون تعیین و با روش Western blot حضور آن در باند مشخص شده توسط SDS اثبات شد.

* **نتیجه گیری:** نتایج حاصله از این تحقیق نشان دهندهٔ آن است که نوعی محلول CD46 در مایع منی وجود دارد و باتوجه به اینکه این محلول می‌تواند از فعالیت سیستم کمپلمان جلوگیری نماید، احتمال استفاده از آن در جلوگیری از مرگ اسپرم توسط سیستم کمپلمان وجود دارد. این تحقیق نشان می‌دهد که جداسازی، بدون استفاده از هر گونه دترجنتی که احتمالاً فیزیولوژی پروتئین را تغییر دهد، امکان پذیر است.

گل‌واژگان: جداسازی، FPLC، پلاسمای منی، CD46، MCP

مقدمه

MCP به عنوان یک پروتئین تنظیم کننده در سیستم کمپلمان از تشکیل C_5 و C_3کنورتار جلوگیری می‌کند و با توجه به اسپرم به عنوان یک عامل بیگانه در بدن زن و مرد شناخته می‌شود بنابراین به نظر می‌رسد وجود MCP در بقای اسپرم ضروری است که به دلیل اهمیت نقش این پروتئین در سیستم کمپلمان و به‌خصوص در باروری، هدف این مطالعه جداسازی و تخلیص آن از پلاسمای منی انسان (SP)[1] است.

CD46 یا MCP یک پروتئین داخل غشایی است که به‌عنوان یکی از تنظیم کننده‌های سیستم کمپلمان (CRP_s) شناخته شده است. این پروتئین به عنوان یک عامل مهار کننده از فعالیت کمپلمان از طریق مسیرهای کلاسیک و آلترناتیو محسوب می‌شود (۱) و این عمل را در سطح آنزیم C_3کنورتاز انجام می‌دهد (۲، ۳).

CD46 در غشای اغلب سلولهای انسانی به جز اریتروسیت‌ها وجود دارد (۴، ۵) و بیشترین مقدار بروز آن در دستگاه تناسلی انسان از قبیل اندومتر رحم، اپیتلیوم‌لوله رحم، اووسیت، ترووفوبلاست جفت (۶)، ناحیه اکروزوم اسپرم (۷، ۸)، اپیتلیوم‌زایای بیضه و اپیتلیوم‌غده پروستات (۹) است. این پروتئین به‌صورت محلول در بعضی از مایعات بیولوژیک بدن انسان از قبیل پلاسمای خون، اشک، بزاق و مخصوصاً پلاسمای منی وجود دارد (۱۰، ۱۱، ۱۲).

MCP از لحاظ ساختمانی یک گلیکوپروتئین بوده و دارای بخشهای خارجی غشایی، داخل غشایی و دم سیتوپلاسمی است. بخش خارج غشایی آن با سیستم کمپلمان واکنش نشان می‌دهد. به‌دلیل تفاوت در نوع دم سیتوپلاسمی و مقدار گلیکوزیله بودن بخش خارج غشایی این مولکول چهار ایزوفرم اصلی دارد که معمولاً اغلب سلولها نسبت یکسانی از این چهار ایزوفرم را بروز می‌دهند (۱۳، ۱۴) و باز به‌همین دلیل این مولکول دارای وزن مولکولی متغیری از ۴۰ تا ۶۸ کیلودالتون است (۱۹). MCP در پلاسمای منی اغلب در ارگانهای غشایی به نام پروستازوم وجود داشته که از پروستات به داخل سمن رها شده و دارای وزن مولکولی حدود ۶۰ کیلو دالتون است (۱۵، ۱۶). نقش CD46 در دستگاه تناسلی عبارت است از: ۱- محافظت از آسیب اسپرم در اثر فعال شدن کمپلمان در سیستم تناسلی مرد و زن (۶، ۹)؛ ۲- جلوگیری از پس زدن جفت توسط مادر و در نتیجه محافظت از جفت و جنین (۹، ۱۷)؛ ۳- عملکرد متقابل تخمک و اسپرم (۱۷).

CD46 دارای نقشهای مهمی مانند جلوگیری از پس زدن بافتهای پیوندی به‌صورت بسیار حاد مخصوصاً در Xenoteransplantation (انتقال بافت از حیوان به انسان) (۱۸، ۱۹، ۲۰)، نقش گیرندگی برای ویروس اوریون (Measles) (۲۱، ۲۲) و استرپتوکوکوس پانوژنز گروه A در سلولهای اپی‌تلیال است (۲۳).

با توجه به نقش CD46 و احتمال استفاده آن در درمان ناباروری، هدف این بررسی جداسازی و تخلیص این پروتئین به روش FPLC و بدون استفاده از دترجنت است.

مواد و روشها

از بین افراد مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان، براساس معیارهای W.H.O (۲۴) ۶ نمونه سمن افراد سالم انتخاب شد. منی مایع شده پس از نیم ساعت در دمای اطاق (۷، ۲۵) به منظور جداسازی پلاسمای سمن و اسپرمها، در ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (۹، ۱۷). برای جداسازی ذرات و همچنین پروستازومها، پلاسمای سمن به ترتیب در ۱۰۰۰۰g و ۲۰۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و یک ساعت در دمای ۴° سانتی‌گراد اولتراسانتریفوژ شدند (۲۵).

پس از خارج نمودن مایع رویی با پلاک تشکیل شده در یک میلی‌لیتر از PBS[2] با pH=۷/۲ سوسپانسیون تهیه شد. برای کروماتوگرافی پروتئین‌ها از سیستم FPLC و ستون Superose 6HR (فارماسیا- سوئد) و جذب فراکشنهای جمع‌آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. در این روش از فاز متحرک PBS و سرعت جریان ۰/۳ میلی‌لیتر در دقیقه و فراکشن ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر لوله استفاده شد (۲۵). برای اندازه‌گیری میزان پروتئین در نمونه‌های به‌دست آمده از اولتراسانتریفوژ و ژل فیلتراسیون با روش برادفورد (۲۶) استفاده شد. از BSA[3] به‌عنوان استاندارد و جذب نوری در طول موج ۵۹۵ با اسپکتروفتومتر خوانده شد.

برای اثبات وجود MCP در فراکشنهای حاصل از FPLC، با استفاده از روش Dot blot و به صورت زیر عمل شد؛ پس از آماده سازی کاغذ نیتروسلولز و قرار دادن ۱۰ میکرولیتر از هر فراکشن به ازای هر قطعه کاغذ، با BSA یک درصد عمل بلوکه کردن صورت گرفت. پس از آن سه مرتبه و هر مرتبه با PBS محتوی ۲۰ Tween ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه شستشو انجام شد. سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال (Serotec. Co. UK) (J4-48 CD46, Human Mouse Anti) به مقدار ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت دو ساعت انکوبه و پس از شستشوی مجدد با آنتی بادی ثانویه متصل شده به HRP (Serotec. CO. UK) (Goat Anti Mouse IGg - HPR labeled) به مقدار ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌مدت یک ساعت انکوباسیون صورت گرفت. بعد از چهار مرتبه شستشو با PBS محتوی ۲۰Tween توسط DAB[4] رنگ آمیزی و در پایان آشکار سازی صورت گرفت. در تمام مراحل انجام کار، کاغذ در لوله فالکون قرار داشته و با دستگاه روتیتور چرخانده شد.

برای تعیین میزان تفکیک پروتئین‌ها از یکدیگر و همچنین تعیین وزن مولکولی MCP در فراکنش حاصل از FPLC، از روش SDS-PAGE با حالت غیر احیا[5]، محتوی ۱۰ درصد ژل اکریل‌آمید به روش Laemmli (۲۷) استفاده شد. نیمی از ژل SDS-PAGE برای رنگ آمیزی نیترات نقره و نیم دیگر آن برای روش Western blot (۲۸) تهیه شد و در روش اخیر از تانک ایمونوبلات و شدت جریان

1. Seminal Plasma
2. Phosphate Buffered Saline
3. Bovin Serum Albumin
4. Diamino Benzedine
5. Non-reducing condition SDS-PAGE

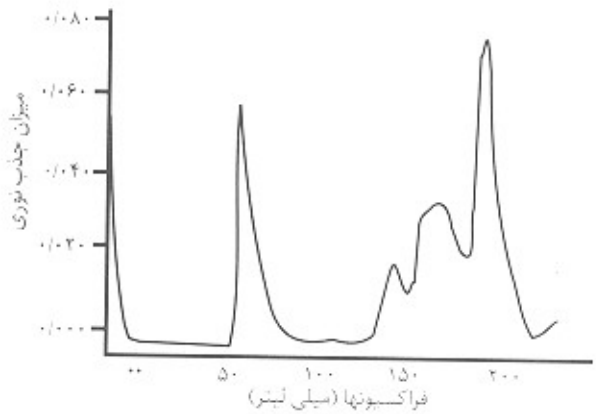
۱۵ آمپر و به مدت ۱۸ ساعت، پروتئین CD46 به کاغذ نیتروسلولز منتقل و همانند روش Dot blot رنگ آمیزی انجام شد.

یافته‌ها

در این روش جداسازی CD46 به روش سانتریفوژ لایه لایه‌ای پلاسمای منی و با استفاده از ستون کروماتوگرافی Superose انجام شد.

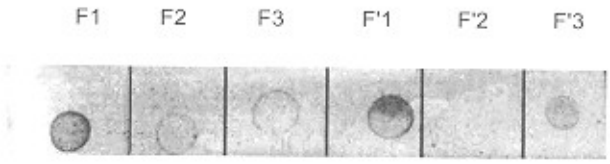
فراکسیونهای به‌دست آمده از اولتراسانتریفوژ، مقدار ۳۵-۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین را نشان دادند.

نتایج FPLC از لحاظ موقعیت پیکها در هر ۶ نمونه‌ای که تکرار شد کمی با یکدیگر اختلاف داشتند ولی از لحاظ الگوی نموداری مشابه بوده و در هر الگو فراکسیونهای به دست آمده به‌ترتیب در موقعیتهای فراکسیون ۶/۵، ۱۵، ۱۸ و ۲۲ میلی‌لیتر قرار داشتند. نمودار ۱ فقط یکی از الگوهای مشخص را نشان می‌دهد.



نمودار ۱: نمودار حاصل از ژل فیلتراسیون مایع منی با استفاده از ستون Superose

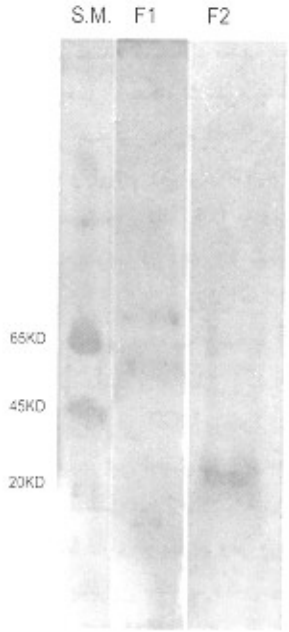
فراکسیون اول (موقعیت ۶/۵ میلی‌لیتر) با روش Dot blot رنگ قهوه‌ای بسیار واضح و مشخصی را نمایان ساخت، در حالی‌که فراکسیونهای دوم و سوم (به‌ترتیب در موقعیت ۱۵ و ۱۸ میلی‌لیتر) رنگ بسیار ضعیفی را بروز داده و فراکسیون چهارم (موقعیت ۲۲ میلی‌لیتر) هیچ واکنشی را نشان ندادکه در شکل نیز مشاهده نمی‌شود (شکل ۲).



شکل ۲: آنالیز فراکسیونهای به‌دست آمده از ستون Superose به روش Dot blot

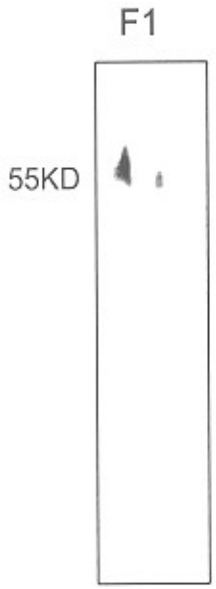
(واکنش سیتوشیمیایی پراکسیداز. F1-F3: نمونه اول، F'1-F'3: نمونه دوم)

نتایج SDS-PAGE از فراکسیون اول (۶/۵) وجود دو باند واضح را با رنگ آمیزی نیترات نقره نشان دادکه بر اساس مقایسه با اندازهٔ پروتئینهای استاندارد با جرم مولکولی معین به ترتیب در موقعیت وزنی ۶۸ و ۵۵ کیلو دالتون قرار داشتند (شکل ۳).



شکل ۳: روش SDS-PAGE نمونه‌های $CD46^+$ و $CD59^+$ از فراکسیونهای ستون Superose (رنگ آمیزی نیترات نقره. SM: اندازه نشانگر، F1: فراکسیون اول، F2: فراکسیون دوم)

در مورد فراکسیون دوم یک باند در ناحیه ۲۰ کیلو دالتون نشان داده شد. با استفاده از روش Western blot، فقط در نمونه فراکسیون اول یک باند روشن در موقعیت ۵۵ کیلودالتون مشاهده شد و سایر فراکسیونها باند واضحی را نشان ندادند (شکل ۴). در نمونه فراکسیون $CD46^+$ بعد از FPLC مقدار ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین تام را نشان داد.



شکل ۴: روش Western blot از نمونه‌های $CD46^+$ به دست آمده از ستون Superose

(واکنش رنگ آمیزی سیتو شیمیایی پراکسیداز)

بحث

پروتئینهای تنظیم کننده کمپلمان، مخصوصاً CD46، در قسمتهای مختلف بدن انسان از قبیل دستگاه تناسلی، عملکرد متقابل تخمک و اسپرم، حفظ جفت و جلوگیری ازسقط و غیره از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. اگر چه وجود پروتئینهای تنظیم کننده سیستم کمپلمان از ابتدای دهه ۸۰ شناخته شده بودند (۲۹) اما وزن و سایر مشخصات آن در طی سالهای بعد مخصوصاً در دهه ۹۰ مشخص شد (۳۰، ۳۱).

فراکشنها و پیکهایی که از روش FPLC با استفاده از ستون Separos 6 در این تحقیق بدست آمده با آنچه که Rooney (۲۵) گزارش کرد، هم‌خوانی داشته و تقریباً از یک الگو تبعیت می‌نماید. اگر چه این محققین وزن مولکولی MCP موجود در سمن را ۶۰ کیلودالتون گزارش کرده بودند اما در این تحقیق وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون برای MCP بدست آمد، که علت این اختلاف به دو دلیل زیر است:

۱) مولکول MCP دارای چهار ایزوفورم اصلی و چندین ایزوفورم فرعی است (۳۱) که بنابراین یک پروتئین پلی‌مورفیسم با وزنهای مولکولی متفاوت از ۴۰ تا ۶۸ کیلودالتون است (۹، ۳۰)؛

۲) اختلاف در استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونالی است که در این تحقیق و تحقیق گروه فوق‌الذکر استفاده شده است، چراکه آنتی‌بادیهای مختلف علیه یک پروتئین خاص به‌دلیل شناسایی ایزوتوپهای مختلف از حساسیتهای متفاوتی نیز برخوردارند.

نتایج Dot blot نشان دهندهٔ وجود MCP در پیکهای اول تا سوم فراکشنهای حاصل از FPLC است. اما همانطورکه در شکل ۲ مشخص شده است شدت رنگ MCP در پیکهای دوم و سوم در مقایسه با پیک اول بسیار ضعیف‌تر است و دلیل آن پلی‌مورفیسم بودن و دامنه وزنی متفاوت مولکول MCP است؛ بنابراین در چندین فراکشن حضور پیدا کرده اما مقادیر آن در فراکشنهای موجود در موقعیت پیکهای دوم و سوم بسیار کم و ناچیز است.

رنگ‌آمیزی نیترات نقره ژل SDS-PAGE، وجود دو پروتئین در پیک اول حاصل از FPLC را نشان می‌دهد که یکی در موقعیت ۶۸ کیلودالتونی و دیگری در موقعیت ۵۵ کیلودالتونی قرار دارد. با استفاده از رنگ‌آمیزی Western blot باندی که در ژل درموقعیت وزنی ۵۵ کیلو دالتونی قرار گرفته رنگ شد که نشان می‌دهد مولکول MCP به‌دست آمده در این تحقیق دارای وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون است. اگر چه روشهای متعددی از قبیل کروماتوگرافی شیب غلظت و FPLC برای تخلیص پروتئینها وجود دارد (۳۲)؛ اما از آنجایی‌که در اغلب این روشها از دترجنتهایی مانند PMSF، Np-40 و بدواستامید استفاده می‌شود و وجود آنها در موارد تخلیص شده استفاده بالینی پروتئینها را محدود می‌نماید لذا روشی که در این تحقیق ارائه شده می‌تواند از چند جنبه دارای اهمیت باشد:

۱) به‌دلیل عدم استفاده از هرگونه دترجنت، استفاده از این شکل تخلیصی پروتئین در فعالیت فیزیولوژیک آن اختلالی ایجاد نکرده و در نتیجه کارآیی پروتئین کاهش پیدا نمی‌کند؛

۲) روشی بسیار ساده است که از اتلاف وقت و هزینه‌ها جلوگیری می‌نماید. علت عدم استفاده از دترجنت دراین مطالعه تخلیص شکل محلول MCP در مایع منی است.

با توجه به اینکه تهیه آنتی بادی از خارج کشور هزینه‌های زیادی را در بر دارد، اگر بتوان آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پروتئین MCP را با امکانات موجود در داخل کشور فراهم نمود، در آن صورت با توجه به واکنشهای متعدد این پروتئین و نوپا بودن تحقیق در این زمینه شاید بتوان تحقیقات ارزنده‌ای را برای حل برخی معضلات کلینیکی ارائه نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از طرح مصوب شماره ۶۲۷۹ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که بخشی از آن در مرکز باروری و ناباروری اصفهان و بخش دیگر آن در گروه ایمنی شناسی این دانشگاه انجام شد که بدین وسیله از کلیه همکاران این مراکز قدر دانی می‌نماییم.

References

1. Lublin DM, Atkinson JP: De cay acceleration factor and memberane cofactor protein. Curr Top Microbiol Immunol 1990; 153: 123-145

2. Oglesby TJ, Alen CJ, Liszewski MK, White DG, Atkinson JP: Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement mediated attack by an intrinsic mecanism. J Exp Med 1992; 175(6): 1547-1551

3. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervohi F, Wild TF, Rossi B, Rabaurdin-Combe C, Gerlier D: Human membrane Cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. J Vival 1993; 67: 6025

4. Seya T, Hiran A, Matsumoto M, Nomara M, Ueda S: Human membrane cofactor protein (MCP,CD46): multiple isoforms and functions. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31(11): 1255-1260

5. Hourcade D, Holers VM, Atkinson JP: The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. Adv Immunol 1989; 45: 381-416

6. Perricone R, Pasetto N, De-Corolis C, Vaquero E, Baschieri L, Picciane E, Fontana L: Functionally active complement is present in human ovarian follicular fluid and can be activated by seminal plasma. Clin Exp Immunol 1992; 89: 154-157

7. Simpson KL, Holmes CH: Differential expression of complement regulatory proteins, CD55, CD46 and CD59 during human spermatogenesis. Immunology 1994; 81: 452-461

8. Fenichel P, Dohr G, Grivaus C, Cervoni F, Donzeau M, Hsi BL: Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human

spermatozoa. Mol Reprod Dev 1990; 27: 176-178
9. Cervoni F, Oglesby TY, Adams EM, Milesifluet C, Nickells M, Fenichel P, Atkinson JP, Hsi BL: Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. J Immunology 1992; 148: 1431-1437
10. Hare T, Kuriyama S, Kiyohara H, Nagosa Y, Matsumoto M, Seya T: Soluble forms of membrane cofactor protein (CD46 MCP) are present in plasma, tears, and seminal flaid in normal subjects. Clin Exp Immunol 1992; 89: 490-494
11. Mclaughlin PJ, Holland SJ, Taylor CT, Olah KS, Lewis-Jones DF, Hara T, Seya T, Johnson PM: Soluble CD46 (Membran Cofactor protein) in human reproductive tract fluids. J Repord Immunol 1996; 31: 209-211
12. Seya T, Hara T, Iwata K, Kuriyama S, Hasegawa T, Nagase Y, Miyagawa S, Masomoto M, Hatanawa M, Atkinson JP: Purification and fuyctional properties of soluble forms of membrane cofactor protein (CD46) of complement: Identification of forms increased in cancer patient´s sera. Int Immunol 1994; 7: 727-736
13. Post TV, Liszewski MK, Adams EM, Tedji I, Miller E, Atkinson JP: Membrane cofactor protein of the complement system: alterntive splicing of serinel threninel proline-rich exons and cutoplasmic tails produces mulitiple isoforms the correlate which protein phenotipe. J Exp Med 1991; 174: 93-102
14. Russel SM, Sparrow RL, Mekehzie IF, Purcell BT: Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alltrolled by allternative splicing. Eur J Immunol 1992; 22: 1531-1538
15. Rooney IA, Atkinson JP, Krul ES, Schonfeld G, Polokoski K, Saffitz JE, Morgan BP: Phisiologic relevance of the membrane attaclr compplex in hibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extravellutor organeles (prostasomes) bind cell membrance and inhibits complement mediated lysis. J Exp Med 1993; 177: 1409-1420
16. Simpson KL, Holmes CH: Presence of the complement regulatory protein membrane cofactor protein (MCP,CD46) as a membrane associated product in seminal plasma. J Repord Fertil 1994; 102(2): 419-424
17 Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM: The role of complement C3b and its receptor in sperm-oocyte intraction. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10051-10055
18. Begum NA, Murakami Y, Mikata S, Matsumoto M, Hatanaka M, Nagasawa S, Kinoshita T, Seya T: Molecular remodeling of human CD46 for xentransplant ation: designing a potent complement regulator without measles virus receptor activity. Immunology 2000; 100(1): 131-139
19. Cozzi F, White DJ: The generation of transgenic pigs as potential organ jonors for human. Nat Med 1995; 1: 964-966
20. Ryan US: Complement inhibytory theraputics and xenotransplantation. Nat Med 1995; 1: 967-968
21. Seya T, Nomura M, Muurakami Y, Begum NA, Matsomoto M, Nagasawa S: CD46 (Membrane cofactor protein of complement, measles virus receptor): stuctular and functional duvergence among spesimens (review). Int J Mol Med 1998; 1(5): 809-816
22. HsU EC, Sabatinos S, Hoedemaeker FJ, Rose RD, Richardson CD: Use of site-specific mutagenetis and monoclonal antibadies to map regions of CD46 that interact with measles virus H protein. Virology 1999; 258(2): 314-326
23. Wang G, Liszewski MK, Chan AC, Atkinson JP: Membrane cofactor protein (MCP;CD46): Isoforms-specific tyrosine phosphorylation. J Immunol 2000; 164: 1839-1846
24. WHO: WHO labratory manual for the examination of human semen, sperm-cervical mucous interaction. 3ed, WHO, Cambridge university press, 1992, pp 43-70
25. Rooney I, He er-Je, Atkinson JP: GPI-anchored complemend regulatory proteins in seminal plasma. J Clin Invest 1996; 67: 1675-1675-1686
26. Hudson L, Hay F: Practical Immonology. 3ed Blackwell scientific publication, 1989, Vol(2) 342-385
27. Colgan J: Current protocols in Immunology. 2ed, Pulished by current protocols, 1994, Vol(20), pp 936-942
28. Johnstone A, Thorpe R: Immunochemistry in practice. 3ed, Blackwell science, 1996, pp 211-233
29. Hansch MG, Hammer CH, Vanguri P, Shin MJ: Homologous species restriction in lysis of erythrocytes by terminal complement proteins. Proc Natal Acad Sci USA 1981; 78: 5118-5121
30. Ballard L, Boro NS, Yu GH, Atkinson JP: Biochemical characterization of membrane cofactore protein of the complement system. J Immunol 1988; 141: 3923-3929
31. Liszewski MK, Atkinson JP: Membrane cofactor

protein (MCp,CD46) Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. J Immunol 1996; 156: 4415-4421

32. Cells JE: Cell Biology. 2ed, Academic press, 1998, Vol(4), pp 295-325