



**HASTALIK BELİRTECİ BİR PROTEİNE
KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR
GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU: MODEL ÇALIŞMA**

İlham BAHAR

**Yüksek Lisans
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Sezen ARAT
II. Danışman: Dr. Esin AKÇAEL
2018**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

**HASTALIK BELİRTECİ BİR PROTEİNE KARŞI MONOKLONAL
ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU: MODEL
ÇALIŞMA**

İlham BAHAR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Sezen ARAT

II. DANIŞMAN: Dr. Esin AKÇAEL

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır



Bu çalışma, TÜBİTAK' ın 115S124 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Sezen ARAT danışmanlığında, İlham BAHHAR tarafından hazırlanan “Hastalık Belirteci Bir Proteine Karşı Monoklonal Antikor Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu: Model Çalışma” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sezen ARAT (Danışman)

İmza:

Üye: Prof.Dr. Nesrin ÖZÖREN

İmza:

Üye: Doç.Dr. Rıfat BİRCAN

İmza:

Üye: Doç. Dr.Fulya ÖZDİL

İmza:

Üye: Dr. Esin AKÇAEL (II.Danışman)

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans

HASTALIK BELİRTECİ BİR PROTEİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU: MODEL ÇALIŞMA

İlham BAHHAR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

II. Danışman: Dr. Esin AKÇAEL

Sunulan bu tez çalışmasının amacı model olarak seçilen bir hastalık belirteci proteine karşı yüksek afiniteli monoklonal antikor geliştirilmesi, antikorun geniş ölçekte üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonudur. Bu amaçla kistik fibrozisde hastalık belirteci olan PAP (Pankreatit ile İlişkili Protein)'a karşı monoklonal antikor geliştirmek amacıyla 6/8 haftalık toplam 10 fare intraperitoneal enjeksiyon ile immunize edilmiştir. ELISA testi ile bağışıklık yanıtları belirlenen farelerin dalak hücreleri ile myeloma hücrelerinin hibridizasyonu yapılmış, elde edilmiş antikorların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 10 fareden 3'ünde diğerlerine göre daha yüksek immun yanıt olduğu belirlenmiş, bunlardan biri ile yapılan füzyon çalışması sonucu antikor aktivitesine sahip 32 hibrit klon elde edilmiştir. Tekrarlanan ELISA kontrol çalışmalarında antikor aktivitesine sahip hücrelerin %25'i PAP antijenine karşı spesifik antikor yanıtı vermiş ve bunlarında %50'si bu yanıtı sürdürmüştür. Sonuç olarak bu hücrelerden 4 hybridoma hücresinin daha sonra tanı kiti geliştirmek amacıyla kullanılacak yüksek duyarlılıkta monoklonal antikor ürettiği belirlenmiştir. Elde edilen antikorlar özgüllük, afinite, altizotip olarak değerlendirilmiş 4 antikorun her birinin özgül olduğu iki antikorun afinitesinin daha yüksek olduğu görülmüş ve elde edilen 4 antikor da saflaştırılmıştır. Bu tez çalışması gelecekte hayvan hastalıklarının tanısı veya daha başka sebeplerle farklı proteinlerin tespitine yönelik antikorların üretim çalışmaları için önemli bir kaynak oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Monoklonal Antikor, Hibridoma Teknolojisi, Tanı, PAP

2018, 98 Sayfa

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT and CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST A DISEASE MARKER PROTEIN

ILHAM BAHAR

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sezen ARAT

Co-Supervisor: Dr. Esin AKÇAEL

In this study, the production of monoclonal antibody against a disease marker selected as a targeted model, the characterization, large-scale production and purification of the produced antibodies are intended to work. For this purpose, Pancreatitis - associated protein which is a Cystic fibrosis marker used as an antigen were intraperitoneally injected to 6-8 weeks old 10 Balb/C mice at specific doses and time intervals. The antibody titers of mice were determined by indirect ELISA, and the best immune response in mice was selected for the fusion. The fusion was carried out using the mouse spleen cell and the F₀ myeloma cells in the presence of polyethylene glycol (PEG). A higher immunoreactivity was detected in 3 of 10 mice used in the study. Fusion study with one of these resulted 32 hybrid clones with antibody activity. In repeated ELISA control studies, 25% of the cells with antibody activity gave a specific antibody response to the PAP antigen and 50% of them maintained this response. As a result, it has been determined that four hybridoma cells from these cells produce monoclonal antibody with high sensitivity which can be used later to develop a diagnostic kit. The obtained monoclonal antibodies were found to have a high specificity, the immunoglobulin type and the light chain type of the obtained monoclonal antibodies were determined as IgG1 and κ (kappa), respectively. Monoclonal antibodies were characterized in terms of their affinities and 2 of the fourth antibodies were found to have a high affinity. This thesis study will be an important source for future studies of the production and characterization of antibodies for the detection of animal diseases or detection of proteins for different purposes.

Key words: Monoclonal Antibody, Hybridoma Technology, Diagnosis, PAP

2018, 98 Pages

TEŞEKKÜR

Gerek lisans gerek yüksek lisans eğitimim sürecinde bana rehberlik eden ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren hayata bakışımı temelde etkileyen değerli hocam Prof. Dr. Sezen ARAT'a, yaklaşık iki yıldır aralarında bulunduğum, bir aile sıcaklığı ile bana kucak açan bilimsel anlamda gelişmeye yardımcı olan ve tüm laboratuvar çalışmalarında destek, emek ve bilgilerini esirgemeyen başta eş danışman hocam Dr. Esin AKÇAEL olmak üzere hem hoca hemde bir anne şefkatini bana hissettiren Doç. Dr. Fatıma YÜCEL hocama, aynı zamanda Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Tanı Teknoloji Laboratuvarlarında benden yardım ve bilgilerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Özlem ERTEKİN, MSc Şerife Şeyda PİRİNÇÇİ, MSc Sevecen Tuğlu Gürpınar'a, özellikle tez hazırlama safhasında bana her türlü yardımda bulunan MSc Meryem IŞIK ve MSc İlkay Gökse POLAT'a, kader arkadaşlarım Bengü ERGENOĞLU ve Mustafa DİVYAPICIGİL'e, ve son olarak laboratuvarımızın eli kolu herşeyi Harun KOCAAĞA'ya ve Şakir SEKMEN'e sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım. Hepinize herşey için çok teşekkür ediyorum. Saygılarımla.

Mayıs 2018

İlham BAHAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Bağışıklık Sistemi.....	4
2.2 Antijenler ve Genel Özellikleri	6
2.2.1 Yabancılık.....	7
2.2.2 Molekül büyüklüğü	7
2.2.3 Molekülün yapısal sertliğı	8
2.2.4 Çözünebilirlik ve metabolize edilebilme	8
2.2.5 Emilim ve atılım hızı	8
2.2.6 Elektrik yükü	8
2.2.7 Antijen miktarı (dozu)	8
2.2.8 Antijenin organizmaya giriş veya veriliş yolu.....	9
2.3 Antikor Yapıları ve Özellikleri.....	9
2.4 Antijen-Antikor Etkileşimleri.....	14
2.5 Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar.....	16
2.6 Hibridoma Teknolojisi İle Monoklonal Antikor Üretimi	17
2.6.1 Kullanılan hayvan ve özellikleri.....	19
2.6.2 Bağışıklama	20
2.6.3 Bağışıklık yanıt kontrolü	22
2.6.4 Hibridizasyon/melezleme (hücre füzyonu)	24
2.6.5 Hibridomaların geniş ölçekte üretimi	25
2.7 Monoklonal Antikorum Karakterizasyonu	26
2.7.1 İzotip ve alt izotip	26

2.7.2 Çapraz reaksiyon	26
2.7.3 Afinite ve avidite	27
2.7.4 Antikor titrasyonu.....	28
2.8 Antikorların Saflaştırılması	29
2.8.1 Protein A özellikleri ve IgG bağlama özellikleri.....	29
2.9 Antikorların Tanı Alanında Kullanımı ve Önemi	30
2.9.1 Aglutinasyon ve hemaglutinasyon testleri.....	32
2.9.2 Presipitasyon testleri.....	32
2.9.3 İşaretlenmiş antijen ve antikorlarla yapılan testler	32
2.9.4 Antikor temelli protein array	33
2.10 Pankreatit ile İlişkili Protein (PAP).....	36
2.10.1 PAP'ın tarihçesi.....	36
2.10.2 PAP'ın moleküler yapısı.....	37
2.10.3 PAP'ın ekspresyonu	36
2.10.4 Hastalık belirteci olarak PAP	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	42
3.1 Materyal.....	42
3.1.1 Hücre hatları ve canlı materyaller	42
3.1.2 kullanılan kimyasal malzemeler	43
3.1.3 Kullanılan cihazlar ve diğer malzemeler	45
3.1.4 Kullanılan solüsyonlar ve tamponlar	47
3.2 Yöntemler	49
3.2.1 SDS-PAGE ve Western Blotlama	49
3.2.2 Bağışıklama	52
3.2.3 Myeloma hücrelerinin hazırlanması	52
3.2.4 Besleyici hücrelerinin hazırlanması	52
3.2.5 Bağışıklanmış B hücrelerinin hazırlanması.....	52
3.2.6 Myeloma ve bağışıklanmış dalak hücrelerinin birleştirilmesi (Füzyon).....	52
3.2.7 Hibridoma hücrelerinin seçimi ve klonlama	52
3.2.8 Monoklonal antikorların karakterizasyon çalışmaları	52
3.2.9 Monoklonal antikorların saflaştırılması.....	58
3.2.10 Antikorların liyofilizasyonu ve ekstinksiyon katsayılarının hesaplanması	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	62

4.1 İmmünizasyonda Kullanılan PAP Antijen Yapısının İncelenmesi.....	62
4.2 Antijen Kaplama Miktar Optimizasyonu	62
4.3 Fare İmmünizasyon Sonuçları	64
4.4 Füzyon Sonuçları.....	65
4.4.1 Hibridomaların ELISA ile Seçimi	67
4.4.2 Alt klonlanma işlemi	69
4.4.3 Hibrit hücrelerin geniş ölçekte üretimi	69
4.5 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu	69
4.5.1 Çapraz reaksiyonların belirlenmesi	69
4.5.2 Antikor izotipinin belirlenmesi.....	71
4.5.3 Antikor afinitesinin belirlenmesi	71
4.6 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Saflaştırılması.....	74
4.6.1 Antikorların ekstinksiyon katsayıları.....	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
6. KAYNAKLAR.....	85

ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1 : Farelerin çeşitli antijenler ile bağışıklanma yöntemleri	20
Çizelge 3. 1 : Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	43
Çizelge 3. 2 : Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar.....	45
Çizelge 3. 3 : SDS-PAGE için kullanılan solüsyon miktarları.....	49
Çizelge 3. 4 : İmmünizasyonda kullanılan farelerin işaretleme şekilleri	53
Çizelge 3. 5 : Çapraz reaksiyon belirleme için dolaylı ELISA deney düzeneği	56
Çizelge 4. 1 : Farelere uygulanan PAP antijeninin immünizasyon programı ve içerikleri	63
Çizelge 4. 2 : Füzyonda kullanılan hücre sayısı ve füzyon sonrası elde edilen hibrit hücre sayıları	68
Çizelge 4. 3 : Geliştirilmiş antikörlerin ekstinksiyon katsayıları (ϵ %0,1) ve mg/ml deki konsantrasyonları	80

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1 : B hücrelerinin klonal seçimi (Anonim 2018).....	5
Şekil 2. 2 : Primer ve sekonder bağışıklık yanıtı (Abbas ve Litchman 2007).....	6
Şekil 2. 3 : IgG antikor moleküler yapısı (Janeway 2001)	10
Şekil 2. 4 : İmmüoglobulinlerin izotipleri (Schroeder ve Cavacini 2010)	13
Şekil 2. 5 : Antijen-antikor birleşmesini oluşturan bağlar (Anonim 2015).....	15
Şekil 2. 6 : Epitop (Antijen) ile Paratop (antikor) arasındaki özgül bağlanma (Anonim 2008)	15
Şekil 2. 7 : Monoklonal ve Poliklonal antikorların özellikleri	16
Şekil 2. 8 : HAT seçici ortam kullanımı ile hücre seleksiyonu	19
Şekil 2. 9 : Hibridoma teknolojisi ile antikor üretiminin şematik gösterimi	20
Şekil 2.10 : Farklı ELISA sistemlerinin çalışma prensipleri	23
Şekil 2.11 : Füzyon oluşum başlangıcı (siyah ok ile işaretli) ve oluşmuş hibrit hücrelerin (kırmızı ok ile işaretli) mikroskopik görüntüleri (Pelsue 2018)	24
Şekil 2.12 : Protein A veya Protein G afinite kromatografi kolonları ile antikor saflaştırma basamakları	30
Şekil 2.13 : Farklı C-tipi lektinlerde protein domainlerinin şematik gösterimi (Closa ve ark. 2007).....	37
Şekil 2.14 : PAP'ın sentezlendiği Langerhans adacığı (Anonim 2003).....	39
Şekil 2.15 : PAP tarafından aktive edilen anti-inflamatuar yolak (Closa ve ark. 2007)	40
Şekil 3.1 : Çalışmada kullanılan Balb/C fareleri (TÜBİTAK MAM GMBE).....	41
Şekil 3.2 : F0 myeloma hücrelerinin 4X mikroskopik görüntüsü	54
Şekil 3.3 : Anti PAP antikorları ile yapılmış yarışımlı ELISA şeması.....	57
Şekil 4.1 : Ticari PAP antijeninin jel gümüş boyama ve immünoyoblotlama görüntüleri.....	60
Şekil 4.2 : Farklı konsantrasyonlardaki PAP (25ng, 50ng,75ng ve 100ng) Anti-PAP poliklonal antikor (Serum) ile verdiği bağlanma etkinliği.....	61
Şekil 4.3 : Farklı konsantrasyonlardaki PAP antijeninin (20ng, 50ng, 100ng) 50 ve 100ng anti-PAP monoklonal antikor ile verdiği bağlanma etkinliği.....	62

Şekil 4.4 : PAP ile immünize edilmiş iki grup farenin 1.immünizasyon sonrası antikor yanıt kontrolü.....	63
Şekil 4.5 : 25µg/fare PAP ile immünize edilmiş birinci grup farelerinin devam eden immünizasyonlar sonrası verdikleri antikor cevapları.....	64
Şekil 4.6 : 50µg/fare PAP ile immünize edilmiş ikinci grup farelerinin devam eden immünizasyonlar sonrası verdikleri antikor cevapları.....	64
Şekil 4.7 : Füzyonun 10.gününde tespit edilen hibrit hücrelerin mikroskopik görüntüleri....	66
Şekil 4.8 : 14D8, 8H10, 1E9 VE 9B7 hibridoma hücrelerinin indirekt ELISA sisteminde 1. ve 2. Tarama sonucunda verdiği antikor cevapları.....	68
Şekil 4.9 : Üretilmiş monoklonal antikorların PAP antijenine olan özgüllüğünü gösteren grafik.....	70
Şekil 4.10 : Üretilmiş monoklonal antikorlar ile insan Reg3G ve fare Reg3A proteinlerinin etkileşim çapraz ELISA grafiği.....	71
Şekil 4.11 : Anti-PAP monoklonal antikorların strip kit ile izotip ve alt izotiplerinin belirlenmesi.....	72
Şekil 4.12 : Anti PAP monoklonal antikorların izotip ve alt izotiplerinin ELISA test ile belirlenmesi.....	72
Şekil 4.13 : Anti-PAP antikorlarının PAP'la ön inkübasyonlu yarışım ELISA sonuçları.....	73
Şekil 4.14 : Anti-PAP 9B7 Monoklonal antikorunun Protein A kolonunda fosfat tamponunu kullanılarak elde edilen saflaştırma sonuçları.....	74
Şekil 4.15 : Anti-PAP 9B7 Monoklonal antikorunun Protein A kolonunda saflaştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)	75
Şekil 4.16 : Anti-PAP 14D8 monoklonal antikorunun Protein A kolonunda saflaştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)	76
Şekil 4.17 : Anti-PAP 8H10 monoklonal antikorunun Protein A kolonunda saflaştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)	76
Şekil 4.18 : Anti-PAP 1E9 monoklonal antikorunun Protein A kolonunda saflaştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)	77
Şekil 4.19 : 9B7 ve 14D8 antikorlarının hesaplanan sönümlenme katsayıları.....	78

SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
AP	: Alkale Fosfataz
APS	: Amonyum Per Sülfat
Balb/c	: Bagg's Albino
BCIP/NBT	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium
BSA	: Bovine serum albumin
CBPP	: Contagious Bovine Pleuropneumonia
CEA	: Carcinoembryonic antigen
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CTLD	: C-type lectin-like domains
Da	: Dalton
dH ₂ O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
EC	: Extinction Coefficient
EIA	: Enzyme İmmunoassay
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	: Fragment antigen binding
FACS	: Fluorescence-activated cell sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum
Fc	: Fragment crystallizable
FCS	: Fetal Calf Serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FMD	: Foot-and-mouth disease
γ	: Gamma
GHRH	: Growth hormone-releasing hormone
GMBE	: Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
H ₂ O	: Su
HAT	: Hipoksantin, Aminopterin, Timidin
HCl	: Hidroklorik asit

HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HGPRT	: Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz
HIP	: Hepatocarcinoma-intestine-pancreas
HT	: Hipoksantin, Timidin
Ig	: İmmunoglobulin
IgA	: İmmünoglobulin A
IgD	: İmmünoglobulin D
IgE	: İmmünoglobulin E
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
IRT2	: Immün Reaktif Tripsinojen- 2
IBD	: Inflammatory bowel disease
IHC	: Immunohistochemistry
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum fosfat
kDa	: Kilo Dalton
KF	: Kistik Fibrozis
KLH	: keyhole limpet hemocyanin
KOH	: Potasyum hidroksit
LFT	: Lateral flow test
M	: Molar
mAbs	: Monoklonal antikorlar
MAM	: Marmara Araştırma Merkezi
Mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MHC	: Major Histocompatibility Complex
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MW	: Molecular Weight
NaBH ₄	: Sodyum borhidrür
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
NaO ₄	: Sodium periodate
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCDS	: Noncommunicable diseases
ng	: Nanogram

nm	: Nanometre
OD	: Optical Density
OIE	: World Organisation for Animal Health
OVA	: Ovalbumin
PAP	: Pancreatitis Associated Protein
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PEG	: Polietilen glikol
PNNP	: Para-Nitrofenilfosfat
PVDF	: Polyvinylidene fluoride
RIA	: Radio Immuno Assay
RNA	: Ribo Nükleik asit
SDS- PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SNTP	: short N-terminal peptide
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TBS	: Tris Buffered Saline
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TMV	: Tobacco mosaic virus
TOMV	: Tomato mosaic virus
TSH	: Tiroid Uyarıcı Hormon
UV	: Ultra Viyole
Z _n Cl ₂	: Çinko Klorür
α	: alfa
β	: Beta
γ	: gamma
δ	: delta
ε	: Epsilon
κ	: Kappa
Λ	: Lambda
M	: Mü
Mg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre

1.GİRİŞ

Günümüz dünyasında bilinen anlamdaki antikörlerin yapı ve fonksiyonlarına dair bilgiler ancak 1950'lerden sonra belirginleşmeye başlamıştır. Bu tarihten günümüze kadar edinilen bilgiler değerlendirildiğinde genel olarak antikörler, hümmoral immünitinin en etkili bileşenleri olarak bilinmektedir. Antikörler, bağışıklık sisteminde enfeksiyon etmeni ajanlara bağlanıp yok edilmesini sağlayan glikoproteinlerdir. Organizmada yabancı moleküllere karşı gelişen reaksiyonun en önemli unsurları olan monoklonal antikörler, tek bir B hücre klonundan sentezlenebilen, antijenin belirli bir bölgesine spesifik olarak bağlanma özelliği gösteren tek tip immünglobulin yapısındaki moleküllerdir. Antikörler ile antijen arasındaki yüksek özgünlükteki bağlanma isteği, bu molekülleri tanı teknolojisi uygulamalarında kullanılabilir kılmaktadır (Smith 2012, Siddiqui 2010, Leow ve ark. 2017).

Hibridoma teknolojisi 1975'te Kohler ve Milstein tarafından geliştirildiğinden bu yana hala monoklonal antikörlerin elde edilmesinde bilimsel standart olarak görülmektedir. Yapılan bu somatik hücre füzyonu çalışması bir devrim niteliği taşımaktadır. Her ne kadar kısaca "antikör üretme yeteneği olmayan sınırsız ömürlü myeloma hücreleri ile antikör üretme yeteneği olan kısa ömürlü B-lenfosit hücrelerinin birleştirilmesi" olarak açıklansa da özünde akıllıca tasarlanmış deneysel bir metot yatmaktadır (Pandey 2010).

Hayvansal biyoteknolojinin en önemli temel yöntemlerinden biri haline gelen Hibridoma teknolojisi ile geliştirilen monoklonal antikörler, hastalıkların ortaya çıkarılması ve daha iyi anlaşılmasında, yeni deneysel tasarımların yapılabilmesi ve inovatif sonuçların elde edilmesinde büyük katkı sağlamıştır (McCullogh 1993, Deb ve ark. 2013). Aynı zamanda hastalığa neden olan ajanı (bakteri, virus vb) veya hastalık biyobelirteci olan proteini özgün olarak tanıyabilen monoklonal antikörler sayesinde, erken teşhis yapılabilmekte ve böylece tedaviye başlanılabilmektedir. Monoklonal antikörlerin homojenliği, tekrarlanabilirliği ve sürekliliği gibi özellikleri, hızla gelişen bu alanda büyük bir ilgi ve araştırma isteğinin oluşmasının temel nedenlerindedir (Liu 2014).

Hastalıklar sebebiyle hayvancılıkta ve tarımda verim düşüklüğünün önüne geçilmesi adına bu hastalıkların teşhisinde monoklonal antikörlerin kullanılması hem saha hem de laboratuarlarda tanı analizlerinin yapılmasını olanak sağlayarak hastalık kontrolü programını güçlendirmektedir (Deb ve ark. 2013). Hayvansal hastalıkların tedavisi ve önlenmesi

amacıyla aşıların hazırlanmasında monoklonal antikorlar (mAbs) yaygın olarak kullanılmaktadır (Srikumaran ve ark.1990, Hamel ve Brodeur 1990)

MAB'ler aynı zamanda gıdada, suda ve toprakta bulunabilen insan sağlığını tehdit eden çeşitli ajanların tespit edilmesinde etkin ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Önemli zararlara neden olan özellikle geleneksel gıdalarda yüksek miktarlarda bulunabilen aflatoksinin tespit edilmesinde mAb temelli çeşitli tanı sistemleri bulunmaktadır (Wacoo ve ark. 2014, Chadseesuwana ve ark. 2016). Bunun yanı sıra su ve toprakta bulunabilen ve insan ölümüne yol açabilen Bacillus Anthracis'in teşhisinde monoklonal antikorlardan yararlanılmaktadır (Morel ve ark.2012, Waller ve ark. 2016).

Monoklonal antikorlar; insan sağlığını tehdit eden ve ölümcül olabilen enfeksiyon ve genetik hastalıkların tedavi ve tanı sistemlerinde kullanılan önemli araçlardır. Bu hastalıklardan biri olan Kistik Fibrozis (KF) tanısına yönelik Pankreatitle ilişkili protein (PAP)'a karşı antikor üretimi, günümüz araştırmalarından önemli biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Pankreatitle ilişkili protein (PAP), sağlıklı pankreas tarafından salgılanmayan fakat patolojik durumlarda salgısı görülen 18.4 kDa molekül ağırlığında bir proteindir (Closa ve ark. 2007). PAP serum seviyeleri pankreatitin biyolojik markeri olarak kullanılabilir (Iovanna ve ark. 1994, Sarles ve ark. 1999). Yapılan birçok araştırmada PAP'ın, yenidoğanlarda Kistik Fibrozis (KF) hastalığının erken teşhisinde belirleyici ajan olarak kullanılabilen önemli bir protein olduğu gösterilmiştir (Sarles ve ark. 1999, 2005, Sommerburg ve ark. 2010). KF'in erken tanısının sağlayacağı klinik ve ekonomik faydalar, KF yenidoğan taramasında etkili stratejilerin gerekliliğini ortaya koymaktadır (Sims ve ark. 2007, Cutting 2015). 1979 yılından beri hassas belirteç olarak kullanılan immünoreaktif tripsinojen (IRT)'nin Kistik Fibrozisli yeni doğanlardaki düzeyleri genel olarak yüksektir fakat yenidoğan bebeklerde yüksek oranda yalancı pozitif test sonuçlarının varlığı nedeniyle pozitif sonuçları doğrulayıcı testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Weidler ve ark. 2016). İnflamatuar pankreatik süreçlerde yüksek seviyelere ulaşan ek bir biyokimyasal belirteç olan pankreatit ile ilişkili protein miktarının nicelendirilmesi ile IRT'nin sınırlı özgüllüğünün kısmen hafiflemesi sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, temel prensibi hedef bir antijeni (mikroorganizma, protein, toksin vb) tespit etmeye dayalı çeşitli monoklonal antikorlar geliştirilmesi olan hibridoma teknolojisi kullanılarak yüksek afinite, büyük ölçekte model bir monoklonal antikorun geliştirilmesi,

karakterizasyonu ve saflaştırılması amaçlanmıştır. Tanı amaçlı kullanım için hastalık belirteci olan PAP'a karşı geliştirilen bu antikorun üretim ve karakterizasyon süreci, hayvan hastalıklarının tanısı, aşı geliştirilmesi veya daha başka sebeplerle farklı proteinlerin tespitine yönelik antikorların üretim çalışmaları için faydalı bir model oluşturacağı düşünülmektedir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

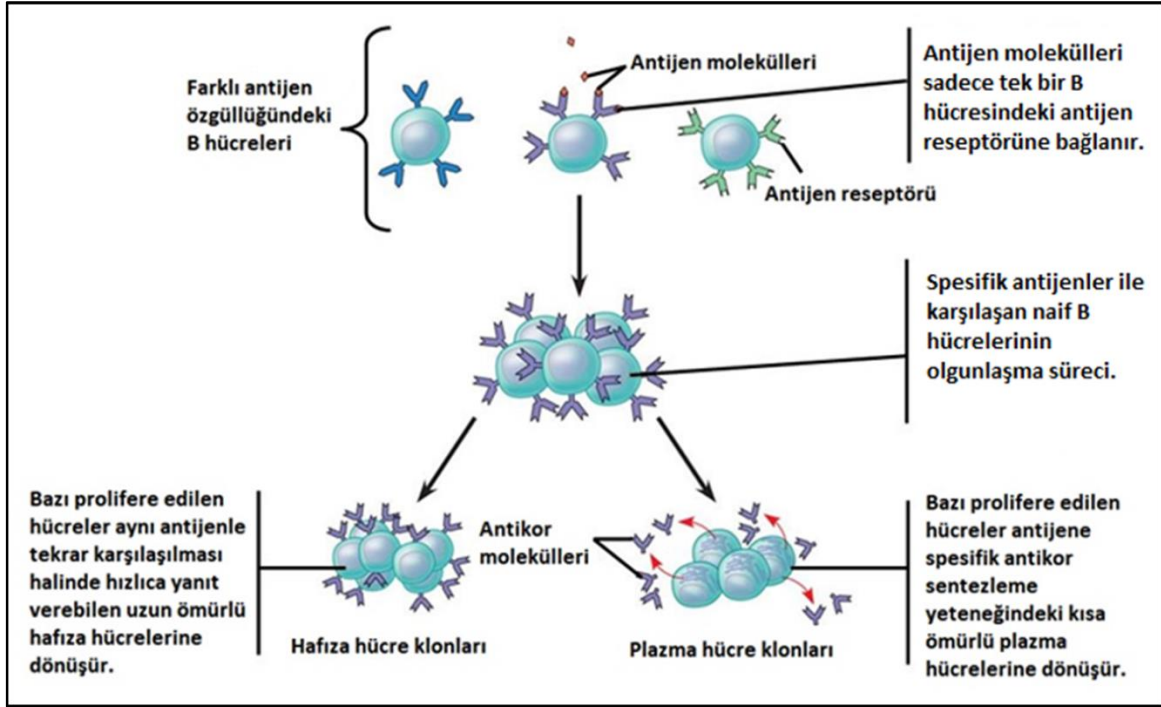
2.1 Bağışıklık Sistemi

Bir organizmanın mikroorganizmalar veya virüsler tarafından tehdit edildiği durumlarda koruma görevini yerine getirmek üzere etkinleşen sisteme bağışıklık sistemi denir (Abbas ve Lichtman 2007). Bağışıklık sisteminin birincil görevi antijen olarak adlandırılan her türlü hücre dışı yapının (bakteri, virüs, mantar, hücre veya molekül vb.) vücuda girişini engellemektir. Vücuda girişin gerçekleştiği durumlarda ise sistem yabancı maddeyi antikor olarak adlandırılan protein molekülleri ile tanımlayarak onu yok etme girişiminde bulunur ve bunu kemik iliği, timus, lenf bezleri ve dalak gibi merkezlerde bulunan özelleşmiş hücreler vasıtasıyla gerçekleştirir. Sağlıklı bir bağışıklık sisteminde temel belirteç yabancı (düşman) moleküller ile organizmanın kendi (dost) moleküllerini ayırt edebilme yeteneğidir (Janeway ve ark. 2005a).

Bir insan hayatı boyunca yüz milyon (10^{11}) farklı antikor üretme kapasitesine sahiptir. Bu çeşitliğin ilk kaynağı gen düzeyindedir. Sorumlu gen bölgesi, somatik rekombinasyon ile oluşturulan farklı birleşimlerle kullanılabilir gen segmentlerinden oluşur. B hücresinin olgunlaşma sürecinde, hücrede gerçekleşen somatik rekombinasyon ile farklı ağır ve hafif zincirlerin birleşme ihtimalleri göz önünde bulundurulduğunda, yaklaşık $1,9 \times 10^6$ farklı rekombinasyon elde edilir. Farklı segmentlerin birleştirilmesi ile oluşan çeşitliğin yanı sıra, rekombinasyon sırasında birleşme noktalarında gerçekleşen ve rastgele nükleotidlerin eklenmesi ve çıkartılması ile oluşan kesişim çeşitliliği (junctional diversity) antikor repertuarına yaklaşık 3×10^7 oranında bir farklılaşma daha ekler. Bu iki çeşitlilik aracı göz önünde bulundurulduğunda, sadece ilk rekombinasyon sırasında yaklaşık 5×10^{13} farklı immüoglobülin oluşturma kapasitesi mevcuttur. Verimsiz kombinasyonlar göz önünde bulundurulduğunda bu aşamadaki çeşitlilik yaklaşık olarak 10^{11} 'dir. Kemik iliğinde gerçekleşen bu aşama başarı ile tamamlanırsa, B hücreleri artık deneyimsiz (naive) B hücreleri olarak dolaşımda yer alırlar ve yüzeylerinde membrana bağlı IgM molekülleri (B hücre reseptörleri) bulunur (Wols 2006, Murphy 2011).

B hücresi olgunlaşma ve antikor üretim süreci Burnet'in klonal seçim teorisi ile açıklanmaktadır. Bu teoriye göre, belirli bir zamanda vücutta bulunan deneyimsiz (naive) B

hücreleri, yüzey reseptörlerine spesifik bir antijen ile karşılaşmazlarsa yaklaşık 3 günlük yaşam sürelerinin ardından ölürlür. İlgili antijen ile karşılaşan B hücreleri olgunlaşma sürecine girerler ve ilk aşamada 3-8 hafta ömürlü olgun B hücreleri, antijenle tekrarlayan şekilde karşılaşması durumunda ise uzun ömürlü hafıza B hücrelerine dönüşürler (Şekil 2.1).

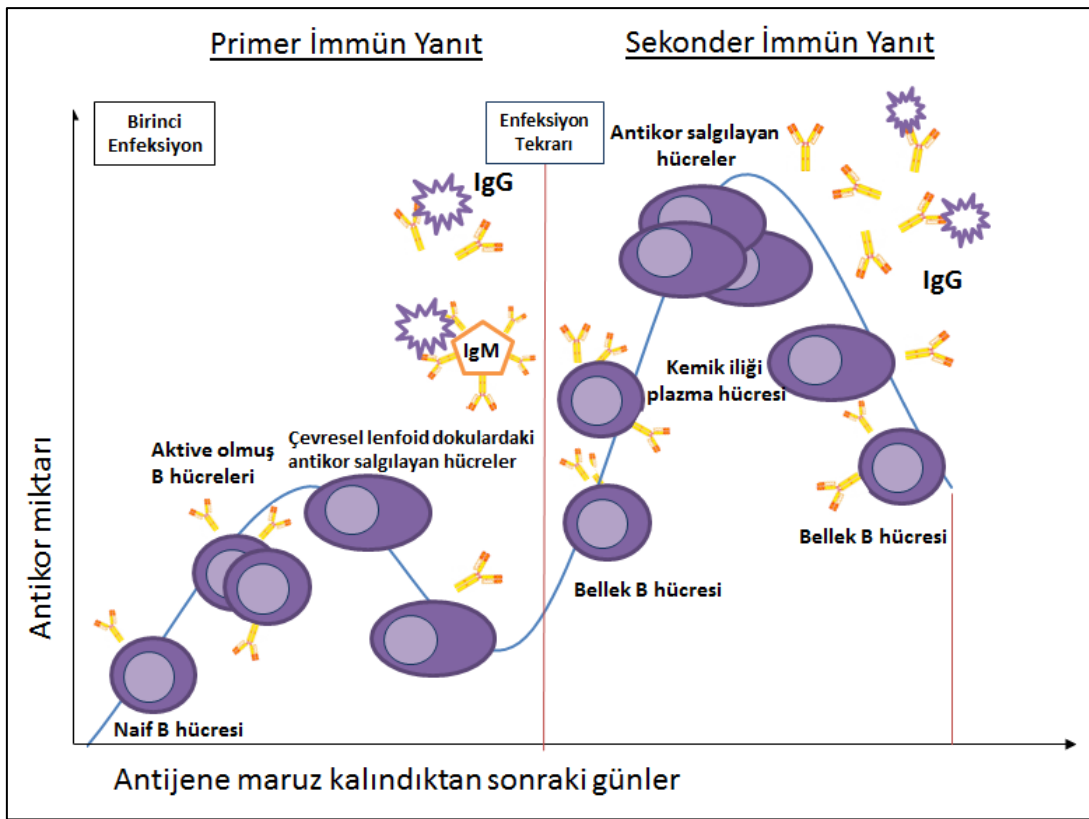


Şekil 2.1. B hücrelerinin klonal seçimi (Anonim 2018)

B hücresi karşılaştığı antijeni reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alıp işledikten sonra sınıf 2 MHC (Major Histocompatibility Complex) molekülleri aracılığı ile hücre yüzeyinde sunar. MHC ile sunulan antijenleri, CD+4 yardımcı T hücreleri tanır. B hücresi, yüzeyinde MHC molekülü ile sunulan antijeni tanıyan yardımcı T hücresinin uyarımı ile olgunlaşma sürecine girer. Bu süreçte ilk olarak immünooglobulin yapısındaki B hücresi reseptörü alternatif kesilme ile sadece IgM'den IgM ve IgD'ye dönüşür ve böylece pentamerik çözünür IgM molekülü salgılanmaya başlar. B hücresi tarafından salgılanan çözünür durumdaki bu immünooglobülin moleküllerine antikor adı verilir. Ardından olgunlaşmakta olan B hücresinde; somatik hipermutasyon ve immünooglobülin sınıf değişimi olmak üzere iki önemli değişiklik olur. Somatik hipermutasyon, yeniden düzenlenmiş immünooglobülin geni V-bölgesi DNA dizisinde oluşan mutasyonlardır. B hücresi reseptörü bu mutasyonlar sonucunda antijeni daha iyi yada daha az tanıyabilir. Bu mutasyonların ardından klonal seleksiyon devam eder ve antijeni daha yüksek afinite ile tanıyan immünooglobülinleri eksprese eden B hücreleri pozitif olarak seçilir. Sınıf değişimi ise, immünooglobülin ağır zincir gen bölgesinde oluşan

somatik rekombinasyon sürecidir. Bu süreçte bir ağır zincir C bölgesi geni başka bir izotipe ait gen ile değiştirilerek farklı immünglobülin izotipleri oluşturulur. Sonuç olarak, başlangıçta IgM ve alternatif kesimle IgD üreten B hücresi; IgG, IgA veya IgE üretmeye başlar (Murphy 2011, Crotty 2015).

Antijenle ilk karşılaşma sonucunda oluşan bu bağışıklık yanıtına primer, sonraki karşılaşmalarda oluşana ise sekonder bağışıklık yanıtı adı verilir (Şekil 2.2). Primer yanıt sonrasında gelişen uzun ömürlü plazma hücreleri ve hafıza B hücrelerinin yardımı ile daha güçlü ve daha hızlı antikor yanıtı görülür (Ademokun ve Dunn-Walters 2010).



Şekil 2.2. Primer ve sekonder bağışıklık yanıtı (Abbas ve Litchman 2007)

2.2 Antijenler ve Genel Özellikleri

Organizmaya girdiğinde, kendisine karşı bir bağışık yanıt oluşmasına yol açan ve bu cevap sonucunda oluşan ürün ile özgül olarak birleşebilen maddelere 'antijen' denir (Polley ve Cohen 2014).

Antijenler, hüморal bağışıklık yanıtının nihai ürünleri olan antikorlara spesifik olarak bağlanabilen moleküllerdir. Yani, antikorla spesifik etkileşim için gerekli kimyasal grupları

içeren tüm maddeler antijenik özelliğe sahiptir. Diğer yandan immünojenler, bağışıklık sistemini antikor üretimi için teşvik eden moleküllerdir. Bir immünojen B hücrelerini antikor üretimi için tetikleyebilmektedir Tüm immünojenik moleküller aynı zamanda antijendir, ancak tüm antijenler immünojen değildir (Van Regenmortel 2001, Polley ve Cohen 2014). Konak organizmada immün yanıt oluşturamayan, ancak yine de antikorlar tarafından tanınabilen bazı moleküller vardır. Örneğin, bazı bakteriler konak bağışıklık sisteminden kaçabilmek için süper antijen adı verilen ve immün yanıtı bloklayan toksinler üretmektedirler. Bu toksinler bir antikor tarafından tanınabilmek için gerekli kimyasal yapıya sahip olsalar da, organizmada antikor yanıtı oluşturamazlar. Bir başka örnek ise küçük molekül ağırlıklı, hapten adı verilen moleküllerdir. Bu moleküller bir antikor tarafından tanınabilirler, ancak küçük molekül ağırlıkları, onları bağışıklık sistemine karşı görünmez kılar (Lemus ve Karol 2008). Haptenler ancak Bovine Serum Albumin (BSA), Ovalbumin (OVA), ve Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gibi taşıyıcı bir proteine konjuge edildiklerinde immünojen olabilmektedirler.

Antijen olarak tanımlanan moleküllerin girdikleri organizma ile olan ilişkileri yabancılık, molekülün yapısal sertliği, molekül büyüklüğü, çözünebilirlik ve metabolize edilebilme, emilim ve atılım hızı, elektrik yükü, miktarı ve organizmaya giriş veya verilmiş yolu gibi faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir.

2.2.1 Yabancılık

Bir madde, girdiği organizmanın yapısına yabancı ise antijenik özellik gösterebilir. Kimyasal bir bileşiğin yabancılığından söz edilirken, molekülün üç boyutlu yapısı kastedilmektedir. Çünkü her canlı yaşamını ve neslini sürdürebilmek için kendi vücut maddelerini sentezler ve bu maddeler hemen her canlıda protein, yağ, karbonhidrat, nükleik asit dediğimiz aynı temel maddelerden oluşmuştur. Bu temel maddelerin ince yapısı ise her canlıda aynıdır. Örneğin proteinler her canlıda aminoasit dizilerinden, lipitler ise yağ asitleri zincirlerinden oluşur. Ancak bu temel maddelerin üç boyutlu molekül yapıları canlı türleri arasında önemli farklılıklar gösterir (Flaherty 2012a).

2.2.2 Molekül büyüklüğü

Bir maddenin antijenik özelliğini arttıran şartlardan birisi de antijenin molekül ağırlığıdır. İyi bir antijenin en az 10000 daltondan büyük molekül ağırlığına sahip olması gerekir. Daha az molekül ağırlığına sahip maddeler zayıf antijenik özellik gösterirler. En etkili

antijenler makromoleküler proteinlerdir. Fakat molekül ağırlığı yüksek olduğu halde, düşük antijeniteye sahip antijenler (dekstran, 100000 dalton) ile, düşük molekül ağırlığı olduğu halde yüksek antijeniteye sahip antijenler (glukagon, 3600 dalton) de bulunmaktadır (Flaherty 2012a).

2.2.3 Molekülün yapısal sertliği

Bir maddenin lenfositler tarafından antijen olarak tanınabilmesi için değişmez bir yapı göstermesi gerekir. Lipit ve jelâtin gibi belirli bir sertliği olmayan moleküller bu nedenle iyi antijenite gösteremezler (Pier 2004).

2.2.4 Çözünürlük ve metabolize edilebilme

Antijenik maddenin, girdiği organizmada çözünmesi ve metabolize edilebilmesi antijenik gücünü etkiler. Örneğin, keratin gibi hidrolitik enzimlere dayanıklı olup metabolize edilemeyen ve parçalanamayan maddeler antijenik değildirler. Benzer şekilde naylon, teflon, polistren, poliakrilamid gibi maddeler makromolekül olmasına karşın metabolize edilemedikleri ve antijenite göstermedikleri için bağışık yanıt oluşturmaz. Bu nedenle doku içine yerleştirilen protezlerin çoğu bu maddelerden yapılmaktadır (Flaherty 2012a).

2.2.5 Emilim ve atılım hızı

Antijenik maddenin immün sistemi uyurabilecek bir süre organizmada kalabilmesi antijenitesini etkiler. Genellikle yavaş emilen ve organizmadan yavaş atılan maddelerin immün sistemle etkileşimi daha iyi olduğundan antijeniteleri de daha güçlüdür. Hızlı emilip, hızla vücuttan atılanlar iyi antijen değildir (Pier 2004).

2.2.6 Elektrik yükü

İyi bir antijenik madde elektrik yükü taşınmalıdır. Molekülün tümü yerine epitopun çevresindeki elektrik yükü daha önemlidir. Çünkü elektrik yüklü gruplar, moleküle sulu ortamda eriyebilirlik kazandırarak çevre ile daha iyi temas etmelerini, dolayısıyla immün sistem hücrelerine daha kolay girmelerini sağlayan hidrofilik nitelik kazandırır. Ancak çok kuvvetli pozitif (+) veya negatif (-) yüklü olanlar başka bileşikler tarafından hızla tutulup örtüldüğünden iyi antijen değildirler (Aksit ve ark. 1995).

2.2.7 Antijen miktarı (dozu)

Antijenik maddenin miktarı immünojeniteyi, dolayısıyla bağışık yanıtın gücünü etkiler. Genel olarak bağışık yanıtın gücü antijenin artan dozuna paralel olarak artış gösterir. Ancak antijen miktarı çok az olduğunda immün sistem uyarılamadığı için bağışık yanıt oluşmazken, miktarın çok fazla olması da immün sistemi felç ederek iyi bir bağışık yanıt oluşumunu engeller (Aryal 2015). Bu nedenle immünizasyon çalışmalarında uygun dozu belirlemek önemlidir.

2.2.8 Antijenin organizmaya giriş veya verilış yolu

Antijenin organizmaya giriş veya verilış yolu bağışıklık yanıtının gücünü ve çeşidini etkiler. Enjeksiyon yöntemi ile vücuda antijen verilmesi, immüniteyi artırır. Fakat ağız veya deri mukoza yolu ile verilerek iyi antijenite gösteren maddeler de vardır. İyi bir bağışıklık yanıtı almak için antijenin uygun dozda, uygun yolla ve uygun zaman aralıkları ile verilmesi gerekir. Bu konu, aşı uygulamalarında çok önemlidir (Aryal 2015).

2.3 Antikor Yapıları ve Özellikleri

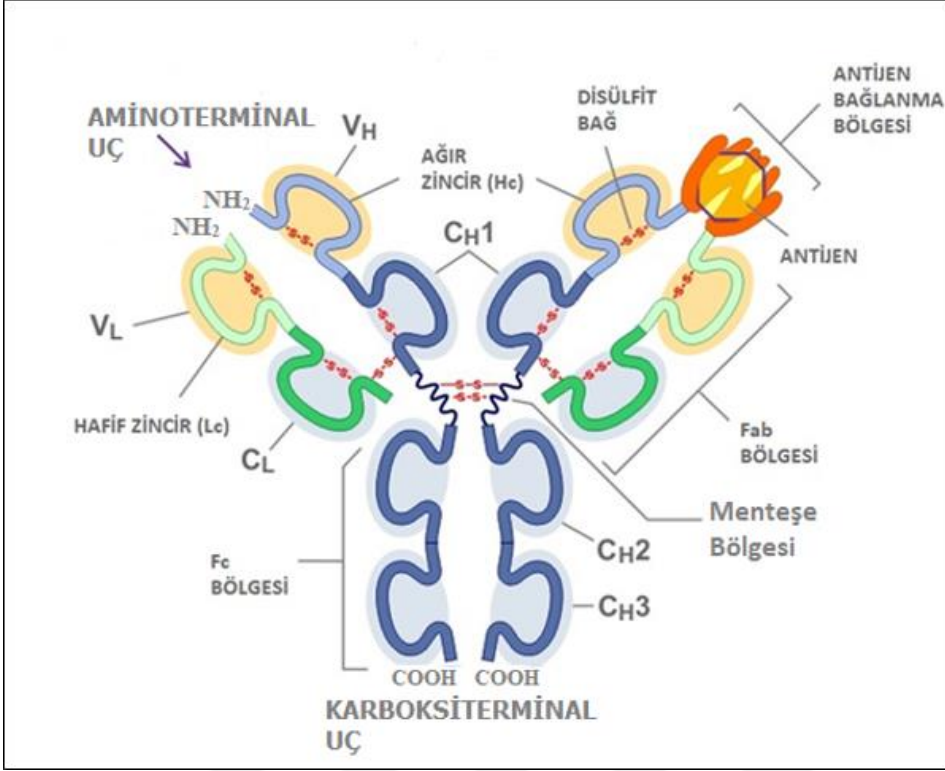
Antikorlar, B lenfositler tarafından salgılanan, belirli antijenler için bağlanma özelliğine sahip olan ve hümorale bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan serum immüoglobulinleridir. İmmüoglobulinler heterojen bir protein grubudur ve total plazma proteinlerinin %20'sini oluştururlar. İmmüoglobulinler serum proteinlerinin elektroforezinde daha çok gamma globülin, daha az olarak beta globülin ve çok az olarak da alfa globülin şeklinde gözlemlenir. Bu nedenle antikor aktivitesi gösteren ve proteinlerin globülinler kısmında yer alan ve immünolojik etkinlikleri olan bu maddeler Dünya Sağlık Örgütü'nün önerisi ile immüoglobulinler olarak adlandırılmış ve Ig şeklinde sembolize edilmiştir (Cohen 2016). Temel olarak dört polipeptid zincirinden oluşan en basit antikor molekülleri her biri yaklaşık 220 amino asitlik iki hafif (L= Light) zincir ve yaklaşık 440 amino asitlik iki ağır (H= Heavy) zincir içeren Y-şekilli tetramerik moleküllerdir (Janeway ve ark. 2001). Kısa ve moleköl ağırlığı daha az ve kısa olan hafif zincirler; tüm Ig çeşitlerinde bulunabilen κ (kappa) ve λ (lambda) olmak üzere iki tipten oluşmaktadır. Bir Ig molekölündeki iki kısa zincirin tipleri aynı ve birbirilerine özdeştir. Biri diğerinden farklı olamaz. Ağır zincir moleköl ağırlığı fazla olan, uzun zincirlerdir. Beş Ig çeşidinin de H zincirleri birbirlerinden farklı yapıdadır.

Bunlar sırasıyla;

* IgG γ (gamma) H zinciri

- * IgM μ (mü) H zinciri
- * IgA α (alfa) H zinciri
- * IgD δ (delta) H zinciri
- * IgE ϵ (Epsilon)

Ig molekülünde; hafif zincirler Y harfi şeklindeki molekülün kol kısımlarında, ağır zincirler ise hem kol hemde gövde kısmında bulunurlar. Kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede ise iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları, polipeptid zincirlerini bir arada tutarak Ig molekülünü oluştururlar. H ve L zincirlerinde, her polipeptid zincirinde olduğu gibi NH_2 ile sonlanan bir aminoterminal uç ve COOH ile sonlanan karboksiterminal bir uç bulunur. Ig molekülünde Y harfinin iki kolunun uç kısımları aminoterminal uçlardır ve antijenler bu kısımlara bağlanır. H ve L zincirlerinin aminoterminal uca yakın olan kısımlarındaki aminoasitlerin diziliş sırası molekülden moleküle çok fazla değişebilir özellikte olduğundan bu kısımlara V bölgesi (Variable= Değişken) adı verilir. Bu değişken kısımlar Ig molekülünün (antikor) oluşumuna neden olan antijen molekülüne uyacak özellikte sentezlenmiştir. Polipeptid zincirlerinin geri kalan kısımlarında değişkenlik görülmediğinden bu kısımlara C bölgesi (Constant=Sabit= değişmez) adı verilir. Ig molekülünü oluşturan polipeptid zincirleri düz iplik şeklinde olmayıp ilmik şeklinde katlanmayla oluşan ve domain adı verilen kıvrımlar gösterirler. Ig'lerin birçok fonksiyonu bu domainler ile ilişkilidir. Değişken bölgedeki V (Hafif zincirdekine VL, ağır zincirdekine VH) domainleri, değişmez bölgedekiler ise C domainleri (Hafif zincirdekine CL, ağır zincirdekine, CH1, CH2, CH3) olarak adlandırılırlar. Böylece hafif zincirlerde 2, ağır zincirlerde ise 4 adet domain bulunur (Janeway ve ark. 2001). IgM ve IgE'de ise 5 adet domain vardır.



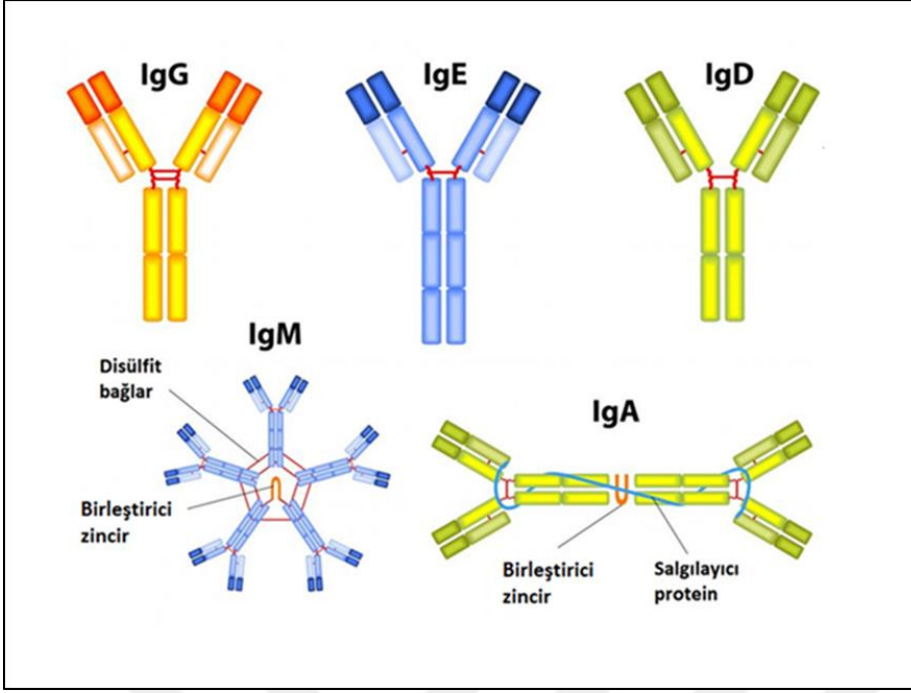
Şekil 2.3. IgG antikorü moleküler yapısı (Janeway 2001)

Ig molekülünün ağır zincirlerinde, moleküle esneklik veren ve antijenik birleşme durumuna göre gerektiğinde Y çatalının daha fazla açılmasını sağlayan bir menteşe (hinge) bölgesi bulunur (Şekil 2.3). Menteşe bölgesi oldukça esnektir ve proteolitik enzimlerle muamele edildiklerinde Ig'ler bu menteşe bölgesinin üst veya alt kısmından parçalanırlar. Papain enzimi menteşe bölgesinin üst kısmına etki ederek, Ig molekülünü birbirine eş iki kol parçası ve bir gövde parçası olmak üzere üç parçaya ayırır. Ig molekülünün birbirine eş iki kol parçası antijen ile bağlanma özelliğindedir. Antijen bağlayabilen bu kol parçalarına Fab (Fragment antigen binding = antijen bağlayan parça) adı verilir. Y şeklindeki molekülün tek parça halinde kalan ve pek çok biyolojik aktiviteden sorumlu gövde kısmına ise soğukta kristalleştiğinden dolayı Fc (Fragment crystallizable=kristalize olabilen parça) adı verilmiştir (Şekil 2.3). Doğal olarak Fab parçasında hem L hemde H zinciri bulunmasına rağmen, Fc parçasında sadece H zincirleri bulunur. Bazı Ig çeşitlerinde monomerler, J polipeptidi (J zinciri) aracılığı ile birleşerek ikili (dimer), beşli (pentamer) moleküller oluştururlar (Flaherty 2012b).

Memelilerde, IgG, IgA, IgE, IgD ve IgM olmak üzere beş sınıf antikor bulunur (Şekil 2.4). Bunların her biri sırasıyla δ , ϵ , γ ve μ olmak üzere kendi ağır zincir sınıflarına sahiptir. (Janeway 2005b).

IgG molekülü, 'tipik' bir antikor olarak düşünülebilir. Normal insan serumunda en çok bulunan immünoglobulindir. Toplam immünoglobülin miktarının yaklaşık %75'ini oluşturan IgG'ler, yaklaşık 150 kDa'lık ağırlığa sahip büyük moleküllerdir. Biri 50 kDa (ağır zincir), diğeri 25 kDa (hafif zincir) olmak üzere iki farklı tür polipeptit zincirinden oluşur. IgG moleküllerinde antijenik yapı ve bazı özellikleri açısından farklılık gösteren IgG1 (%66), IgG2 (%23), IgG3 (%7) ve IgG4 (%4) olmak üzere 4 tane IgG alt sınıfı saptanmıştır. Bu immünoglobulin tipi, insan plasentasından geçebilen ve henüz kendi bağışıklık sistemi gelişmemiş olan fetusun korunmasını sağlayan tek izotiptir. IgG uzun ömürlü bir antikor olup, özellikle ikincil (sekonder) immün cevapta yüksek miktarlarda oluşur. IgG kompleman bağlayabilen iki Ig'den biri olup, toksin ve virüs nötralizasyonu ve opsonizasyonunda rol alırlar (Schroeder ve Cavacini 2010).

IgM μ (mü) ağır zinciri ile karakterize immünoglobülin sınıfıdır. Normal serumdaki immünoglobülinlerin %10'unu oluşturan IgM, 5 temel birimden oluşan bir pentamerdir ve 960 kDa'luk yıldız şeklinde bir Ig'dir (Şekil 2.4). IgM molekülünde 5 tane monomeri birbirine bağlayan J bağlayıcı polipeptid zincirleri bulunur. IgM molekülerinin büyük bir kısmı dolaşımdaki kandadır. IgM molekülleri plasentadan geçemezler ancak fetüsün bir enfeksiyon geçirmesi veya antijenik bir uyarım ile karşılaşması durumunda fetüs tarafından sentezlenebilirler. IgM'nin diğeri önemli bir özelliği her türlü antijenik uyarımda (enfeksiyon, aşı vb) ilk ve en erken sentezlenen Ig olmasıdır. Enfeksiyon hastalıklarının akut döneminde birincil (primer) immün cevap olarak ortaya çıkan IgM'nin serum düzeyinde önemli artış olduğu görülür. Fakat IgM kısa ömürlü bir antikor olduğundan, serum düzeyi kısa bir süre sonra düşer ve yerini IgG sınıfı antikorlara bırakır. Bu nedenle bir serum örneğinde IgG'ye göre daha yüksek miktarlarda özgül IgM saptanması akut (henüz geçirilmekte olan veya çok yeni geçirilmiş) bir enfeksiyonun varlığını düşündürür. IgM antijen bağlama kapasitesi yanında, kompleman bağlama gücü en yüksek olan Ig'dir. IgM, monomer halde B lenfosit yüzeyinde antijeni tanıyan reseptör olarak IgD ile birlikte yer alır (Neil ve Lisa 2013).



Şekil 2.4. İmmünoglobulinlerin izotipleri (Schroeder ve Cavacini 2010)

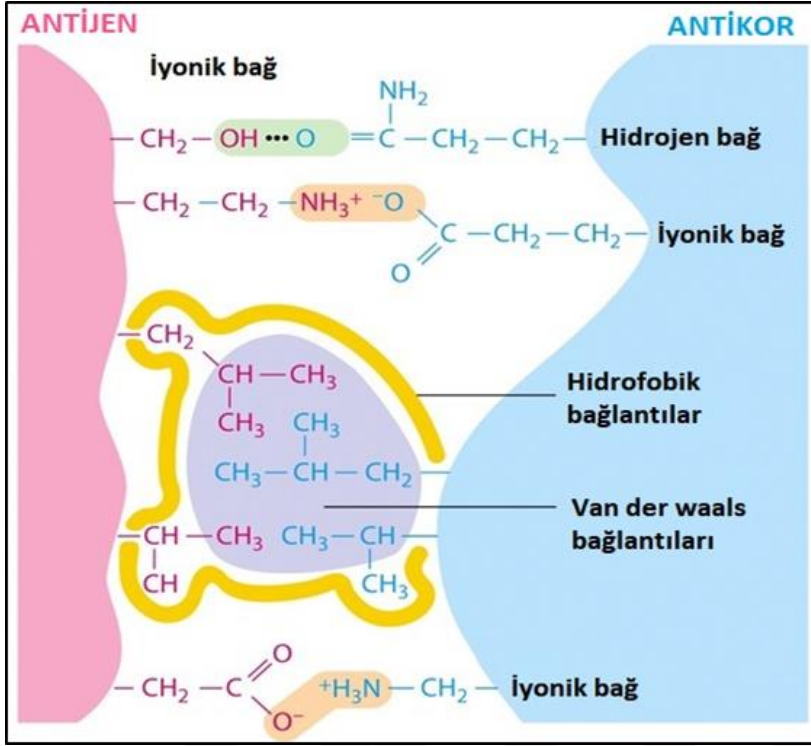
IgA gözyaşı, tükürük ve solunum, bağırsak salgıları da dahil olmak üzere, mukus salgılarında yaygın bulunan immünoglobüldür. IgA'nın kolunu oluşturan alfa (α) zinciri 472 amino asit dizisi uzunluğundadır ve VH, C α 1, C α 2 ve C α 3 olmak üzere dört alt birimden oluşur. IgA'nın yapısal olarak farklılık gösteren, IgA₁ (%90) ve IgA₂ (%10) olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. IgA₁ yapısı diğer immünoglobülinlerle benzerdir; fakat IgA₂'de ağır ve hafif zincirler disülfid ile bağlantılı değildir; sadece kovalent olmayan bağlarla bağlanmışlardır.

IgE 72500 Da molekül ağırlığına sahip olan ϵ ağır zincire sahiptir. Çok sayıda bulunan amino asit dizisi (yaklaşık 550), beş bölgeye dağılmış olup bu bölgeler VH, C ϵ 1, C ϵ 2, C ϵ 3 ve C ϵ 4 olarak isimlendirilir. IgE, tüm bireylerde bazofil ve mast hücrelerinin yüzey zarında bulunur. IgE antikorları Fc bölgeleri aracılığıyla mast hücrelerinin veya bazofillerin hücre yüzeyinde bulunan Fc reseptörlerine spesifik olarak bağlanır. Hücre yüzeylerinde bağlı bulunan antikora antijen bağlanması, mast hücrelerini veya bazofili tetikleyerek çeşitli sitokinler ve biyolojik olarak aktif aminler (özellikle histamin) salgılanmasını sağlar. Bu moleküller, kan damarlarının genişlemesine neden olarak beyaz kan hücrelerinin ve dolayısıyla antikorların enfeksiyon bölgelerine ulaşmasına yardımcı olur (Schroeder ve Cavacini 2010).

IgD; 175 kDa'luk monomer yapıda bir immün globülinidir. Serumdaki immunglobulinlerin %0,2 kadarını oluştururlar. Isı ve proteolitik enzimlerle kolayca parçalanır ve kısa ömürlüdürler. Hücre aktivasyonunu etkileyen IgD molekülleri membrana bağlı bir şekilde bulunurlar. IgD'nin C bölgesindeki d-zinciri 3 domaine ayrılır ve bu zincir 383 amino asit rezidüsü içermektedir. Antikorun menteşe bölgesi ise 64 aminoasitten oluşmaktadır. Menteşe bölgesinin diğer antikorlara kıyasla daha uzun olması IgD'nin ayırıcı özelliğidir.

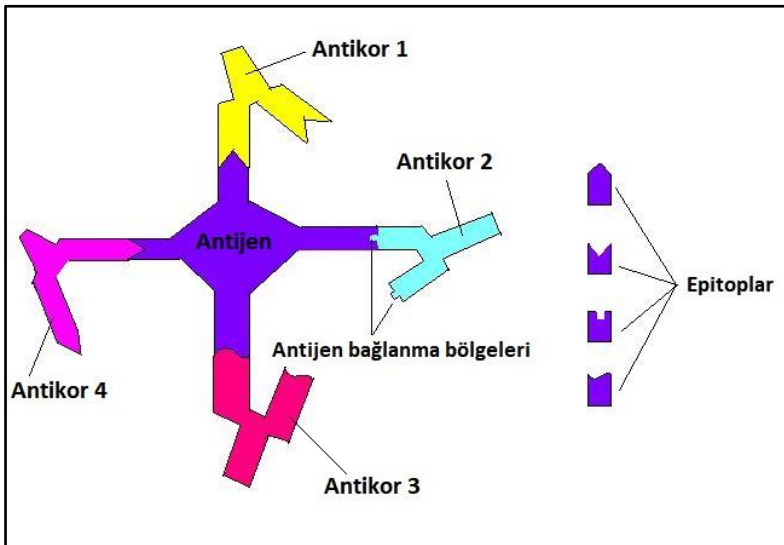
2.4 Antijen-Antikor Etkileşimleri

Bir antijen sadece oluşumuna neden olduğu antikor ile birleşebilir. Bu birleşme antijen yüzeyindeki epitop ile antikor molekülün Fab kısmının ucunda yer alan V bölgesindeki paratop arasında olur. Antijen-antikor birleşmesi çok özgül bir olay olmasına rağmen kuvvetli kovalent bağlar rol oynamaz. Düşük enerjili monovalan bağlar etkindir. İlişkinin gücü reaktanların birbirlerine yakın olmaları ve yapılarının (antijen ve antikor) komplementer olmasına bağlıdır. Bu birleşmede başlıca kuvvetlerden biri iyonik bağlardır. Bu bağlar; antijenin ve antikorun aminoasitleri üzerinde bulunan zıt elektrik yüklü (Amanyon ve Karboksil) determinant grupların, elektrostatik çekim kuvvetiyle birbirlerini çekerek birleşmesidir. Birleşmedeki kuvvetlerden bir diğeri ise hidrojen bağlarıdır. Hidrojen bağları; antijen ve antikor moleküllerinin birbirine yaklaşmasıyla gerçekleşen, hidrofilik gruplar arasında meydana gelen geriye dönüşlü zayıf bağlardır. Hidrofobik bağlanma ise yüzeylerinde glisin, alanin, losin, izolosin gibi hidrokarbon aminoasit içeren iki protein arasında su moleküllerinin itilmesiyle oluşan bağlardır. Antijen-antikor birleşmesinde en önemli rolü bu bağlar üstlenmektedir. Antijen ve antikor molekülünü saran elektron bulutlarıyla ilgili olan bağ oluşumu ise Van der Walls bağları ile gerçekleşmektedir (Reverberi ve Reverberi 2007, Baumgarten 2014) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Antijen-antikor birleşmesini oluşturan bağlar (Anonim 2015)

Antijen-antikor arasındaki özgül birleşme (Şekil 2.6) geri dönüşümlüdür ve ne antijen ne de antikor molekülünde herhangi bir parçalanma veya harabiyet oluşturmaz (Neil 2008). Antijen-antikor bileşiğine immüno-kompleks adı verilir. Antikoru ilgilili antijene bağlanmasının kontrolünü kapsayan çalışmalar antikoru antijene olan ilgisine, antijenin yapısına ve antikoru tipine bağlı olarak değişir. Bu çalışmalar antikoru farklı amaçlarla kullanılmasında gerekli olacak koşulların belirlenmesini sağlar.

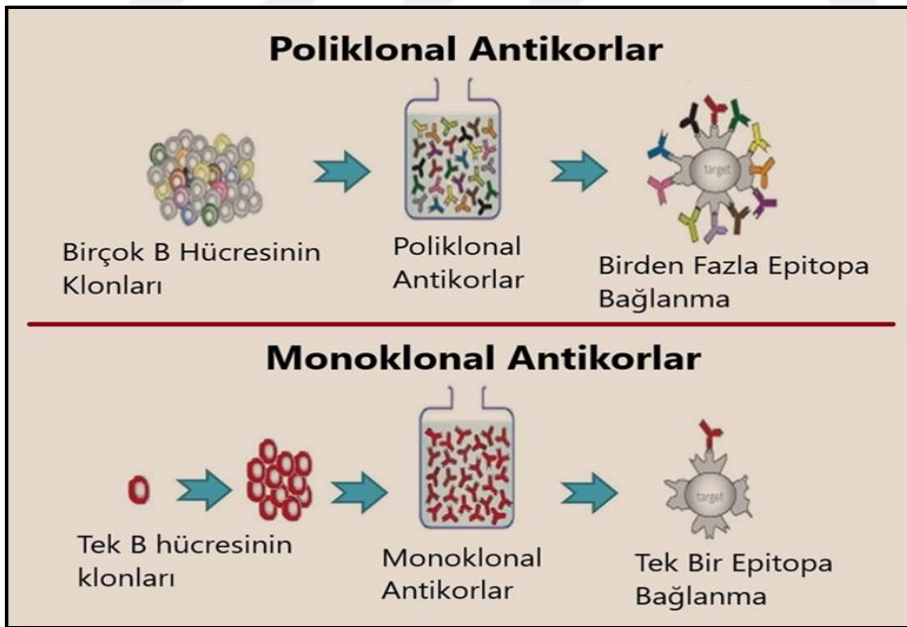


Şekil 2.6. Epitop (Antijen) ile Paratop (antikor) arasındaki özgül bağlanma (Anonim 2008)

2.5 Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar

Bir antijen ‘epitop’ adı verilen birçok antijenik bölge içerir ve organizmaya girdiğinde her bir epitopa karşı bir grup B hücresi çoğalarak özgül antikorlar üretmeye başlarlar. Böylece farklı epitoplara karşı bir antijene karşı farklı B hücrelerinden antikor ürettiği için gelişen antikorlara ‘poliklonal’ antikorlar denir (Şekil 2.7). Poliklonal antikorlar, vücutta B hücrelerinin yabancı bir antijenle uyarılması sonucu meydana gelen çeşitli tipte (IgG, IgM, IgA vb.) ve değişik aktivitelere sahip heterojenik özellik gösteren antikorlardır. Poliklonal antikorlar, antikor havuzunun birçok epitopu tanıyabilen antikorları içermesi sebebiyle spesifik olmayan pek çok reaksiyona neden olması, mevcut serumdaki istenilen antikor titresinin oldukça düşük olması, farklı hayvanlarda farklı zamanlarda üretilen farklı partiler arasında değişkenlik göstermesi, elde edilişlerinde bir süreklilik sağlanamaması gibi olumsuz nedenlerden dolayı sürekli ve tekrarlayan çalışmalar için daha az tercih edilmektedir (Neil ve ark. 2005, Jeffrey 2014).

Monoklonal antikorlar; B lenfositlerinin tek bir klonu tarafından üretilen (Şekil 2.7), antijenin değişik determinantlarından belli bir epitopa özgül olarak bağlanabilen ve tek tip immünoglobülin yapısı gösteren moleküllerdir.



Şekil 2.7. Monoklonal ve Poliklonal antikorların özellikleri

Tek epitoplara yöneltilen monoklonal antikorlar homojen yapıda olup oldukça spesifiktir ve sınırsız miktarda üretilmektedir (Neil ve ark. 2005, Jeffrey 2014). Virüslerin, bakterilerin, mantarların, proteinlerin ve hormonların bazı ortak epitoplara sahip olmaları

immünolojik testlerde ayırt edilebilme olanağını kısıtlar. Örneğin *Erwinia amylovora* bakterisine karşı geliştirilmiş bir poliklonal antikor diğer *Erwinia* türü bakterilerde bulunan ortak epitoplara bağlanabileceğinden çapraz reaksiyonlara ve güvenilir olmayan sonuçlara sebep olacaktır (Yücel ve ark. 1999). Ancak monoklonal antikorlar epitopa özgüllüğü sayesinde poliklonal antikor ile tanımlanması mümkün olmayan antijenlerin tanımlanmasına olanak sağlarlar.

Monoklonal antikorlar hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilirler. Bu teknikle geliştirilen antikor üreten hibridomaların sıvı nitrojende uzun süre muhafaza edilebilmesi, istenilen zamanda çıkarılarak çoğaltılabilmesine olanak sağlar. Hibridoma teknolojisi ile hücre kültürü sistemine alınarak aynı özellikte ve aynı standartta sürekli antikor üretimi sağlanmaktadır.

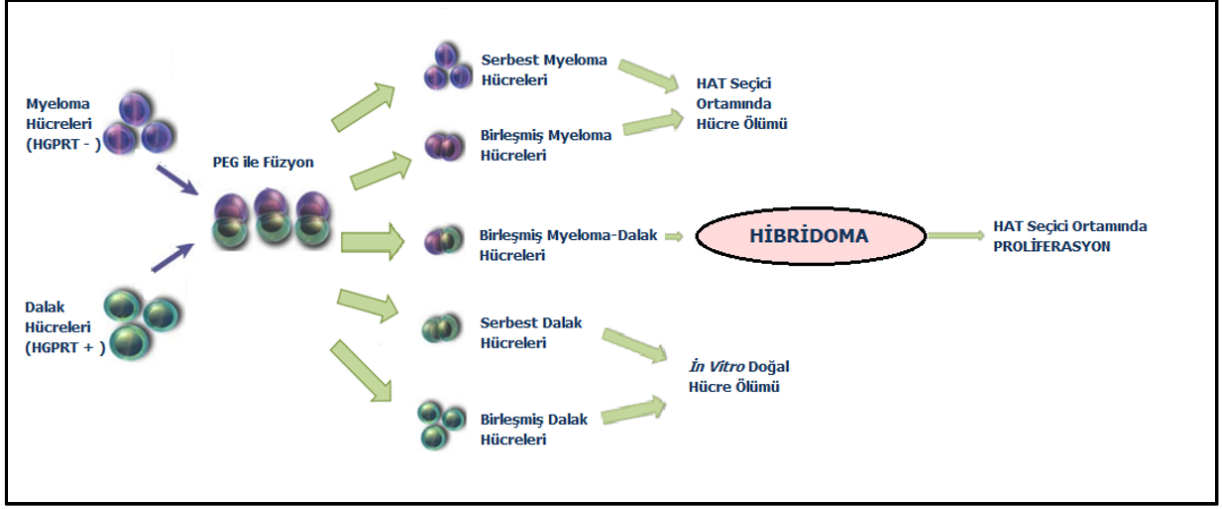
2.6 Hibridoma Teknolojisi İle Monoklonal Antikor Üretimi

Antikorların tanı ve tedavi amaçla kullanımı, varlıklarının kanıtlanmış olduğu ilk yıllara kadar uzanmaktadır (Liu 2014). Bu amaçla spesifik bir antijen ile immünize edilen bir hayvanın poliklonal antikor içeren serumunun toplanarak saflaştırılması ve belirlenen amaç için kullanımı denenmiştir. Ancak bu durum poliklonal antikorların kullanımındaki sakıncalar nedeniyle monoklonal özellikte bir antikor molekülünün geliştirilmesine yönelik çalışmaların önem kazanmasına sebep olmuştur. Monoklonal antikorların üretim tekniği, 1975 yılında César Milstein ve Georges J. F. Köhler tarafından keşfedilmiştir. İki farklı özellikteki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirleri ile kaynaşması (Füzyon) temeline dayanan Hibridoma teknolojisi adlı bu çalışma 1984 yılında Kohler ve Milstein'a Nobel Tıp ödülü'nü kazandırmıştır (Milstein 1999, Pandey 2010, Ganguly ve Wakchaure 2016). Bu teknolojinin temeline oluşturan 3 önemli unsur:

1. İki somatik hücreden biri olan tümör hücrelerinin sınırsız bölünerek çoğalma ve yüksek oranda birleşme özelliğine sahip ölümsüz hücreler olması.
2. İn vitro yaşam süreleri 3-5 gün ile sınırlı olan tek bir epitopa özgü antikor üretme ve salgılama özelliği gösteren B lenfosit immün sistem hücrelerinin kullanılması.
3. Bu iki hücrenin birleştirilmesi ile (füzyon) her iki hücrenin özelliğini (kanser hücresi=ölümsüzlük, B lenfosit= antikor üretimi) taşıyan ölümsüz sürekli antikor üreten hibrit hücreler elde edilmesi şeklinde açıklanabilir (Cambrosio ve Keating 1992)

Hibridoma hücrelerinin geliştirilmesinde kullanılan hücre hatlarından kemik iliği kanser hücre hattı (Myeloma), in-vitro kültürde oldukça ileri pasaj seviyelerinde üretilmektedir. Füzyon amacı için kullanılacak olan myeloma hücre hatlarında aranan bir diğer özellikse antikör üretme yeteneğinin olmamasıdır (Shulman ve ark. 1978, de St Groth ve Scheidegger 1980). Bu amaçla hücre bankalarında kullanıma sunulmuş çeşitli fare myeloma hücre hatları mevcuttur (F0, Sp2/0-Ag14 gibi).

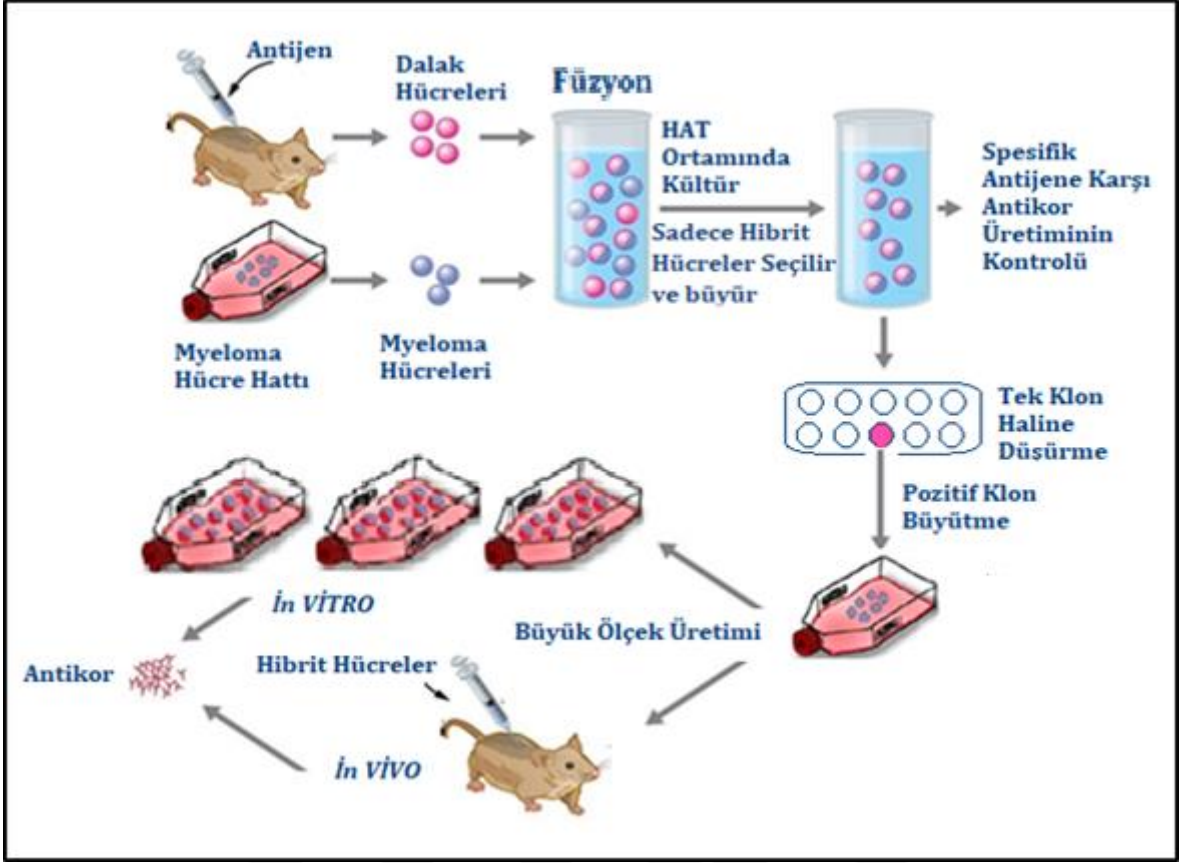
B-lenfosit hücreleri ise, kendisine karşı antikör geliştirilmek istenen antijen ile immünize edilmiş fare (genelde, Balb-c) dalağının mekanik parçalanması ile elde edilmektedir. İki farklı hücre grubunun birbiri içerisine geçişini sağlamak amacıyla hücreler tek bir tüpte toplanarak polietilen glikol (PEG) ilavesi yapılır. PEG etkisi ile hücre membranlarında gözenekler oluşan hücreler istenilen füzyonu oluştururlar. Ancak füzyon işlemi sırasında kaynaşmamış myeloma hücreleri, dalak hücreleri, kaynaşmış dalak-dalak hücreleri, myeloma-myeloma hücreleri ve myeloma-dalak hücreleri (hibrit) olmak üzere farklı hücre tipleri ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle sadece dalak ve myeloma hücrelerinin birleşmesi ile oluşan hücreler dışındaki diğer hücrelerin ayrıştırılması (Seleksiyon) monoklonal antikör üretiminde kritik bir adımdır. Bu amaç için genellikle 'Hipoksantin-Aminopterin-Timidin' (HAT) seçicilik sağlayan ortam kullanılmaktadır. DNA sentezi sırasında, normal hücreler, tetrahidrofolat gerektiren birincil (de novo) yolağı kullanarak pürin nükleotidleri ve timidatı sentezler. HAT ortamının içerdiği Aminopterin, tetrahidrofolatın aktivasyonunu engelleyerek birincil pürin sentezi yolağını bloke eder. Ancak Aminopterin ile muamele edilen hücreler, hipoksantin veya Timidin varlığında, Hipoksantin-Guanin Fosforibosiltransferaz (HGPRT) ve Timidin Kinaz (TK) enzimler tarafından katalize edilen alternatif (salvage = sekonder =kurtama =ikincil) bir yolağı kullanarak pürin nükleotidlerini sentezlemektedirler (Liddell 2013). Füzyonda kullanılacak olan myeloma hücreleri 8-azaguanin veya 6-tioguanin içeren besiyeri ile muamele edilerek HGPRT veya TK enziminin sentezlendiği gen bölgesi mutasyona uğratılır. Mutant myeloma hücreleri bu enzimleri doğru sentezleyemediğinden alternatif yolağı kullanamaz ve böylece HAT ortamında ölürlükler (Giannopoulos ve Murray 2000). Seleksiyonda mutajen ajan olarak kullanılan aminopterin yerine metotrekzat ya da azaserin de tercih edilebilmektedir. Seleksiyon amacı ile gerçekleştirilen kültürasyonun sürdürülmesi ile in-vitro'da yaşam süreleri sınırlı olan B-lenfositler de doğal olarak ölürlükler. Myeloma-B lenfosit hibrit hücreler ise, B lenfositlerin gerekli enzimlerin sağlanması ile ve myelomanın sağladığı ölümsüzlük özelliği sayesinde HAT ortamında büyümeye devam edebilmektedir (Singh ve ark. 2014) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. HAT seçici ortam kullanımı ile hücre seleksiyonu

HAT seleksiyonu süresince besiyerinde kullanılan Hipoksantin, Pürin türevi olarak; Timidin ise, Pirimidin türevi olarak DNA sentezinin desteklenmesi amacı ile kullanılan ajanlardır. Bu kapsamda sürdürülen yaklaşık bir haftalık kültürasyon sonrasında hücreler mitojeni barındırmayan ancak yine DNA sentezini teşvik edici HT besi ortamına alınır. Hayatta kalan hücreler olan hibridoma hücrelerinin gelişimi için ise HT besiyerinin bir süre daha destekleyici olarak kullanılmasına devam edilmektedir (Goding 1996, Zhang 2012). Hibridoma teknolojisi ile antikor üretimi yönteminin aşamaları şöyle sıralanabilir (Şekil 2.9):

- Etkin bir immunizasyon
- Kanser (Myeloma) hücrelerinin hazırlanması
- Bağışık B-lenfositlerinin elde edilmesi
- Hibridizasyon/melezleme (hücre füzyonu)
- Hibridoma elde edilmesi(Tarama)
- Antikor sentezinin kontrolü
- Hibrit hücrelerin klonlanması (Tek hücreye düşürme)
- Hibridomaların büyük ölçekte üretimi
- Monoklonal antikorların saflaştırılması



Şekil 2.9. Hibridoma teknolojisi ile antikor üretiminin şematik gösterimi

2.6.1 Kullanılan hayvan ve özellikleri

Antikor üretiminde kullanılacak olan deney hayvanlarının, çoğaltımı ve beslemesi kolay, ucuz ve erişilebilir olan aynı zamanda bağışıklanmaya güçlü tepki verme özelliğine sahip fareler ve sıçanlar gibi hayvanlardan seçilmesi, daha az olarak tavşanlarda tercih edilebilmektedir (Liddell ve Cryer 1991).

Seçilen deney hayvanlarının yaşı, elde edilecek bağışıklama yanıtı açısından önem taşımaktadır. İleri yaşın bağışıklama yanıtı adına olumsuz ayrıştığı, ideal yaş aralığının 6-8 haftalık süreç olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Seçilen farelerin genetik benzemezliliğine bağlı olarak her bir farenin farklı bağışıklık yanıtı verecek olması, farelerin bağışıklama döneminde farklı nedenlerle yaşamlarını kaybedebilmeleri sebebiyle deney grubunun 4-8 adet genç fareden oluşturulması oluşabilecek risklerin minimize edilmesi adına önem taşımaktadır.

Seçilen farelerin cinsiyeti ile ilgili herhangi bir bilimsel sınırlama olmayıp dişi farelerin uysal yapısı ve bunun getirdiği barındırılma kolaylığı dişi fare kullanımını öncelikli kılmaktadır (Hau ve Hendriksen 2003). Kullanılacak farelerin genel sağlığı üzerinde durulması gereken önemli konulardan biri olup enfeksiyöz ajanların bağışıklık sistemi üzerine basklayıcı, modüle edici ve uyarıcı etkileri ile oluşabilecek çapraz reaksiyonlar dikkate alınmalıdır (Leenaars ve Hendriksen 2005).

2.6.2 Bağışıklama

Hibridoma teknolojisi ile antikor üretiminde ilk basamak olan bağışıklamada seçilecek antijenin ve deney hayvanlarının özellikleri, bu hayvanlara uygulanacak bağışıklama yöntemi başarılı sonuçlar elde etmek adına önem taşımaktadır. Hibridoma çalışmalarında bağışıklama protokolü; antijenin çeşidine, yapısına ve moleküler ağırlığı gibi özelliklere bağlı olarak değişebilmektedir. Seçilen antijenin parametrelerine bağlı olarak bağışıklama optimizasyonun yapılması ile, bağışıklama yöntemi ve dozajın belirlenmesi sağlanmış olacaktır. İmmünizasyon aşaması, uzun süreli immün yanıt ve buna bağlı antikor oluşturulabilmesi amacı ile belli bir düzende birkaç seferlik enjeksiyonlar ile gerçekleştirilmektedir (Fuller ve ark. 2001, Schunk ve Macallum 2005, Greenfield 2014). Çizelge 2.1’de gösterilmektedir.

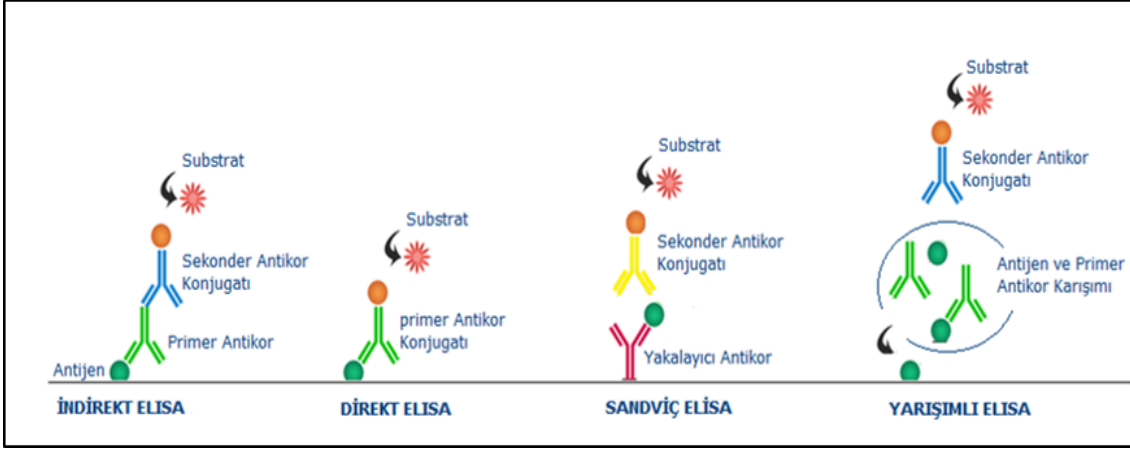
Çizelge 2.1. Farelerin çeşitli antijenler ile bağışıklanma yöntemleri (Akçael ve ark. 2014)

Antijen Tipi	Örnek	Enjeksiyon Bölgesi
Çözünür Proteinler	Enzimler Taşıyıcı proteinler ile konjuge edilmiş haptener İmmün kompleksler	Deri altı Damar içi Kas içi Deri içi
Partiküler Proteinler	Virüsler Mayalar Bakteriler Yapısal proteinler	Kas içi Deri altı Deri içi
Çözünmeyen Proteinler	Bakteriyel ürünler Katı faza bağlı proteinler	Deri içi Kas içi Deri altı
Karbonhidratlar	Polisakkaritler Glikoproteinler	Deri altı Deri içi Kas içi Damar içi
Nükleik Asitler	Nükleik asit ile konjuge edilmiş taşıyıcı proteinler	Deri altı Deri içi Kas içi Damar içi

Deney hayvanlarının bağışıklanma işlemlerinde, antijen ile birlikte ona depo görevi yapan adjuvanlar kullanılmaktadır. Adjuvanlar; uzun süreli salınım sağlayarak bağışıklık sisteminin daha güçlü ve sürekli uyarılmasını sağlamaktadırlar. Adjuvanlar güçlü bağışıklık yanıtını antijen sunucu hücreleri uyararak oluştururlar. Amaca uygun çeşitli adjuvanlar bulunmaktadır (Ribi, Hunter's TiterMax, ImmunEasy, Alum vb). Ancak Hibridoma çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan adjuvanlar; mineral yağ ve öldürülmüş *Mycobacterium* içeren Complete Freud's Adjuvanı (CFA) ve sadece mineral yağ içeren Incomplete Freud's Adjuvanıdır (Page ve Thorpe 2002, Greenfield 2014).

2.6.3 Bağışıklık yanıt kontrolü

Yukarıda özellikleri açıklanan farelerin seçimi yapılmış antijen ile bağışıklanmasından sonra uygun görülen süre içerisinde çeşitli teknikler (Loeb ve Quimby 1999) ile elde edilen kan kullanılarak çıkarılan serum ile antikor yanıt testleri yapılmaktadır. Bağışıklık yanıt kontrolünde kullanılacak olan tarama testi, hızlı, güvenilir, çok yönlü ve hassas olmalı, çok sayıda örnek ile kolaylıkla yapılabilmelidir. Bu kriterleri yerine getiren ve yaygın olarak kullanılan sistem Enzyme Linked Immunosorbent (ELISA) testidir. Bu test aynı zamanda hibridoma taramalarında ve antikor karakterizasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. ELISA testi için, belirli bir antijene karşı spesifikliğe sahip olan en az bir antikor molekülünün kullanımı gerekmektedir. Farklı çeşitleri olan ELISA tekniklerinden (sandwich, yarışımlı, doğrudan, dolaylı) biri olan dolaylı ELISA tekniği, serumda ve hibridoma üst fazlarında spesifik antikorların tespiti için saf yada yarı saf antijen kullanılarak yapılan en yaygın tarama tekniğidir. Bu tekniğin ilk aşamasında solid fazda immobilize edilmiş antijenler kullanılmaktadır. Antijenler, polystyrene microtiter plate, latex veya ferromagnetik partiküllerde immobilize edilebilirler. İkinci aşamada, immobilize antijenle ölçülmek istenen antikor bağlanarak antijen-antikor kompleksi oluşturulmaktadır. Yıkama ile antikor-antijen kompleksi dışındaki maddeler ortamdan uzaklaştırılır. Üçüncü aşamada, fare antikorunu tanıyan enzimle (alkalin fosfataz, peroksidaz vb) işaretli ikinci bir antikor eklenerek antijen - antikor kompleksine bağlanması sağlanır. Son olarak; ikincil antikora uygun kofaktör içeren substrat ortama katılır ve spektrometrik veya spektroflorometrik olarak değerlendirilir (Şekil 2.10). Bu aşamada oluşan ürünün miktarı, tabanda antijenle reaksiyona giren test örneğindeki antikorun konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Butler 1992, Lequin 2005, John 2009).



Şekil 2.10. Farklı ELISA sistemlerinin çalışma prensipleri

Diğer ELISA grupları aşağıdaki gibi özetlenebilir.

Doğrudan ELISA (Direkt); bir numunedeki antijen konsantrasyonunun saptanması ve ölçülmesi amacıyla kullanılan yöntemdir. İlk defa 1940'lı yıllarda Coons ve meslektaşları tarafından antijenleri saptamak için floresan etiketli antikorlar kullanılması suretiyle ortaya çıkmıştır (Lequin 2005). Bu tip ELISA sistemlerinde, üretilen monoklonal antikorlar bir enzimle işaretlenmiştir ve antijenin saptanması için ikinci bir antikora ihtiyaç duyulmamaktadır (Şekil 2.10). Doğrudan ELISA testi doku ve hücrelerin immünohistokimyasal boyanmasında oldukça yaygındır.

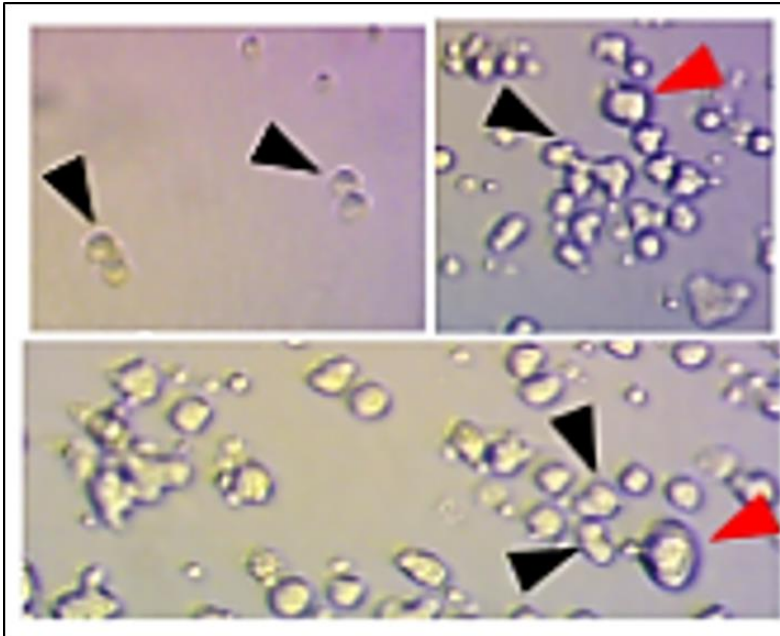
Yarışmalı (Competitive) ELISA; bu ELISA'nın temel amacı, örnekte bulunan antijen-antikor kompleksinin miktarının belirlenmesidir. Hazırlanan antikor ve antijen karışımı kaplaması yapılmış plakaya uygulanır. Böylelikle söz konusu ELISA sisteminde iki reaktif madde kaplamada kullanılmış olan antijen ile yarışmalı olarak bağlanmaya çalışır (Şekil 2.10). Yarışmalı ELISA testi, Hibridoma çalışmalarında geliştirilen antijene spesifik antikorların afinitelerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Sandviç (Sandwich) ELISA; antijeni tespit etmek için kullanılan immünosorbent deneylerin en avantajlısı olduğu söylenebilir, çünkü antijenin doğrudan katı faza bağlandığı ELISA sistemlerine göre 2 ila 5 kat daha fazla duyarlıdır. Bu amaç için ilgili örnekte varlığı araştırılan antijene özgül yakalayıcı antikor katı faza (plastik veya polistren) bağlanarak örnek eklemesi gerçekleştirilir. İnkübasyon süresinden sonra varsa antijenler antikorlara bağlanır ve antikor-antijen kompleksi oluşur. Yıkama işlemi sonrası aynı antijene özgül ve enzimle (HRP, Biotin gibi) işaretli ikinci bir antikor eklenir. İşaretli ikincil antikor, katı fazdaki antikor aracılığı ile tutulmuş antijene bağlanır ve böylece antikor-antijen-antikor kompleksi

oluşturulur (Şekil 2.10). Uygun substrat eklendikten sonra hidroliz derecesi spektrometre veya spektrofluorometreyle ölçülür (Butler 1992, John 2009, Lequin 2005). Okunan değer, örnekte saptanması istenen antijen miktarı ile ilişkilidir. Standart eğri kullanılarak miktar tayini yapılabilmektedir (John ve ark. 1997).

2.6.4 Hibridizasyon/melezleme (hücre füzyonu)

Bağışıklanmış fareden elde edilen serumun antikor titresinin belirlenmesinin ardından antikor titresini yeterince yüksek olan fareler, füzyon işlemi için planlanır. Füzyon işlemine geçilmeden 3 gün önce ilgili antijen enjekte edilerek hatırlatma uyarısı oluşturulur. Uygun cerrahi ve mekanik yöntemler ile elde edilen dalak ve lenf hücreleri önceden hazırlanmış olan kanser hücresi (myeloma) ile kimyasal olarak (PEG) veya elektrik akımı (elektrofüzyon) kullanılarak kaynaştırılır (Şekil 2.11). Bu amaç için en çok PEG tercih edilmektedir (Greenfield 2014). Besi yerine eklenen Hipoksantin-Aminopterin-Timidin (HAT) ile sadece Myeloma-lenfosit hibriti olan hücrelerin canlı kalması sağlanır. Füzyon işleminde besleyici hücrelerin (Feeder) kullanılması füzyonun verimliliğini arttırmaktadır. Besleyici hücreler, hibridoma hücrelerinin büyümesini teşvik eden büyüme faktörleri içerirler, ayrıca içinde bulunan makrofaj hücreler ile ortamda ölü bulunan hücrelerin temizlenmesini sağlarlar (Quinlan ve O'Kennedy 1994).



Şekil 2.11. Füzyon oluşum başlangıcı (siyah ok ile işaretli) ve oluşmuş hibrit hücrelerin (kırmızı ok ile işaretli) mikroskopik görüntüleri (Pelsue 2018)

Kültüre edilen hücrelerinin büyümesini destekleyici olarak fare dalağından elde edilen makrofajlar, insan fibroblastları, fare periton hücreleri, insan periferik kan monositleri ve timus hücreleri kullanılabileceği gibi büyüme faktörleri içeren çeşitli ticari preparatlarda kullanılabilmektedir (Hoffmann ve ark. 1996). Kültürde sağlıklı hibrit hücrelerinin oluşması gözlenerek işaretlenirler. Dolaylı ELISA yöntemi ile yalnızca hedef antijene yönelik antikor üreten hibrit hücrelerin belirlenmesine yönelik testler yapılır. Test sonuçlarına göre uygun olan hibrit hücrelerin elde edilmesi amacıyla seyreltme işlemi uygulanır. Bu safhada tekrarlanan dolaylı ELISA testi ile klon oluşturması istenen hücreler belirlenmiş olup tek hibrit hücresi içeren kültürler ile klon oluşumu sağlanır (Howard ve Bethell 2000). Bu aşamadan sonra, hibridoma hücrelerinin ürettiği spesifik monoklonal antikorlarının istenilen miktarda üretimine başlanabilmektedir.

2.6.5 Hibridomaların geniş ölçekte üretimi

Hibridomaların çoğaltılması ve antikor sentezlerinin artırılması için in vitro ve in vivo olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır.

Günümüzde in vivo yöntemlerin hala kullanılır olmasına karşın kullanılan hayvandan kaynaklı riskler sebebiyle in vitro metotlar tercih edilmeye başlanmıştır. İn vitro üretim teknolojisinde yaygın olarak T-Flasklar, döner şişeler, Spinner kültürler, Perfüzyon ve Hollow Fiber Reaktörler, Karıştırılmalı (Stirred) Tank ve Hava-Kaldırılmalı (Airlift) biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır. T-Flask sistemi kullanımı temel steril kültür tekniklerinden daha fazlasına ihtiyaç duymaması 50 veya daha fazla Flaskın kullanılabilirliği ve takip kolaylığı gibi özellikler göstermektedir. Döner şişeler yüzlerce gram hücresel proteinin üretimi için uygun teknolojik sistemlerdir. Memeli hücre kültürleri için kullanıldığında fermentör olarak adlandırılan Karıştırılmalı (Stirred) Tank ve Hava-Kaldırılmalı (Airlift) biyoreaktörler yüksek kapasiteli MAb üretimi için uygun görülen bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır (Akçael ve ark. 2014).

İn vivo üretim teknolojisinde kullanılan BALB/c farelerine deri altına veya karın içerisine aktif üremekte olan hibridoma hücreleri $1-10^6$ hücre/ml olacak şekilde verilir. Bu işlemde 2 hafta önce farelere 0,5 ml miktarında pristan (tetrametilpentadekon) verilerek immün sistem geçici olarak zayıflatılır ve tümör oluşumu sağlanır. Enjeksiyondan sonra iki dört hafta içerisinde karında biriken asidik sıvı bir enjektör yardımıyla alınır. Bu sıvının 1ml'sinde yaklaşık 10-50mg mAb bulunması beklenir (Jackson 1999). Kültür üst sıvısı veya

farenin asidik karın sıvısı santrifüj edilir ve saflaştırılır. Elde edilen mAb'lar +4 °C'de saklama tamponunda 6 ay süre ile -20 °C'de 1 yıl süre ile muhafaza edilir.

2.7 Monoklonal Antikorun Karakterizasyonu

Monoklonal antikorların karakterizasyonu tanımlanabilmeleri adına önemli bir işlemdir. Antikorların karakterize edilmesi kullanılıcakları immun testlere uygunluklarını belirlemek için önemli bir adımdır. Karakterizasyon ile antikora ait izotip, alt izotip tespiti, çapraz reaksiyon cevabının belirlenmesi ve tasarlanan test sisteminde antigen-antikor titrasyonu ile afinite verileri gibi bilgiler elde edilmiş olur. Elde edilen bu bilgiler işaretleme çalışmalarında ve saflaştırma yönteminin seçilmesinde belirleyici rol oynamaktadır.

2.7.1 İzotip ve alt izotip

İzotip ve alt izotip belirleme, bir monoklonal antikorun sınıfının (IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD) ve alt sınıfının (IgG1, IgG2, IgG3, IgG2a, IgG2b) belirlenmesi çalışmalarını kapsamaktadır. Uygun saflaştırma yönteminin seçilmesi ve antikorun immunoassay analizlerinde kullanım şekli izotip ve alt izotipin belirlenmesi ile elde edilecek veriler doğrultusunda tasarlanır. Geliştirilen antikorların izotip belirleme çalışmalarında genellikle ticari kitler kullanılmaktadır. Bu kitler ile yapılan uygulamalar çeşitli sınıftan antikorların (aynı hayvan türünden) test edilecek antikor ile etkileşiminin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. İzotipleme kitleri ELISA kitleri veya membran (şerit veya kaset) kitleri olmak üzere iki temel formatta bulunmaktadır. Tipik olarak bu kitler, test örneğindeki antikorunu doğrudan yakalamak ve reaksiyona sokmak üzere tasarlanmış önceden kaplanmış plakalar veya membranlar içerir. ELISA kitlerinin kullanımı, antikorun, ilgili ön kaplamalı izotipe spesifik antikor içeren belirli mikropłaka kuyucuklarına uygulanması ile gerçekleştirilir. Strip kitleri ise, izotipe spesifik antikorların test antikoruyla reaksiyona girdiği membranda renkli bantlar üretir. Strip kitleri, bir seferde bir örnek test etmek için daha hızlı olsada; ELISA kitleri, birden fazla örneği aynı anda test etmek için daha verimlidir. Bu kitler ile IgG, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA ve IgM izotip ve alt izotipleri ile VL-kappa veya VL-lambda hafif zincir tiplerini belirlenebilmektedir.

2.7.2 Çapraz reaksiyon

Antikorların özgünlüğünün belirlenmesi karakterizasyon çalışmalarındaki en önemli unsurlardan biri olup antikor ile özgün olduğu antijene yapısal benzerlik gösteren veya test

edilecek ortamda çapraz reaksiyon yaratması olası farklı antijenlerle reaksiyonlarının belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Bu amaç için genellikle dolaylı ELISA testi tercih edilmektedir (Mats 1992, Frank 2002, Langer ve ark 2017).

Tanı sistemlerinde bazı özel durumlarda kullanılacak antikorunun çapraz reaksiyon vermesi yararlı olabilir. Türler arası çapraz reaksiyon, aynı antikorun kullanılmasıyla diğer türlerde karşılık gelen antijenin saptanmasına izin verebileceği için faydalı olabilmektedir.

2.7.3 Afinite ve avidite

Afinite, antikorun bir antijene bağlanma bölgesi (paratop) ile antijenin bir epitopu arasındaki etkileşim gücünün bir ölçüsüdür. Afinite değeri, bireysel epitop ve bireysel paratop arasındaki çekici ve itici güçlerin net sonucunu yansıtır ve geri dönüşümlü birleşme biyomoleküler etkileşimi yöneten aynı temel termodinamik ilkelerle tanımlanır:

K_A = afinite sabiti

[Ab] = antijene bağlanmamış antikorların molar konsantrasyonu

[Ag] = antikore bağlanmamış antijenlerin molar konsantrasyonu

[Ab-Ag] = antikor-antijen kompleksinin molar konsantrasyonu

$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]}$$

K_A sabit noktasına ulaşıldığında ne kadar antikor-antijen kompleksinin bulunduğu saptanmaktadır. Bunun gerçekleşmesi için gereken süre, difüzyon oranına bağlıdır ve her antikor için benzerlik gösterir. Bununla birlikte, yüksek afiniteli antikorlar, düşük afiniteli antikorlardan daha kısa sürede daha büyük miktarda antijen bağlayacaktır. Yüksek afinite değeri, epitop ve paratop arasındaki güçlü bir etkileşimin sonucudur. Düşük afinite değeri ise düşük etkileşimi gösterir. K_A , antikorlar için 10^5 mol^{-1} 'in altına ve 10^{12} mol^{-1} 'in üstünde geniş çeşitlilik gösterebilir ve pH, sıcaklık ve tampon bileşimi gibi faktörlerden etkilenebilir (Reverbi ve Reverbi 2007). Monoklonal antikorların afinitesi, tek bir epitopa seçici ve homojen oldukları için doğrudan ve net değerler olarak ölçülebilir. Antikorların afinitesini ölçmek için en kolay metot ELISA yöntemidir ve bunun için en çok yarışmalı ELISA testleri tercih edilmektedir. Yarışmalı ELISA sonucundan yararlanılarak hesaplanan inhibisyon konsantrasyonu (IC50) geliştirilen antikorların afinite değerlerini bulmak için kullanılabilir. Bu yöntem Afinite belirlemede daha kesin, kullanışlı ve bilgilendirici veriler sağlar. Yüksek afiniteli antikorlar, hızlı bir şekilde epitop ile bağlanarak immünolojik testler sırasında devam eden güçlü bir bağ oluşturulurken düşük afiniteli antikorlar, etkileşimlerini kaybederek deneyler sırasında saptanamazlar (Rudnick ve Gregory 2009).

Avidite; bir antikorun aviditesi, antijen ve antikor arasındaki bağlanmanın genel gücünün bir ölçümüdür, yani antikor-antijen kompleksinin genel bağlanma kuvvetinin bir ölçüsüdür. Avidite; antikorun epitopa olan afinitesi hem antikor hem de antijenin valansı ve etkileşen parçaların yapısal düzenlenmesi parametrelerine bağlıdır. Bütün antikorlar multivalent, örneğin; IgG'ler bivalent ve IgM'ler decavalant. İmmünoglobulinin değerliklikleri (valency) (antijen bağlanma yerlerinin sayısı) ne kadar yüksekse bağlayabilecekleri antijen miktarı da o kadar yüksektir. Benzer şekilde, birden fazla antikora bağlanabildikleri için antijenlerde çoklu değerlik (multimerik) gösterebilirler. Bu nedenle, çoğu antijen antikor etkileşimi, antijen-antikor kompleksinin yüksek avidansı nedeniyle güçlü ve kararlı kalır (Rudnick ve Gregory 2009).

2.7.4 Antikor titrasyonu

Saflaştırılmış antikorların konsantrasyonunu ve işlevsel titrasyonunun doğru bir şekilde belirlenmesi hem işaretleme çalışmalarında hem de kullanılması planlanan immunoassay testlerde başarılı ve tekrarlanabilir bir şekilde kullanımını sağlar. "Antikor konsantrasyonu" ve "antikor titresini" farklı anlamlara sahiptir.

Antikor konsantrasyonu fonksiyona bakılmaksızın çözeltideki antikorun (protein) toplam miktarıdır. Antikor konsantrasyonu, genel bir protein deneyi veya bir immünoglobülin-spesifik yöntem kullanılarak tahmin edilebilir. Saf antikorların konsantrasyonu, PBS'de %1 (10 mg / mL) solüsyonun absorbansı için 13 ila 14'lük bir değer (Extinction Coefficient=EC) varsayılarak, 280 nm'de ölçülen absorbans değerinden hesaplanabilir (Pace ve ark. 1995, Grimsley ve Pace 2004). Ayrıca, BCA Protein testi veya Coomassie Protein gibi ticari kitler kullanılarak tahmin edilebilir.

Antikor titrasyonu ise belirli bir immünoassay için kullanılacak antikorun stok çözeltisinin işlevsel konsantrasyonu veya seyreltme faktörüdür. Antikor titresini konsantrasyon ile ilgilidir, ancak daha spesifik olarak belirli bir antikor numunesinin etkin potansiyelini belirler. Titre ölçümü; genel olarak ELISA gibi bir test yönteminde istenilen sabit aralığın elde edilmesi için kullanılacak antikor numunesinin fonksiyonel seyreltme oranını belirlenmesi olarak tanımlanabilir. Kabul edilebilir minimum değer, araştırmacı tarafından belirlenir, ancak genellikle istatistiksel olarak anlamlı olan sinyal-parazit (signal-noise ratio) oranı referans alınır (Barrette ve ark. 2006, Hulspas 2010). Antikorların titresini ile konsantrasyonu kuvvetli korelasyon gösterir. Dolayısıyla, belirli bir monoklonal antikorun iki

farklı üretim ve saflaştırma grubunun farklı titrelere sahip olması, bir partinin diğerinden daha konsantre olduğu anlamına gelebilir.

2.8 Antikorların Saflaştırılması

Monoklonal antikor içeren kültür üst sıvıları, bağışıklanan fareden elde edilen Poliklonal antikor içeren fare serumu ve hibridoma hücrelerinin enjekte edilmesi ile elde edilen fare asidik sıvıları saf olmamaktadır. Bu sebeple Western blot, ELISA gibi çeşitli uygulamalarda spesifik antijeni tanımlamada doğrudan veya enzim yada flüoresan işaretleriyle daha etkin ve hassas bir şekilde kullanılabilmesi için antikorların saflaştırılması gerekmektedir (Neil ve ark. 2005, Liu ve ark. 2010).

Bütün diğer proteinlerin de saflaştırılmasında olduğu gibi antikorlar için de saflaştırmanın her adımında % olarak çıkan ürün miktarı, antikorun spesifik aktivitesi ve saflaştırma zenginliği izlenmelidir. Saflaştırmaya başlarken antikorun fiziksel ve kimyasal karakterlerinin yanısıra saflaştırma yapılacak ortamdaki kontaminantlar hakkında da bilgi sahibi olmak gereklidir (Neil ve ark. 2005). Çöktürülme yöntemi en genel ve pratik protein saflaştırma yöntemlerinden biridir. Proteinler; çeşitli tuzlar (amonyum sülfat, magnezyum sülfat, sodyum sülfat), organik çözücüler, ısı, asid ve bazlarla çöktürülebilir, ancak tuzlar dışındakilerle yapılan çöktürme işleminde proteinler denatüre olup bir daha doğal şekillerine dönemezler. Buna karşın tuzlarla yapılan çöktürme işlemi ise proteinleri denatüre etmez ve koruyucu çöktürme olarak adlandırılır. Tuzlar, protein moleküllerinin etrafındaki su moleküllerini çekerek, moleküllerin birleşerek çökelmelerini sağlar ve diyaliz uygulanarak tuzlar ortamdan uzaklaştırılır. Antikorların saflaştırılmalarında ise yaklaşık 50% doygunluktaki amonyum sülfat konsantrasyonu kullanılmaktadır. Ancak antikorların amonyum sülfat (AS) ile çöktürülmelerindeki dezavantaj istenilen saflığın elde edilememesidir. Bu nedenle AS. çöktürme tek başına yeterli bir saflaştırma yöntemi olmayıp diğer saflaştırma yöntemleri ile birlikte kullanılmaktadır (Grodzki ve Berenstein 2010a).

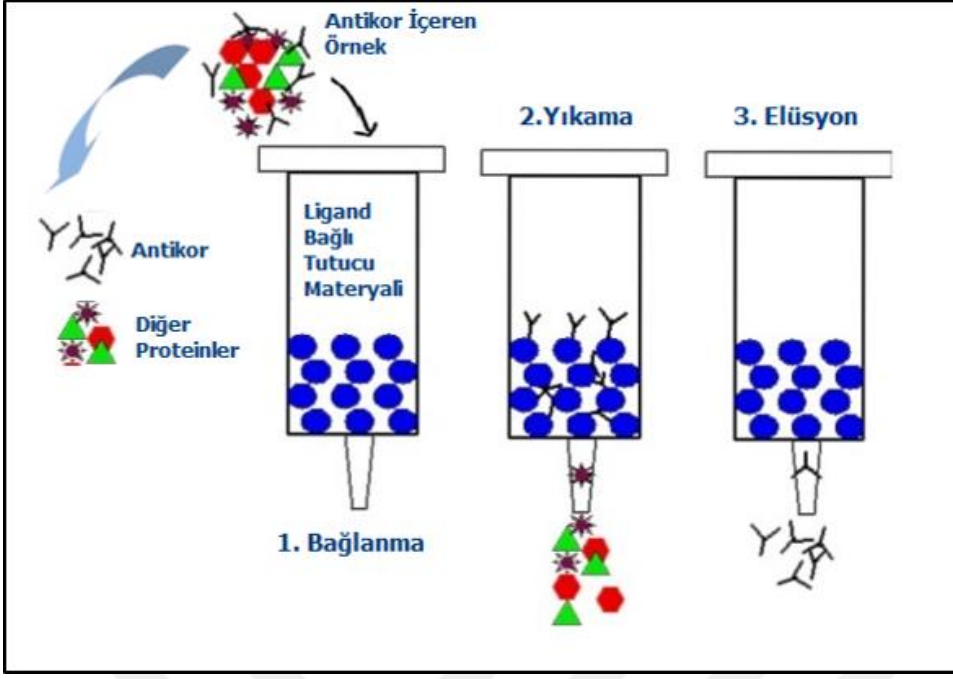
Protein A, Protein G ve Protein L antikora bağlanma özellikleri iyi karakterize edilmiş üç bakteriyel kökenli proteindir. Bu proteinlerin ligandlarının tanımlanması antikorların constant alanlar dahil öngörülebilir yapılarının incelenmiş olmasına bağlı olarak mümkün olmuştur. Bu proteinler rekombinant olarak üretilen ve çeşitli türlere ait antikor tiplerinin afinite saflaştırılması için rutin olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte Protein A ve G'nin

rekombinant formu olarak genetik olarak tasarlanmış ve Protein A / G olarak adlandırılan bir diğer formda bazı durumlarda kullanılabilir.

Genellikle bu antikor bağlayıcı proteinler, agaroz reçinesinde immobilize halde kullanılırlar. Proteinler A, G, A / G ve L antijen bağlanma alanının dışındaki yerlerde antikorlara bağlanırlar. Bu proteinlerin her biri farklı hedef antikor tipleri (örn., Antikor alt sınıfı veya hayvan türleri) için uygun benzersiz özelliklere sahiptirler. Ancak örnek kaynağına bağlı olarak, antijene spesifik antikorların dışında başka immüoglobulinlerin bulunduğu durumlarda spesifik antikorların saflaştırılabilmesi için antijen-antikor etkileşimine dayanan afinite saflaştırma yönteminin de kullanılması gerekmektedir (Arora ve ark. 2014).

2.8.1 Protein A özellikleri ve IgG bağlama özellikleri

Protein A, *Staphylococcus aureus*'un birkaç suşu tarafından üretilen bir hücre duvarı bileşenidir. Tek bir polipeptit zincirinden (MW 46.7kDa) oluşur ve az ya da hiç karbonhidrat içermez. Protein A, immüoglobülin moleküllerinin, özellikle IgG'nin Fc bölgesine spesifik olarak bağlanır. IgG'lerin Fc bölgesi ile etkileşime girebilen dört yüksek afiniteli ($K_a = 10^8 M^{-1}$) bağlanma bölgesine sahiptir. Protein A, immobilize formunda farklı memeli türlerinden çok çeşitli immüoglobulinlerin izole edilmesi için kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır. Ancak Protein A ile IgG arasındaki etkileşim, IgG'nin tüm hayvan kaynakları ve alt sınıfları için eşdeğer değildir. Örneğin, Farelerde, IgG2a, IgG2b ve IgG3 Protein A'ya güçlü bir şekilde bağlanır, ancak IgG1 (serumdaki baskın alt sınıf) ile bağlantısı zayıftır. Çoğu sıçan IgG alt sınıfı ise protein A'ya hiç bağlanmamaktadır. Bu değişkenliğe rağmen, Protein A, birçok türün serumundan IgG'nin rutin afinite saflaştırması için çok etkilidir. Özellikle tavşanlardan poliklonal antikorların saflaştırılması için uygundur (Şekil 2.12). IgG'nin farklı alt sınıfları için Protein A'nın değişken bağlanma özellikleri, bir IgG türünün diğerinden ayrılması için avantajlı olarak kullanılabilir. Bu yolla, fare IgG1 ve diğer immüoglobülin alt sınıfları, Protein A'ya bağlananlardan bağımsız olarak izole edilebilir (Hober ve ark. 2007, Grodzki ve Berenstein 2010b, Hnasko ve McGarvey 2015)



Şekil 2.12. Protein A veya Protein G afinite kromatografi kolonları ile antikor saflaştırma basamakları

2.9 Antikorların Tanı Alanında Kullanımı ve Önemi

Antijen-antikor birleşme mekanizmasına dayalı immünolojik temelli çalışmalar serolojik yöntemler olarak adlandırılır. Bu yöntemlerin çalışma prensibi, bilinmeyen bir reaktif bilinen bir reaktif kullanarak saptamak şeklindedir. Serolojik testler niceliksel temele dayalı olarak yapılır. Yani ortamda bulunan antijen ya da antikorun yalnızca bulunup bulunmadığı değil, aynı zamanda ne kadar bulunduğu da önemlidir.

Serolojik çalışmalarda; kan, semen, tükürük, idrar, gözyaşı ve göz içi sıvısı, gaita, mide özsuyu, lenf sıvısı ve diğer tüm vücut sıvıları incelenebilmektedir. Günümüzde serolojik çalışmalar yaygın olarak; viral, bakteriyel, fungal ve paraziter enfeksiyonların tanısında, immünizasyon ve immün sistem ile ilgili çeşitli inceleme ve araştırmaların yapılmasında önemli bir uygulama alanına sahiptir. Serolojik tanı için kullanılan yöntemler; mekanizmalarına (aglutinasyon, presipitasyon, ELISA vb), uygulama şekline (otomatize, manuel), hızlarına (birkaç saatten birkaç güne kadar) ve kullanım amaçlarına göre (antikor tipi tesbiti, kantitasyon, vb.) farklılık göstermektedir. Bu yöntemlerden en yaygın olarak bilinenleri şu şekilde özetlenebilir;

2.9.1 Aglutinasyon ve hemaglutinasyon testleri

Uygun bir sıvı ortamda antijen ve ona spesifik olan antikorun bağlandıktan sonra kompleksler oluşturarak kümeleşmesi ile karakterize olan serolojik reaksiyona aglutinasyon adı verilmektedir. Bakteri veya virüslerin eritrositlere bağlanarak onları aglutine etmesi ise ‘hemaglutinasyon’ olarak adlandırılır. Aglutinasyon olayının gerçekleşebilmesi için antijeni taşıyan hücre ya da diğer parçacıkların elektrolitli ortamda (örneğin: fizyolojik tuzlu suda) asıntı (süspansiyon) halinde olmaları gereklidir (Mayer 2017).

2.9.2 Presipitasyon testleri

Suda çözülmüş durumda bulunan antijenlerin, elektrolitli ortamda kendilerine özgü immüoglobülinler (antikorlar) ile birleşerek ince granül bir yapıda çökmesi olayına presipitasyon denir. Antijenlerin multivalan olması; antikorların ise en az bivalan olması presipitasyon için yeterlidir. Antikorlar içerisinde IgG, IgM ve az olarak IgA'nın presipitan özelliği bulunmaktadır. Presipitasyon yöntemini kullanılarak hem enfeksiyon hastalıklarının tanısını koyulabilmekte hem de mikroorganizmaların identifikasyonu yapılabilmektedir (Bonifacino JS Dell'Angelica 2001).

2.9.3 İşaretlenmiş antijen ve antikorlarla yapılan testler

Bu yöntem antijen ya da antikorların; enzim ya da radyoaktif maddeler gibi bazı maddelerle işaretlenerek ve bu maddelerin oluşturduğu renklenme ile reaksiyonun görülebilir bir hal alması presibine dayalı bağlanma testleri olarak açıklanabilir. Bu yöntemlerle organlarda, dokularda ve kan serumunda antijen varlığı araştırılabilir ve yine dilusyonlar yapılarak titre tayini yapılabilir. Bu yöntem kullanılarak yapılan testler 3 ayrı gruba ayrılmaktadır:

- 1- **Immuno-enzimoloji (EIA)**; antijen ve antikorun birleştiği, oluşan immünojenik reaksiyonların enzim-substrat sistemleri ile görünür hale getirildiği testlerdir. EIA teknikleri üç grupta incelenebilir:
 - a. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay); biyokimyasal ve immünojenik bir yöntemdir. Özgül antijen-antikor reaksiyonunu göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak reaksiyonun renklendirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu testin, geniş enfeksiyon tanı parametreleri ticari olarak kolayca temin edilebilir, otomasyona uyarlanabilir ve bu sayede çok sayıda örnek üzerinde

kısa sürede çalışılabilir, sonuçlar kalitatif ya da kantitatif olarak değerlendirilebilir. Antikor ve antijen tayininde ELISA'nın pg/mL seviyesinde duyarlı olması onun çok yaygın olarak kullanımını sağlamaktadır (Hornbeck 1991).

- b. İmmunohistokimyasal teknikler; belli bir dokuda bulunan antijenlerin gösterilmesi için işaretlenmiş antikorların kullanılmasıdır. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikorlar içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, antikorlar spesifik olarak antijenlere bağlanır. Böylece antijen-antikor komplekslerinin yerleşimleri ya ışık (immünohistokimya) ya da elektron mikroskopla (ultrastrüktürel immunositokimya) gözlenebilir (Harlow ve Lane 1999).
 - c. İmmunblot teknikleri; bir protein solüsyonunda, aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemlerde hedef (aranan) antijen veya proteinin tanımlanması antijen-antikor etkileşimine dayalıdır (Gallagher ve ark 1998). Başlıca İmmunblot teknikleri; western blot, yatay akış aygıtı (lateral flow device) ve dot-blot'tır.
- 2- **İmmuno-fluoresans teknikler;** ELISA'ya çok benzerlik gösteren bir yöntemdir. En önemli farkı reaksiyonu görmek için enzim-substrat kompleksi yerine fluorokromların kullanılmasıdır. İmmuno-fluoresans teknikleri, antijen ve antikor reaksiyonlarının UV ışığında floresans parlama veren özel boyalarla gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Sıklıkla floresin izotiosiyanat (FITC) kullanılmaktadır. Testin değerlendirilebilmesi için floresans mikroskoba gereksinim vardır (Harlow ve Lane 1999). İmmuno-fluoresans tekniklerin en çok tercih edilenleri akış sitometrisi (flow cytometry) veya floresanla aktive edilmiş hücre taraması (FACS scan= fluorescence-activated cell scanning) yöntemleridir (Givan 2001).
- 3- **Radio-immunoloji testi (RIA);** bu yönteminin temeli EIA ile benzerdir. Ancak farklı olarak antikorda işaretleyici madde olarak radyoaktif madde (I.125, I.132) kullanılır ve sonuçlar gamma sayaçlarında değerlendirilir. Bu yöntem özellikle hormon testlerinde (TSH, T3, T4) kullanılmaktadır. Radyoaktif madde kullanımından dolayı tercih edilmemektedir (Yeo ve ark 1977, Spencer 2017).

2.9.4 Antikor temelli protein array

Protein- çip veya protein-array teknolojisinde temel prensip, özel hazırlanmış bir lam veya mikroküreler üzerindeki protein bilgilerinin, uygun yöntemler ve bir yazılım ile bilgisayar programına aktarılması ve bunların bilgisayar ekranında görünür hale

getirilmesidir. Sadece belli bir proteini bulmaya yönelik hazırlanan protein-array yönteminde biyolojik materyal çoğunlukla bir idrar veya kandır. Uygun koşullarla bu örneklerden hazırlanan lamlarda, istenen proteinin varlığı, mikroarray teknolojisi ile araştırılmaktadır. Burada kritik olan, bulunmak istenen proteinlere yüksek oranda bağlanabilme özelliğine sahip antikörlerin elde edilmesidir (Chapman 2002, Kodadek 2002).

Serolojik testlerde iki önemli kavram bulunmaktadır bunlar; sensitivite ve spesifite. Sensitivite, bir serolojik testin aranan antijenler veya antikörlerin varlığını saptayabilme yeteneğinin ölçüsüdür. Spesifite ise serolojik testin aranan antijenler veya antikörleri saptamada ne kadar özgül olduğunun göstergesidir. Monoklonal antikörlerin en büyük avantajı spesifitesinin yüksek olmasıdır. Monoklonal antikörler farklı tiplerde bulaşıcı hastalıkların hızlı ve doğru teşhisi için hem yüksek derecede spesifik hem de tekrarlanabilir immünolojik analiz sağlamaktadırlar (Smith 2012). MAbs birçok önemli parazitik helmintlerin (Zumaquero-Ríos ve ark. 2012); Plasmodium spp, dirofilariosis, trichinellosis, trypanosomosis, leishmanosis gibi protozoanın sebep olduğu (Srinivasan ve ark. 2014) hastalıkların; anthrax, bruselloz, paratuberculosis, leptospirosis, listeriyoz, klostridial enfeksiyonlar, mikoplazmoz gibi bakteriyel (Tamborini ve ark. 2010) hastalıkların; zygomycosis, cryptococcosis, histoplasmosis gibi fungal hastalıkların; şap hastalığı, sığır viral diyare, mavi dil, klasik domuz ateşi ve kuduz gibi viral hastalıkların tanısında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Ülkemizde de yaygın bir enfeksiyon olan ve hayvancılıkla uğraşılan yörelerde sık görülen Bruselloz, ekonomik kayıplara neden olan en geniş bakteri zoonozlarından biri olmakla birlikte genellikle geç hamilelik döneminde ineklerin düşük yapmasına sebep olmakta ve enfekte olan ineklerin sütünün kullanılması ile de insanlara bulaşabilmektedir. Monoklonal antikörlerin bilinen bir uygulaması da bu hastalığın neden olduğu Brucella abortusunun tanısında kullanılmasıdır (Deb ve ark. 2012).

Leptospirosis, hayvancılıkta ekonomik olarak önemli bir zoonotik bakteri enfeksiyonudur. Düşük, ölü doğum, kısırılık ve süt üretiminde azalmaya sebep olur (Deb ve ark. 2013). Hastalık teşhisi amacıyla geliştirilen mAb'ler yarışmalı ELISA tanı sistemlerinde kullanılmıştır.

Bulaşıcı Sığır Pleuropnömonisi (CBPP), *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*'in neden olduğu solunum yolu enfeksiyonudur (Abdo ve ark. 2000). Ayling ve ark.

tarafından immünohistokimiyada (İHC) şüpheli CBPP vakalarının tesbiti için bir mAb (M92 / 20) geliştirilmiştir (Ayling ve ark. 1999).

Şap hastalığı (FMD) dünya çapında sığırlarda Artiodactylae'yi etkileyen oldukça bulaşıcı bir hastalıktır ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (OIE) yayınladığı hastalık listesinde yer almaktadır. On altıncı yüzyıldan beri sığır endüstrisini tehdit eden önemli bir salgın hastalık olarak kabul edilmektedir (Verma ve ark. 2012, Deb ve ark. 2012). FMD virüsünün (FMDV) yedi serotipinin tümüne karşı tepki veren mAb temelli bir yatay akış aygıtı (LFD) (Reid ve ark. 2001) ve sandviç ELISA kitleri mevcuttur (Morioka ve ark. 2014).

Glutensiz olarak pazarlanan gıdalardaki çölyak toksik gluten proteinlerinin duyarlı ve spesifik ölçümü amacıyla geliştirilmiş çeşitli MAb'ler rapor edilmiştir (Ellis ve ark. 2017). Önemli kayıplara neden olan domates mozaik virüsü (ToMV) hastalığının tanısına yönelik olarak bu virüse karşı geliştirilmiş ve tütün mozaik virüsü (TMV) ile çapraz reaksiyon göstermeyen MAb'ler geliştirilmiştir (Duarte ve ark. 2001).

Monoklonal antikorlar viral hastalıkların saptanması için, özellikle teşhis edilmesi güç olan herpes virüsleri ve papillomavirüsler gibi kutanöz viral enfeksiyonları tespit etmek için kullanılmıştır (Molina-Ruiz ve ark. 2015).

Monoklonal antikorlar tanısında kullanıldığı diğer önemli hastalıklar ise enfeksiyona bağlı olmayan (NCDs= non-communicable diseases) hastalıklardır. Bu hastalıklar dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindedir. Dünya Sağlık Örgütüne göre, dünyada her yıl kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, kronik solunum yolu hastalıkları ve şeker hastalığından mustarip yaklaşık 40 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (Van horn 2009, Collier ve ark. 2012, Anonim 2017). Bu hastalıkların erken teşhisi, hastalık ilerlemesinin izlenmesi için önemli hale gelmiştir. Enfeksiyona bağlı olmayan hastalıkların tanısında spesifik biyobelirteçlere karşı geliştirilen monoklonal antikorlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyobelirteçler, biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik müdahalelerde farmakolojik tepkilerin göstergeleri olarak tanımlanır. Bunlar, belirli antijenlerin varlığı, yokluğu, olması gerektiğinden fazla veya az olması, enzim aktivitelerindeki değişiklikler ve DNA ile proteinlerde oluşabilecek eşsiz değişiklikler olarak sayılabilir (Strimbu ve Tavel 2010). Örneğin; Prostat kanserinde spesifik olarak eksprese edilen bir prostata özgü antijeni (PSA) (Gretzer ve Partin 2003), kolorektal kanserde kanserojenik embriyonik antijeni (CEA) (Crawford ve ark. 2003) saptamak amacıyla

geliştirilmiş çeşitli monoklonal antikolar bulunmaktadır. MAb'lara dayalı tanı sistemlerin kullanıldığı bir diğer önemli hastalık ise Kistik Fibrozis (KF) hastalığıdır. KF; solunum sistemi, gastrointestinal ve üreme sistemi mukus bezlerini, ter bezlerini ve pankreası etkileyerek, akciğerler ve sindirim sistemini kalın ve yapışkan bir mukoz salgı ile tıkayan beyaz ırkta en sık rastlanan otozomal resesif (çekinik) geçiş gösteren ölümcül bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda sıklığının 3000 doğumda 1 civarında olduğu bildirilmektedir (Cutting 2015). Bu hastalığın tarama programındaki ilk aşaması bebeklerin topuk kanından İmmun Reaktif Tripsinojen (IRT) ve Pankreatitle ilişkili Protein (PAP) düzeylerinin incelenmesidir. Bu amaç için IRT düzeylerinin ölçümünde kullanılan çeşitli MAb temelli ELISA kitleri bulunmaktadır. Serumda PAP düzeyinin belirlenmesine yönelik testlerin sayısı oldukça sınırlıdır.

2.10 Pankreatit ile İlişkili Protein (PAP)

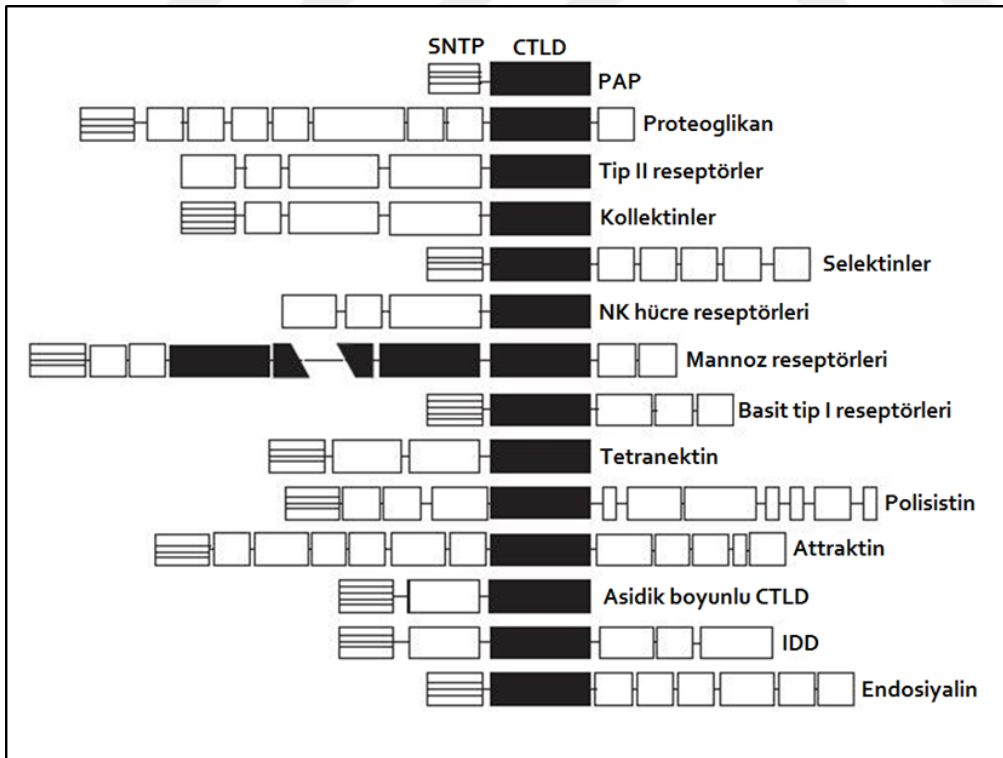
PAP'a ait elde edilen değerlerin Kistik Fibrozis ve diğer birçok hastalıkların tanısında önemli bir veri olduğu yapılan ve yapılmakta olan son çalışmalarda ortaya konmaktadır.

2.10.1 PAP'ın tarihçesi

Keim ve arkadaşları, 1984'te akut pankreatit indüksiyonu sonrasında sıçanların pankreas öz suyunda yeni bir protein saptadılar (Keim ve ark. 1984). Bu salgı proteininin, pankreatit indüksiyonu sonrasında ortaya çıktığı ve takip eden 3-4 gün boyunca aşırı eksprese edildiği buna karşın kontrol farelerinde bulunmadığı görülmüştür. Bunun yanısıra proteinin pankreas homojenatında ve zimojen granüllerde de varlığı rapor edilmiştir. Pankreatit indüksiyonu ile olan ilişkisi nedeniyle, keşfedilen bu proteine "pankreatit ile ilişkili protein (Pancretitis Associated Protein) " veya PAP adı verilmiştir. Dört yıl sonra, Tachibana ve meslektaşları sıçan hipofizinden salgılanan peptit 23 adını verdikleri, büyüme hormonu salma ajanı (GHRH) tarafından uyarılan ve somatostatin tarafından inhibe edilen bir protein keşfettiler (Tachibana ve ark. 1988). Bu çalışmalar esnasında peptit 23'ün henüz birincil yapısı çözülmemişti. 1995 yılında Katsumata ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar ile 1988'de tanımlanan peptit 23 ile PAP'ın aynı olduğunu rapor ettiler (Katsumata ve ark. 1995). Son olarak, Lasserre ve arkadaşları PAP mRNA'sını 29 hepatosellüler karsinom vakasının 7'sinde aşırı eksprese edildiğini saptadılar ve bu proteini HIP olarak isimlendirdiler (Lasserre ve ark. 1992). Bu nedenle bu protein, peptid 23, HIP ve PAP olmak üzere 3 ayrı şekilde adlandırılmaktadır.

2.10.2 PAP'ın moleküler yapısı

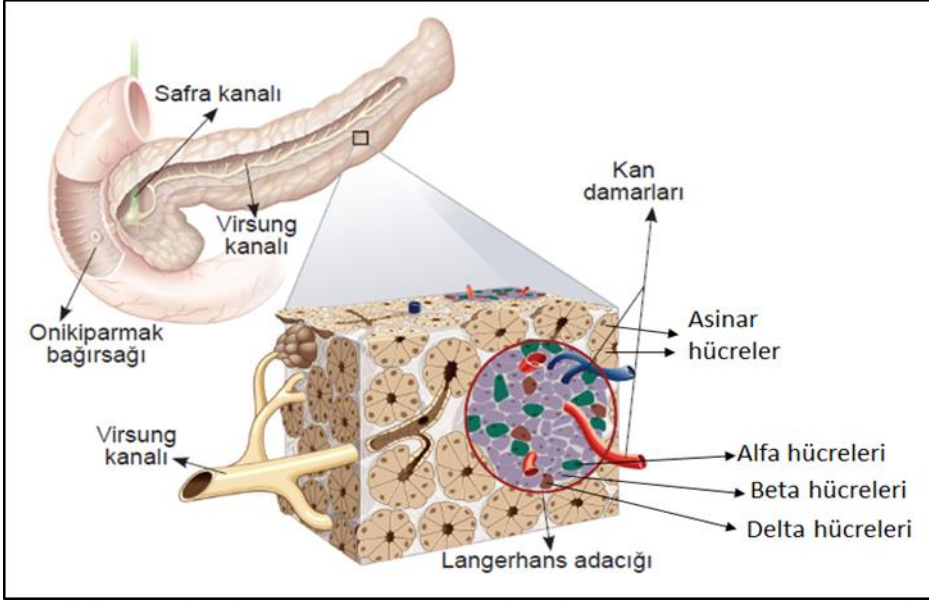
PAP dizisinin bilgisayar analizi, lektinlerle yapısal bir ilişkisi olduğunu düşündürmektedir. PAP ile diğer hayvan ve insan lektinleri arasında %16 ila %26 değişen oranda benzerlik bulunmaktadır. Bununla birlikte, eritrosit aglütinasyonu veya farklı karbonhidratlara özgü afinite sütunlarının yüzeyine tutundurma da dahil olmak üzere, karbonhidrat bağlama aktivitesini karakterize etme çabaları başarısız olmuştur (Iovanna ve ark. 1991). PAP geninin yapısal organizasyonu, lektin genlerinin evrimsel gelişimine yönelik yeni ipuçları ortaya koymaktadır. PAP kodlama sekansı altı ekson üzerinde uzanır ve varsayılan karbonhidrat tanıma bölgesi, IV, V ve VI eksonları tarafından kodlanır. Bu gen organizasyonu, PAP'ın, aynı karbonhidrat tanıma domaine sahip atasal öncüllerinden farklı bir süreçle evrimleşen yeni bir lektin grubuna ait olduğunu göstermektedir (Dusetti ve ark. 1993). PAP, C-tipi lektinler arasında bildirilen en küçük proteindir. Aslında PAP; bir sinyal peptidine bağlı, tek bir karbonhidrat tanıma domaininden oluşurken, diğer C-tipi lektinler, kombine şeker bağlanma konsensusu ile birlikte lektinlerin spesifik fonksiyonlarını sunan çeşitli diğer protein domainlerine de sahiptirler (Christa ve ark. 1994). Buna karşılık, PAP'ın ek işlevsel domaini yoktur (Şekil 2.13)



Şekil 2.13. Farklı C-tipi lektinlerde protein domainlerinin şematik gösterimi (Closa ve ark. 2007)

2.10.3 PAP'ın ekspresyonu

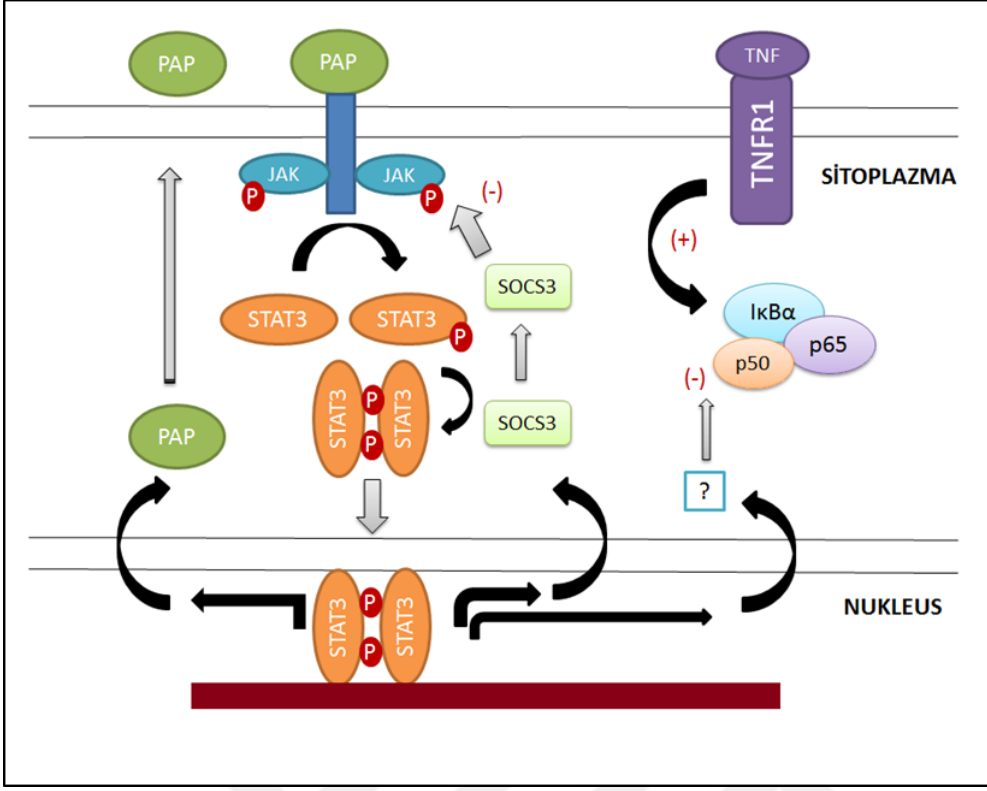
Sağlıklı pankreaslarda PAP, Langerhans adacıklarının α -hücrelerinde (Şekil 2.14) yapısal olarak eksprese edilir (Christa ve ark. 1996). Ancak ekzokrin pankreasta sadece asinar hücreler zarar gördüğünde eksprese edilebilmektedir (Orelle ve ark. 1992). Aslında PAP ekspresyonu pankreatik asinar hücrelerde; akut ve kronik pankreatit (Orelle ve ark. 1992), hipoksi (McKie ve ark. 1996), toksinler (Chen ve ark. 1996), diyabet (Baeza ve ark. 2001), lipopolisakkarid (Vaccaro ve ark. 2000), hipotransferrinaemia (Simpson ve ark. 1997) ve doku nakli (Van Der Pijl ve ark. 1997) gibi durumlarda oluşan hasarlara cevap olarak aktive edilir. Bununla birlikte, PAP pankreas dokusu ile sınırlı değildir ve birçok organda gözlenebilir. Örnek olarak Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi kronik inflamatuvar, bağırsak hastalıkları ve enflamatuvar bağırsak hastalığı olan hayvan modelleri (IBD) verilebilir (Lawrance ve ark. 2001). PAP; Alzheimer hastalarının beyin dokusunda (Ozturk ve ark. 1989, Duplan ve ark. 2001), uterusun lüminal epitel hücrelerinde (Chakraborty ve ark. 1995), gelişen motoneuronların bir alt popülasyonunda, periferik yaralanma sonrası duyu nöronlarında ve motonöronlarda eksprese edilebilmektedir (Livesey ve ark. 1997, Averill ve ark. 2002). PAP mRNA ekspresyonunun duktal kökenli pankreatik adenokarsinomların %80'inde ve müsinöz kistadenomların %30'unda aktif olduğu bildirilmiştir (Xie ve ark. 2003). PAP mRNA ekspresyonu seviyeleri; nodal invazyon, uzak metastaz varlığı ve kısa süreli sağkalım ile ilintilidir. Ayrıca, bazı olgularda, peritümöral bölgeler PAP'ın aşırı eksprese edilmesine neden olmuştur (Rosty ve ark. 2002), bu durum pankreatik kanserli hastalarda tümör ve peritümöral hücrelerin gözlenen yüksek PAP serum düzeyine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Karaciğerde birincil hepatokarsinomanın yaklaşık %30'unda PAP'ın kuvvetli olarak aktive edildiği buna karşın bu organda PAP'ın ekspresyonunun tümör gelişimini indüklemediği ifade edilmektedir (Simon ve ark. 2003).



Şekil 2.14. PAP'ın sentezlendiği Langerhans adacığı (Anonim 2003)

Son yıllarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, PAP'ın enflamasyon önleyici etken olarak rol aldığı bulunmuştur. PAP ekspresyonu hem anti-enflamatuar sitokinler hem de kendisi tarafından JAK/STAT3-bağımlı yolak vasıtası ile uyarılmaktadır (Şekil 2.15).

Bunula birlikte, PAP aynı yolağı kullanarak enflamasyon önleyici faktör olan SOCS3'ün ekspresyonu etkinleştirebilmektedir. JAK/STAT3/SOCS3 yolağı; PAP ve çeşitli sitokinler arasında ortak bir nokta oluşturmaktadır. Bu nedenle, PAP yeni bir anti-inflamatuar sitokin olarak düşünülmektedir (Closa ve ark. 2007).



Şekil 2.15. PAP tarafından aktive edilen anti-inflamatuar yolak (Closa ve ark. 2007)

2.10.4 Hastalık belirteci olarak PAP

Keşfedilmesinin hemen ardından, patolojik durumlarda pankreas asinar hücrelerinin PAP'ın ana kaynağı olduğunu açık olarak belirlenmiştir. Morisset ve arkadaşları, sıçanlarda akut pankreatitin deneysel modelini kullanarak, PAP'ın indüklenmesini ve zimojen granüllerde lokalizasyonunu buldular (Morisset ve ark. 1997). Bu sırada hastalığın ilerleyişi sırasında PAP'ın ekzokrin pankreastaki up-regülasyon modeli de Bodeker ve arkadaşları tarafından tanımlandı (Bödeker ve ark. 1998). Pankreatik RNA'lar ile gerçekleştirilen Northern blot analizi ile elde edilen profiller, pankreatik protein ekstraktları kullanılarak yapılan Western Blot ve immün tarama ile elde edilen profillerin insan hastalıklarında ve hayvan modellerinde eş değer olduğu görülmüştür. Sağlıklı pankreaslarda PAP bulunmaması ve PAP'ın hastalığın erken evresinde görülen kuvvetli indüksiyonu, PAP'ın stres proteini ya da hücre hasarına cevaben üretilmesi indüklenen bir akut faz proteini olabileceğini düşündürmektedir. Protein ekspresyonunda ani değişikliklerle karakterize edilen pankreatik akut faz cevabı, pankreatik bezdeki hasar veya enfeksiyonların açık bir göstergesidir. PAP, hücresel strese yanıt olarak pankreatik hücreler tarafından aşırı eksprese edildiğinden, serumda bulunan PAP'nın farklı pankreas hastalıklarının bir göstergesi olup olmayacağı değerlendirilmiştir. İlk retrospektif çalışmada akut pankreatitte PAP'nın yararlı bir serum

markeri olabileceği önerilmiştir (Iovanna ve ark. 1994). Özellikle serumda bulunan PAP konsantrasyonlarının sürekli yükselmesi pankreatitin halen sürmekte olduğunu gösterir. Pankreas kanseri durumunda PAP aşırı ekspresyon edilir ve pankreatik karsinomların malignant ductural yapılarında gözlemlenebilir (Xie ve ark. 2003). Bir diğer araştırma ise, PAP'ın invaziv adenokarsinomaya komşu olan akini'de güçlü bir şekilde ekspresyon edildiğini göstermiştir, bu da PAP salınımının ana kaynağının pankreatik öz su olduğunu düşündürmektedir (Rosty ve ark. 2002). PAP'ın aşırı ekspresyonunun; nodal tutulum, uzak metastaz ve kısa sağkalım ile yüksek korelasyon içinde olması sebebiyle, insan pankreas duktal adenokarsinomasındaki PAP ifadesinin tümör saldırganlığının bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür (Xie ve ark. 2003). Kalp yetmezliği (KY) vakalarında PAP hastalığının şiddeti için yeni bir prognostik belirteç olarak değerlendirilmiş ve PAP düzeylerinin, KY'li hastalarda hastalık şiddeti ile korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca kardiyorenal sendrom, nörohormonal aktivasyon vakaları için de bir gösterge olduğu bulunmuştur (Fitzgibbons ve ark. 2014).

Akut pankreatit üzerine yapılan çalışmalar, PAP'ın kan konsantrasyonunu Kistik Fibrozis (KF) taraması için de kullanılabileceğine düşündürmüştür. Kistik fibrozis (KF), Kafkas popülasyonlarında otozomal resesif geçiş gösteren en yaygın genetik bozukluklardan biridir (Keim ve ark. 1984). Bu hastalık, Kistik Fibrozis Transmembran Regülatörü (CFTR) geninde bir mutasyon sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Yenidoğan taraması ile KF'nin erken teşhisi ve tedaviye mümkün olduğunca erken başlanarak malnutrisyonun önlenmesi ve geri dönüşümsüz akciğer hasarının önlenmesini hedeflenmektedir. Yenidoğan taramasında İmmün Reaktif Tripsinojen (IRT) analizlerinde yüksek oranda yalancı pozitif test sonuçlarının varlığı ek doğrulayıcı testlere ihtiyaç olduğunu ortaya çıkarmıştır (Cheillan ve ark. 2005, Ross 2008). Son yıllarda birçok ülkede KF için yapılan testlere ikinci bir doğrulayıcı test olarak Pankreatitle ilişkili Protein (PAP) testi ilave edilmekte ve kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Böylece sonuçlara kontrollü ve hızlı bir şekilde ulaşılması mümkün olabilmektedir (Sarles ve ark. 1999, 2005, 2014, Barthellemy ve ark. 2001, Sommerburg ve ark. 2010, 2015, 2017, Stopsack ve Hammermann 2011).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hücre hatları ve hayvan materyalleri

Bu tez çalışmasında *in vitro* çalışmalar için F0 isimli myeloma hücre hattı (ATCC CRL-1646) kullanılmıştır. *In vivo* çalışmalarda ise Balb/C fareleri ve bu farelerden elde edilen makrofaj ve dalak hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları

TÜBİTAK deney hayvanları ünitesinden temin edilmiştir. (TÜBİTAK HADYEK Etik Kurul No 16563500-111-187)



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Balb/C fareleri (TÜBİTAK MAM GMBE)

3.1.2 Kullanılan kimyasal malzemeler

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Üretici Firma	Madde Adı	Üretici Firma
2- propanol	VWR Chemicals	Human PAP (Reg3A)	Sino Biological
4X Laemmli Sample Buffer	BioRad	IRT2 antijeni	RayBiotech
50X HAT	Gibco	IsoStrip Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Roche
50X HT	Gibco	K ₂ HPO ₄	Merck
8- Azoguanin	Sigma	KH ₂ PO ₄	Merck

Acrylamide	BioRad	KOH	Sigma
Albumin Bovine	Sigma	Magnezyum Klorit	Sigma
Amonyum PerSülfat	Sigma	Methanol	Merck
Amonyum Sülfat	Merck	MgCl ₂	Sigma
Anti Fare Ig(G,A,M)–Alkalın Fosfataz Konjugatı	Sigma	Mouse Reg3A	Sino Biological
Anti Fare IgG Alkalın Fosfataz Konjugatı	Sigma	Mouse immunglobulin Isotyping ELISA kit	Roche
Anti Rabbit IgG Alkalın Fosfataz Konjugatı		NaBH ₄	Sigma
apo-Transferrin	Sigma	NaCl	Sigma
Asetik asit	Merck	NaHCO ₃	Sigma
BCIP/ NBT Substrate	Sigma	NaIO ₄	Sigma
Bis-N,N'-Methylene Bis-Acrylamide	BioRad	NaOH	Merck
Çinko Klorit	Sigma	PEG4000	Merck
DiSodyumHidrojenFosfatHeptahidrat	Merck	p-nitrophenyl fosfat	Sigma
DMEM	Sigma	PNPP	Sigma
DMSO	Sigma- Aldrich	Protein A	GE
Etanol	Merck	SDS	Sigma
FCS	Biochrom	Sitrik Asit	Sigma
Formaldehyde solution about 37%	Merck	Skim Milk powder	Fluka
Freunds' Adjuvant, complete	Sigma	Sodyum Bikarbonat	Sigma
Freunds' Adjuvant, incomplete	Sigma	Sodyum DiHidrojen Fosfat	Merck
Gentamycin	Gibco	Sodyum Sitrat	Sigma
Glacial Asetik Asit	Merck	Sodyum Tiyosülfat Pentahidrat	Merck

Glisin	Sigma	TEMED (N,N,N',N' Tetra Metil Etilen Diamin	Sigma
Glukoz	Sigma	Trisma Base	Sigma
HCl	Merck	TriSodium Sitrat DiHidrat	Merck
Hemoglobin	Sigma	Trypan Blue	Biological Industry
HEPES	Sigma	Tween 20	Sigma
Human hemoglobin	Sigma	Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo
Human Reg3G	Sino Biological	ZnCl ₂	Sigma

3.1.3 Kullanılan cihazlar ve diğer malzemeler

Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma	Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
+4 Dolap	Bosch	Santrifuj tüpü 1,5, 2 ml	Eppendorf
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	Thermo	0,22 µm şırınga filtresi	Millipore
-20 Dolap	Bosch	1, 5, 10 ve 50ml enjektör	SET
300 µl 'lik çok kanallı pipetler	Thermo	1,8 ml kriyotüp	VWR
50, 250, 500 ve 1000 cc şişe	Schott	2, 5, 10, 50 ml serolojik pipet	TPP
0,1-10 µl, 10-200 µl,50-1000 µl, 1000-5000 µl pipet ucu	Eppendorf	15, 50 ml falkon	TPP
Blotlama cihazı	BioRad	175 cm ² hücre petrisi	NUNC
Buz makinesi	Scotsman AF100	25 cm hücre kazıyıcı	Costar
Çalkalayıcı	BioSan	25 cm ² filtreli hücre petrisi	TPP
ELISA 96 kuyulu plakları	Nunc	30 cm hücre kazıyıcı	TPP

ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre)	BioTek Instruments	39 cm Hücre kazıyıcı	Costar
ELISA çoklu plak yıkama cihazı	BioTek Instruments	40 cm hücre kazıyıcı	Greiner
Fraksiyon ayırma makinesi	BioRad	75 cm ² filtreli hücre petrisi	BD Falcon
Güç kaynağı	BioRad	96 kuyucuklu hücre plağı	Corning
Hassas terazi	Precisa Gravimetrics AG	Ezici	Sigma
Hava akımlı kabinler	Heraus	Hemasitometre	Bright Line
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica	Inverted mikroskop	Olympus
İzotiplendirme Kiti	Roche	Karbondioksitli inkübatör	Heraus
Jel Elektroforez Sistemi	BioRad	Laminar Hava Akış Kabini	Esco
Lateks eldiven	Broche	Makas	Sigma
Liyofilizatör	Martin Christ	Otomatik pipet	Eppendorf
Manyetik karıştırıcı	Sigma- Aldrich	Pens	Sigma
Masaüstü Santrifüj	Eppendorf	Vakum filtrasyon	VWR
Mini masaüstü santrifüj	LMS Harmony	Sıvı Azot tankı ve azot taşıma tankları	Union Carbide Nitrogen
Orbital Karıştırıcı	Edmund Bühler	Spektrometre	Biochrom Libra
Otoklav	Sistek	Tek kullanımlık pipet uçları	Eppendorf
Peristaltik Pompa	Pharmacia	Ultrasantrifüj	Hitachi
pH metre	Mettler Toledo	Ultrasonik banyo	Bandelin
Protein A, Protein G kolonu	GE	Pudrasız Eldiven	Broche
Sıcak su banyosu	Nüve	PVDF membran	Thermo
Vorteks	Scientific Industries	Santrifüj tüpü 0,2 ml	Eppendorf

3.1.4 Kullanılan solüsyonlar ve tamponlar

SDS PAGE jel içeriğinin hazırlanması

- %10 SDS
 - 10g SDS, 100ml dH₂O içerisinde çözülmüştür.
- %30 Akrlamid/ Bisakrlamid
 - 29,1g akrilamid ile 0,9g Bis-akrlamid 100ml dH₂O içerisinde karanlıkta çözülmüştür.
- %10 APS
 - 0,1g APS 1ml dH₂O içerisinde çözülmüştür. Kullanılmadan hemen önce taze hazırlanmıştır.
- Tris-HCl (1,5M pH:8.8)
 - İstenilen hacim kadar 1,5M Tris-base tartılmış ve distile su içinde çözülmüştür. HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır.
- Tris-HCl (1M pH:6.8)
 - İstenilen hacim kadar 1M Tris-base tartılmış ve distile su içinde çözülmüştür. HCl ile pH 6.8'e ayarlanmıştır.
- 10X SDS Yürütme Tamponu
 - 30,3g Tris-base, 144,1g Glisin ve 10gr SDS tartılarak 1lt distile su içinde çözülmüştür. 1X oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Gümüş boyama çözeltilerinin hazırlanması

- Fiksasyon Tamponu:
 - %50 MetOH, %12 Asetik Asit, 0,5ml %37 Formaldehit olacak şekilde hazırlanmıştır. dH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- Yıkama Tamponu:
 - %50 EtOH, %50 dH₂O olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Ön Muamele Tamponu:
 - 0,2g Na₂S₂O₃. 5H₂O 1 litre çözelti için tartılarak hazırlanmıştır.
- Bant Fiksasyon Tamponu:
 - AgNO₃ (2g/lt) ve 0.75 ml %37 Formaldehit çeker ocak altında hazırlanmıştır.
- Geliştirme Tamponu:

- 60g/lt Na_2CO_3 , 4 mg/lt $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ve 0,5ml %37 Formaldehit ile çeker ocak içerisinde hazırlanmıştır.
- Durdurma Tamponu:
 - %50 metanol, %12 Asetik asit olacak şekilde hazırlanmıştır. dH_2O ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- Son Yıkama Tamponu:
 - %50 metanol, %50 dH_2O olacak şekilde hazırlanmıştır.

Western Blot çözeltilerinin hazırlanması

- Fosfat Tamponu:
 - 150mM KH_2PO_4 ve 150mM K_2HPO_4 çözeltileri hazırlanmıştır. KH_2PO_4 solüsyonunun pH' sı K_2HPO_4 ile 7,2' ye ayarlanarak kullanılmıştır.
- 1X PBS:
 - 10mM fosfat tamponu ve 150mM NaCl istenilen hacim kadar dH_2O içinde çözülüp hazırlanmıştır.
- 1X TBS:
 - 9.68g Tris-Base ve 32g NaCl tartılıp 1lt dH_2O içerisine eklenmiş, ardından pH 7,6'ya ayarlanmıştır.
- 1X TBS-T:
 - 1 litre TBS çözeltisi içerisine 0,5ml Tween-20 eklenmiştir.
- 1X Transfer Tamponu:
 - 0.592g Tris-Base ve 0.293g Glisin tartılarak 1lt distile su içinde çözünmüştür. %10 SDS çözeltisinden 337 μl eklendikten sonra pH 9,2'ye ayarlanmıştır. Mevcut hacmin %20'si kadar metanol eklenerek kullanılmıştır.
- %1 Membran Bloklama Solüsyonu:
 - %1 yağsız süt tozu 1X TBS içinde çözülmüş ve membran bloklamada kullanılmıştır.
- Substrat Tamponu:
 - 10 ml dH_2O içerisine 1 tablet BCIP/NBT Substratı çözdürülerek hazırlanmıştır.

İmmünizasyon ve kan alımları için gerekli çözeltilerin hazırlanması

- İmmünizasyon işleminin daha başarılı olması ve alınacak muhtemel cevapların daha kuvvetli olması için PBS içindeki belirlenen antijen miktarı Freund's' adjuvan ile 1:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. Fareye yapılan ilk immünizasyon complete adjuvanla, ardından gelen immünizasyonlar Freund's' incomplete adjuvanla yapılmıştır. Füzyona alınacak fareye yapılan rapel (hatırlatma) ise yalnızca PBS ve belirlenen antijen karışımıyla yapılmıştır.
- Sodyum Sitrat Hazırlanması:
 - 2,3 gram sodyum sitrat, 0,8 gram sitrik asit ve 2,2 gram glikoz 100 ml distile su içinde çözülmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

Dolaylı ELISA çözeltilerinin hazırlanması

- Yıkama Tamponu
 - 1X PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween-20 eklenerek hazırlanmıştır.
- Bloklama Tamponu
 - %5 yağı alınmış süt tozu 1X PBS içinde çözülmüş ve plate bloklamada kullanılmıştır.
- Substrat Tamponu
 - 0,027 gram ZnCl₂, 0,04 gram MgCl₂ ve 1,5 gram glisin 200 ml dH₂O içerisinde çözülmüş ve katı KOH yardımıyla pH 10,4'e ayarlanmıştır.
- Substrat Çözeltisi
 - 1mg/ml para-nitrofenil fosfat, substrat tamponu içinde çözülmüş ve hazırlanmıştır. Taze kullanılmıştır.

Hücre kültüründe kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- DMEM
 - 13,36 gram DMEM, 2 gram Sodyum Bikarbonat ve 5,96 gram HEPES 1 litre otoklavlanmış dH₂O içerisinde çözülmüştür. NaOH ile pH 7,2'ye ayarlandıktan sonra hücre kültürü kabiniinde vakum filtrasyon sistemi ile filtrelenmiş ve kullanılmıştır. Kullanım oranı çalışılan hücreye bağlı olarak değişmektedir.

- PEG Çözeltisi
 - 2 gram PEG, 1ml PBS ve 1ml dH₂O içerisinde hazırlanmıştır. Füzyondan hemen önce otoklavlanmış ve 37°C’de steril koşullarda saklanmıştır.
- HAT içeren besi yeri
 - Büyütme besi yerine %2 oranında (40ml/L) HAT (50x) eklenerek hazırlanmıştır.
- HT içeren besi yeri
 - Büyütme besi yerine %2 oranında (20ml/L) HT (50x) eklenerek hazırlanmıştır.
- Dondurma besi yeri
 - %20 FCS, %80 DMEM ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) veya %90 FCS ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) şeklinde hazırlanıp kullanılmıştır.

Antikor saflaştırılması için gerekli çözeltilerin hazırlanması

- Doymuş Amonyum Sülfat çözeltisi
 - Belirlenen miktarda çözelti için dH₂O içerisinde çökme gözlenene kadar amonyum sülfat eklenmiştir.
- Bağlama Tamponu
 - 3M NaCl, 1,5M Glisin istenilen hacimde çözülmüş, NaOH ile pH 8’e ayarlanmıştır.
- Elüsyon Tamponu
 - 0,1M Glisin hazırlanmış HCl ile pH 2,7’ye ayarlanmıştır.
- Denge Tamponu
 - 1M Trizma Base hazırlanmış HCl ile pH 9’a ayarlanmıştır.

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

3.2 Yöntemler

3.2.1 SDS-PAGE ve western blotlama

İmmünizasyonlara başlamadan önce ticari olarak temin edilen immunizasyonda kullanılacak olan hedef proteinlerin nitel analizlerini yapmak ve nicelikleri hakkında fikir sahibi olmak amacıyla sırasıyla SDS-PAGE ve Western Blotlama tekniği kullanılmıştır. SDS-PAGE için jel hazırlanmış ve 4X Laemmli Buffer ile uygun oranda karıştırılmış olan proteinler kuyucuklara yüklenmiştir. Stacking jel boyunca proteinler 80V'de yürütülmüş, seperating jel kısmına geçtiğinde 120V'de yürütülmeye başlatılmış ve boya jel dışına çıkana kadar yürütme işlemine devam edilmiştir. Çizelge 3.3'de SDS-PAGE için kullanılan solüsyonlar yer almaktadır.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE için kullanılan solüsyon miktarları

	Seperating (%12)		Stacking (%5)
dH2O	3,3ml	dH2O	3,4ml
Tris-HCl (1,5M pH:8,8)	2,5ml	Tris-HCl (1M pH:6,8)	630µl
%10 SDS	100µl	%10 SDS	50µl
%10 APS	100µ	%10 APS	50µl
%30 Acrylamide	4ml	%30 Acrylamide	830µl
Temed	4µl	Temed	5µl

Yürütme işlemi biten jeldeki proteinler Western blotlama işlemi öncesinde metanolle aktifleştirilmiş PVDF membrana, BioRad Transblot transfer sistemi yardımıyla transfer edilmiştir. İşlem bittikten sonra jel Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak kontrol edilmiştir. Membranda non-spesifik bantların oluşmaması amacı ile %1 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T'de gece boyu +4°C'de bloklanmıştır. Bloklama işleminin ardından membran üç defa 1X TBS-T ile yıkandıktan sonra 1X TBS içinde 1:1000 oranında dilue edilen uygun monoklonal primer antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Primer antikor muamelesinden sonra membran tekrar 1X TBS-T ile üç defa yıkanmış ve bu sefer 1:4000 oranında dilue edilmiş olan alkalen fosfatazla işaretlenmiş uygun sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İşlem sonunda membran son kez 1X TBS-T ile yıkanmış ve substrat solüsyonu içinde kontrollü bir şekilde oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından elde edilen görüntü için gerekli değerlendirmeler yapılmıştır.

Gümüş boyama

SDS-PAGE aşamasından sonra proteinlerin kalitatif analizlerini yapabilmek amacıyla gümüş boyama tekniği kullanılmıştır.

Uygulanan protokolda sırasıyla şu işlemler gerçekleştirilmiştir; ilk olarak yürüme işleminden çıkan jel en az bir saat fiksasyon tamponu içerisinde çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Fikse olan jel, 20'şer dakikada bir buffer değiştirmek suretiyle 1 saat yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra jel 1 dakika ön muamele tamponu ile inkübe edilmiş ardından distile su ile üç defa 20'şer saniye çalkalanmıştır. Bant fiksasyon tamponu içinde 20 dakikalık inkübasyondan sonra jel 2 defa 20'şer saniye distile su ile yıkanmış ve geliştirme tamponu eklenmiştir. Geliştirme basamağı, jeldeki proteinler gözlemlenebilir hale gelene kadar devam ettirilmiştir. Reaksiyonun durması için jel, durdurma tamponu içinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından yıkama tamponu içine alınan jel tarama işleminin ardından değerlendirilmiştir.

3.2.2 Bağışıklama

Fare immünizasyonu

İmmünizasyon çalışmalarında kullanılmış olan PAP (Reg3A) antijeni Sinobiological (11235-H08H) firmasından temin edilmiş, fare immünizasyonlarında kullanılmıştır.

İmmünizasyon amacıyla PAP antijeni 14 gün ara ile 5 kez 6-8 haftalık dişi BALB/C farelerinin deri altına enjekte edilmiştir. Fareler 5 bireyden oluşan iki gruba ayrılmış ve birinci gruba hayvan başına 25 µg, ikinci gruba 50 µg PAP antijeni uygulanmıştır. İlk immünizasyon öldürülmüş *Mycobacterium tuberculosis* içeren complete Freund's' adjuvan ile birlikte yapılmış, ardından gelen bütün immünizasyonlar sadece mineral yağ içeren incomplete Freund's' adjuvanı ile yapılmıştır.

Adjuvan ile PBS içerisindeki antijen 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. İmmünizasyonu gerçekleştirilen fareler; kulağı işaretli fare (NK), sağ kulağı işaretli fare (SaK), sol kulağı işaretli fare (SoK), her 2 kulağı da işaretlenmiş fare (SSK) ve sağ kulağı V şeklinde işaretlenmiş fare (SaKV) olacak şekilde isimlendirilmiştir (Çizelge 3.4). İmmünizasyonlardan sonra uygun ve yeterli cevap alınabilen fareler son kez intravenöz olacak şekilde hatırlatma immünizasyonuna tabii tutulmuş ve bu işlemde yaklaşık 4 gün sonra füzyona alınmıştır. Adjuvanın hiç kullanılmadığı bu hatırlatma immünizasyonunda normalde kullanılmış olan antijen miktarının yarısı uygulanmıştır.

Cizelge 3.4. İmmünizasyonda kullanılan farelerin işaretleme şekilleri

PAP Antijeni		Fare İşaretlemesi
Grup 1	Grup 2	
25 µg/fare	50 µg/fare	NK (Kulağı işaretli fare)
25 µg/fare	50 µg/fare	SaK (Sağ kulağı kesik fare)
25 µg/fare	50 µg/fare	SoK (Sol kulağı kesik fare)
25 µg/fare	50 µg/fare	SSK (Sağ ve sol kulağı kesik fare)
25 µg/fare	50 µg/fare	SaKV (Sağ kulağı V şeklinde kesik fare)

Antijen kaplama optimizasyonu

Bu amaçla dolaylı (indirek) ELISA yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu ELISA plaklarına 20, 50 ve 100 ng olmak üzere farklı konsantrasyonlarda PAP antijeni ile kaplama yapılmış, gece boyu +4°C’de inkübe edilmiştir. Gece boyu bekletilen plak 1X PBS-T ile 3 kez yıkanmış ve ardından 2 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama solüsyonunda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 1X PBS-T ile 3 kez yıkanan plakaya, PBS içerisinde seyreltilmiş 50ng ve 100ng monoklonal antikor (Anti-human Reg3A PAP Rabbit MAb) eklenmiş ve 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. 1X PBS-T ile 3 kez daha yıkandıktan sonra kuyular alkalın fosfataza bağlı 1/2000 dilüsyondaki Anti-Rabbit-IgG sekonder antikorunu ile 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar son kez 1X PBS-T ile bu defa 5’er kez yıkanmış ve üzerlerine 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrat (p-nitrophenyl fosfat) çözeltisi eklenmiştir. Plaka bu işlemde sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 ve 60 dakika inkübe edilmiş ve 405nm’de ELISA okuyucusunda absorbansları ölçülmüştür.

Bu optimizasyon çalışması; 25, 50, 75 ve 100 ng olmak üzere dört farklı dozda antijen, 1:100, 1:1000, 1:5000 ve 1:10000 olmak üzere dört farklı dilüsyon oranında poliklonal fare serumunda antikor olarak kullanılarak da yapılmıştır.

İmmün yanıt kontrolü

İmmünize edilmiş farelerden alınan serum örneklerinin immün yanıtlarını kontrol etmek için dolaylı ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için öncelikle plaklara kaplanacak antijen miktarının optimizasyonu yapılmış ve netice olarak kuyu başına 100 ng PAP antijeni kullanılması uygun bulunmuştur. Bu amaçla; 96 kuyucuklu plak her kuyuda 100 ng PAP antijeni olacak şekilde kaplanmış ve +4°C’de gece boyu bekletilmiştir. Ardından

kuyucuklar 3'er defa 1X PBS-T ile yıkanmış ve %5 yağsız süt tozu eklenip 37°C'de 1 saat bloklamaya bırakılmıştır. Bloklamanın ardından kuyucuklar 1X PBS-T ile 3'er defa yıkanmış ve bu defa test edilmek istenen serum örnekleri 1/100, 1/500, 1/1000 olacak şekilde 1 X PBS içinde seyreltilerek kuyulara eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklar tekrar 1 X PBS-T ile 3'er defa yıkanmış ve 1/3000 oranında Alkalen Fosfataz enzimi ile işaretli keçiye geliştirilmiş anti fare polivalenti eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Kuyucuklar son kez 1X PBS-T ile bu defa 5'er kez yıkanmış ve üzerlerine 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrat (p-nitrophenyl fosfat) çözeltisi eklenmiştir. Plaka bu işlemden sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 ve 60 dakika inkübe edilmiş ve 405 nm'de ELISA okuyucusunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.3 Myeloma hücrelerinin hazırlanması

Dondurulmuş hücrelerin açılması

Sıvı nitrojende (-196°C) dondurma tüpleri içerisinde stoklanmış myeloma hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürülerek içerisine 8ml taze besi yeri ilave edilerek 15ml'lik steril santrifüj tüpüne alınmıştır. 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı faz atılmış ve hücre pelleti taze besi yeri ile çözülerek yeni hücre kültür şişesine ekimi yapılmıştır.

Hücrelerin sayımı

Hücre sayımı için miktar tayini yapılmak istenen hücre süspansiyonundan 10-20 µl kadar alınmış ve 1:1 oranında Trypan Blue ile karıştırılmıştır. Trypan Blue ölü hücrelerin zarlarından diffüze olarak bu hücreleri boyabilmektedir. Diffüze olamadığı sağlıklı hücreler de parlak ve beyaz görünür. Bu sayede hücrelerdeki yaşam oranı hakkında da fikir sahibi olunmuş olur. Trypan Blue – hücre karışımı hemositometreye alınarak ve 25 kareye düşen hücre miktarı sayılmıştır. Karelerdeki toplam hücre sayısı x 10⁴ mililitre başına düşen hücre sayısını vermektedir. Bu işleme kullanılan dilüsyon oranı da çarparak eldeki hücre süspansiyonundaki yaklaşık sayı belirlenmiştir.

Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması

Kullanılan F0 myeloma hücreleri %10 – 20 FBS ve %0,1 Gentamisin içeren DMEM besi yerinde büyütülmüştür. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarındaki inkübatörde muhafaza edilmiştir. Hücre kültürü için kullanılan bütün sıvı malzemeler

kullanılmadan önce 37°C'lik su banyosunda ısıtılmıştır. Kullanılan hücreler %70'lik yoğunluğa eriştiklerinde alt pasajlama yapılmıştır.

Hücre pasajındaki aşamalar sırasıyla; hücre kültür şişesindeki üst sıvı steril bir kaba alınmıştır. Şişeye 1X PBS eklenmiş ve yüzeye tutunmuş haldeki hücreler scrapper yardımı ile nazıkçe kaldırılarak santrifüj tüpüne toplanmıştır. 1000 rpm'de 7 dakika kadar santrifüj edilerek çöktürülmüştür. İki kez yıkama işleminden geçirilen hücre pelleti %10 FBS içeren DMEM ile çözülmüş ve istenilen oranda yeni hücre kültür şişelerine ekim yapılmıştır.

Hücre kültür şişesinden kaldırılan hücreler 1X PBS ile yıkandıktan ve santrifüjle çöktürüldükten sonra %70 FBS, %20 DMEM, %10 DMSO içeren dondurma besi yeri ile çözülmüş ve her bir dondurma tüpünde 1×10^6 - 5×10^6 hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. İlk olarak -80°C'de bir gece bekleyen hücreler uzun süreli muhafaza için sıvı nitrojen tankına kaldırılmıştır.

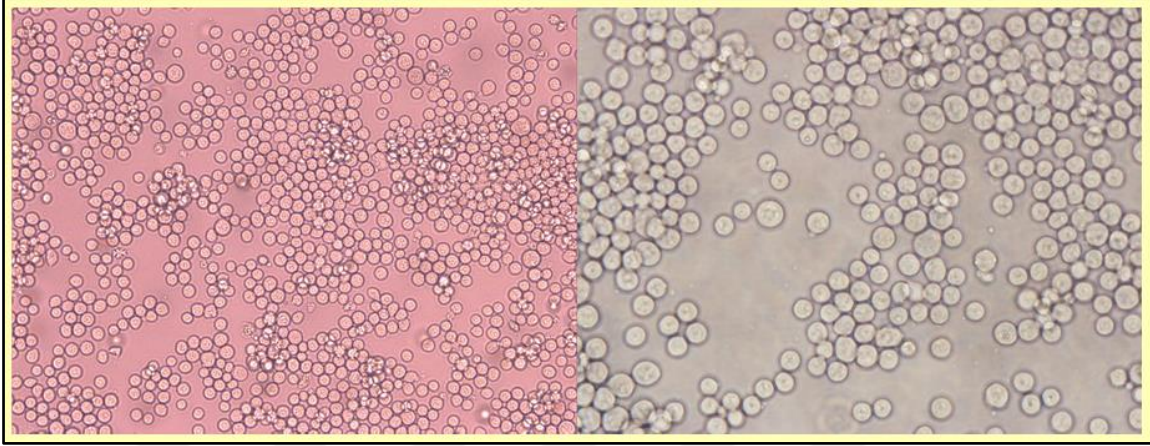
Myeloma hücrelerinin füzyona hazırlanması

Füzyon işleminde kullanılmak üzere yukarıda anlatıldığı şekilde önceden çoğaltılarak stoklanmış F0 (CRL – 1646, ATCC) myeloma hücreleri füzyondan 10 gün önce kültüre edilmiştir (Şekil 3.2). Hücreler ilk kültüre alındığında büyüme besi yeri içerisine 20µg/ml Azoguanin eklenerek bir seçim yapılmış ve HGPRT (+) mutanti olan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Füzyon esnasında kullanılacak hücreler sırasıyla; hücre kültür kabından kaldırılmış ve 50ml'lik santrifüj tüplerinde toplanmıştır. İki defa serumsuz DMEM veya PBS ile yıkanarak 1250rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılmış ve hücre pelleti istenilen hacimde serumsuz DMEM ile çözülüp hemositometre lamında sayılmıştır. Sayım işlemi ile füzyonda kullanılacak myeloma/dalak hücresi oranı ve mevcut myeloma hücrelerinin canlılık oranları hesaplanmıştır.

3.2.4 Besleyici hücrelerin hazırlanması

Füzyon işleminden bir gün önce hibrit hücrelerin yaşaması için uygun ortam koşullarını sağlamak amacıyla herhangi bir immünizasyon işlemi görmemiş bir fareden, besleyici hücre (feeder) ismi verilen makrofaj hücreler, albümin, sitokin bakımından oldukça zengin olan besleyici besi yeri alınmıştır. Bu işlem için fare servikal dislokasyon ile öldürülmüş ve %70 EtOH içinde bekletilmiştir. Laminar akımlı kabinde strafor üzerine sırt üstü sabitlenmiş, pens ve makas yardımı ile periton zarına zarar vermeden hayvanın derisi yüzülmüştür. 5 cc'lik enjektörler ile 5ml kadar serumsuz DMEM periton zarı içerisine

herhangi bir iç organa temas etmeden enjekte edilmiş ve tekrar geri çekilmiştir. Besleyici hücreler; sayımları yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plaklara yaklaşık 6000 hücre olacak şekilde %80 DMEM, %20 FBS ve %0,1 Gentamisin içeren besi yeri içerisinde kuyulara dağıtılmıştır. Hücrelerin morfolojileri ve yoğunlukları mikroskopta kontrol edilmiştir.



Şekil 3.2. F0 myeloma hücrelerinin 4X mikroskopik görüntüsü

3.2.5 Bağışıklanmış B hücrelerinin hazırlanması

PAP antijeni ile immünize edilmiş ve alınan kan örneklerinin ELISA kontrollerinde en yüksek antikör yanıtı veren fare füzyon için seçilmiş, servikal dislokasyon ile öldürülüp %70 EtOH içinde alınmıştır. Laminar akımlı kabin içinde strafor üzerine sabitlenmiş ve karın bölgesinden kesilerek dalağı çıkarılmıştır. Dalak, varsa yağlarından mümkün olabildiğince temizlenmiş ve steril bir petride süzgeç ve baget yardımı ile süspansiyon edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu 50ml'lik santrifüj tüpüne alınmış ve serumsuz DMEM veya PBS ile yıkılarak santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti istenilen hacimde serumsuz DMEM ile çözülüp hemositometre lamında sayılmıştır. Aynı fareden ELISA testlerde pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla kalp kanı alınarak serumu ayrılmış ve -20°C'de stoklanmıştır.

3.2.6 Myeloma ve bağışıklanmış dalak hücrelerinin birleştirilmesi (füzyon)

Kullanılacak F0 myeloma hücreleri ve B lenfositler ayrı ayrı sayılarak, 1:3 oranında karıştırılmış ve serumsuz DMEM ile yıkama işleminden sonra, 1250rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Myeloma/lenfosit pelletine sırasıyla;

- 1 dakika içerisinde 1ml 37°C de ısıtılmış 1 ml Polietilen Glikol (PEG-4000) pellet karıştırılarak yavaşça ilave edilmiştir.

- Bir dakika bekletildikten sonra dakikada 1ml olacak şekilde 4ml serumsuz DMEM yavaşça ve pellet karıştırılarak eklenmiştir.
- Ardından 10ml serumsuz DMEM yavaşça eklenmiş ve karışım 5 dakika 37°C'deki CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra hücre karışımı 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek PEG ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Hücre pelleti %20 FBS, %2 HAT ve %0,1 Gentamisin içeren DMEM içinde çözünmüş ve önceden besleyici besi yeri eklenmiş olan 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 150µl olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Füzyon işleminden sonra hücreler 10 gün boyunca hiçbir işlem uygulanmadan %5 CO₂, 37°C ısı ve %96 nemli ortamda inkübe edilmiştir. 10. günde bütün kuyucukların kontrol edildiği ve hibrit arandığı füzyon tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibrit gözlenen kuyulardan üst sıvı toplanmış ve dolaylı ELISA ile test edilmiştir. Üst sıvısı toplanmış hücreler tekrar %2 HAT içeren besi yeri ile beslenmiştir. Füzyonun 12. gününde HAT içeren besi yeri çekilmiş ve ardından %2 HT içeren seçici besi yeri eklenmiştir. Hücrelerin gelişimine bağlı olarak normal hücre kültür besi yerine (%10 FBS içeren) geçilmiştir.

3.2.7 Hibridoma hücrelerinin seçimi ve klonlama

Füzyondan sonra hücre kültür inkübatörüne bırakılan 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları 10.günde invert mikroskop ile taranarak ve hibrit hücre tespit edilen kuyular işaretlenmiştir. Hibrit hücre bulunan kuyucuklardan üst sıvı toplanarak PAP antijenine karşı antikor aktiviteleri dolaylı ELISA ile test edilmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakalar optimize edilen 100ng/kuyu PAP antijeni ile kaplanmış ve gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklar 3'er defa 1X PBS-T ile yıkanmış ve %5 yağsız süt eklenip 37°C'de 1 saat bloklamaya bırakılmıştır. Bloklamanın ardından kuyucuklar 1X PBS-T ile 3'er defa yıkanmış ve bu defa test edilmek istenen üst sıvı örnekleri kuyucuklara eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kuyucuklar tekrar 1X PBS-T ile 3'er defa yıkanmış ve 1/3000 oranında Alkalin Fosfat enzimi ile işaretli keçide geliştirilmiş anti fare polivalenti (IgM, IgG, IgA) eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Kuyucuklar son kez 1X PBS-T ile bu defa 5'er kez yıkanmış ve üzerlerine 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrat (p-nitrophenyl fosfat) çözeltisi eklenmiştir. Plaka bu işlemden sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 ve 60 dakika inkübe edilmiş ve 405 nm'de ELISA okuyucusunda absorbansları ölçülmüştür.

Tek düşürme (Limited Dilüsyon) yöntemi ile klonlama

Füzyon neticesinde dolaylı ELISA ile tespit edilen PAP antijenine karşı spesifik antikör üreten hibrit hücrelerden, tek klondan oluşan hibritleri elde etmek amacıyla tek düşürme işlemi yapılmıştır. Bu amaçla her kuyuya tek hücre düşecek şekilde bir dilüsyon yapılmış ve 96 kuyucuklu plakaya paylaştırılmıştır. 10 gün sonra hibrit hücre gözlemlenen kuyuların üst sıvıları dolaylı ELISA ile test edilmiş ve uygun cevabı veren klon yeniden tek düşürme işlemine tabii tutulmuştur.

3.2.8 Monoklonal antikörlerin karakterizasyon çalışmaları

Çapraz reaksiyon kontrolü

PAP antijenine karşı geliştirilen monoklonal antikörlerin spesifitesini ve diğer benzer proteinlerle etkileşimini belirlemek amacıyla çapraz reaksiyon kontrolü yapılmıştır. Bu kontrol için; kuyucuklar her kuyuda 100ng olacak şekilde, PAP antijeni (Reg3A), fare Reg3A antijeni, insan Reg3G antijeni transferrin, insan serum albümin, insan hemoglobin, IRT2 antijeni ve 1:1000 oranında seyreltilmiş insan serumu ile kaplanmış ve devam eden aşamalarda indirekt ELISA protokolü uygulanmıştır. Bu amaçla Çizelge 4.5’de verilen deney düzeneği kurulmuştur. Ardından sonuçlar değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.5. Çapraz belirleme için dolaylı ELISA deney düzeneği

	9B7	14D8	8H10	1E9
PAP				→
IRT2				→
Tavşan Serumu				→
Hemoglobin				→
Keçi Serumu				→
Transferrin				→
İnsan Serumu				→
BSA				→
PBS				→

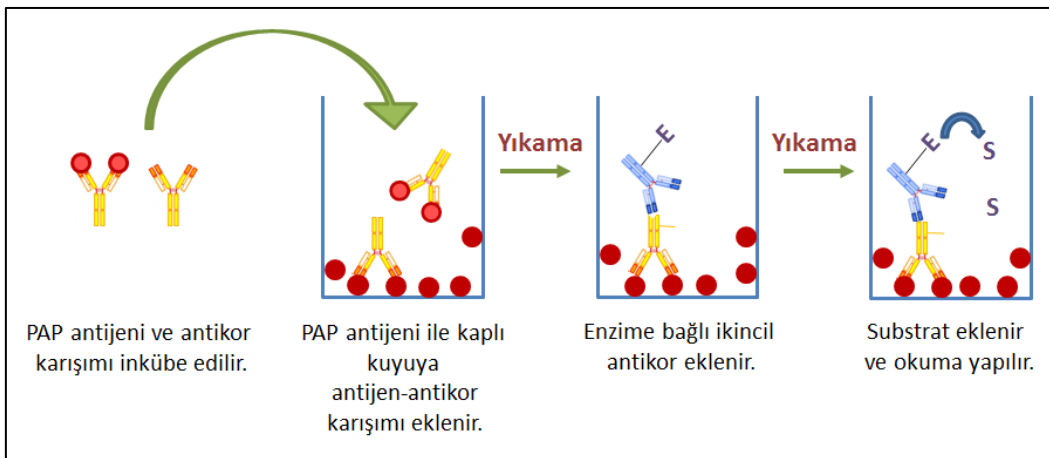
Antikörlerin izotipinin belirlenmesi

Elde edilmiş monoklonal antikörün ağır ve hafif zincir izotiplerinin belirlenmesi için Roche Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit kullanılmıştır. Tespit edilmek

istenen antikorun olduğu üst sıvı reaksiyon tüpünde 1:100 oranında PBS ile seyreltilmiştir. Kitin içindeki stripler bu karışım içerisinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Bantlar görünür olduğunda strip örnek tüpünden çıkarılmış ve sonuçları kaydedilmiştir. Elde edilen verileri kontrol etmek amacıyla eş zamanlı Mouse İmmüoglobulin Isotyping ELISA Kit de kullanılmıştır.

Antikorların afinitesinin belirlenmesi

Antikorların özgün olduğu antijene bağlanma ilgisinin (afinite) düzeyini belirlemek amacıyla yarışımlı ELISA yönteminden faydalanılmıştır (Şekil 3.3). Bu yöntemde, ilk olarak 96 kuyucuklu plak kuyu başına 100ng olacak şekilde PAP antijeni ile kaplanmış ve gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Ardından plak 3 defa 1X PBS-T ile yıkanmış ve %5 oranında yağsız süt tozu ile 37°C'de 1 saat bloklanmıştır. Bu esnada yarıştırlacak olan farklı konsantrasyonlardaki PAP antijenleri ile afinitesi tespit edilmek istenilen farklı antikorlar eppendorf tüp içerisinde 37°C'de 30 dakika birlikte inkübe edilmiştir. ELISA Plakda bloklama süresi tamamlandıktan sonra 3 kez 1X PBS-T ile yıkanmış ve hazırlanmış olan antikor-antijen karışımı kuyulara eklenmiştir. Yine 1 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklar 1X PBS-T ile 3'er kez yıkanmış ve 1/3000 oranında Alkalin Fosfataz enzimi ile işaretli keçide geliştirilmiş anti fare polivalenti eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Kuyucuklar son kez yıkanarak üzerlerine 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrat (p-nitrophenyl fosfat) çözeltisi eklenmiştir. Plaka bu işlemten sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 ve 60 dakika inkübe edilerek 405 nm'de ELISA okuyucusunda absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile Mario H. Vargas tarafından hazırlanan ED50plus v.1 (2000) yazılımı kullanılarak antikorların IC50 değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Anti PAP antikorları ile yapılmış yarışımlı ELISA şeması

Hibridomaların geniş ölçekli üretimi

PAP antijenine spesifik ve monoklonal olduğundan emin olunan hibrit hücreler, yüksek miktarda antikor elde etmek amacıyla 96 kuyucuklu plakalardan sırasıyla 24'lük hücre kültür plaklarına, 6'lı plaklara, T25 cm², 150 cm² ve 175 cm²'lik (TPP) flasklarına alınmış ve kültüre edilmiştir. Her pasaj işleminde üst sıvı toplanmış ve antikor üretiminin devamlılığını görebilmek amacıyla dolaylı ELISA ile antikor yanıtları her aşamada test edilmiştir.

3.2.9 Monoklonal antikorların saflaştırılması

Yeterli miktarda monoklonal antikor üreten hücre kültür üst sıvısı elde edildikten sonra saflaştırma çalışmaları başlatılmıştır.

Amonyum sülfat ile çöktürme

Saflaştırılmak istenen üst sıvıya, üst sıvının 1,1 katı miktarında doyurulmuş amonyum sülfat çözeltisi, +4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde 60 dakika içerisinde ilave edilmiştir. Yaklaşık 4 saat +4°C'de karıştırıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiler uygun şişelere alınmış ve yüksek hızlı santrifüjde 10000rpm'de +4°C'de 35 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pellet PBS ile çözüldükten sonra PBS'a karşı en az 4 defa değişim yaparak +4°C'de diyaliz edilmiştir.

İmmünoafinite kolon kromatografisi ile saflaştırma

Elde edilmiş monoklonal antikorların hücre kültür üst sıvısında bulunan diğer proteinlerden ayrılabilmesi için antikorları Fc kuyruğundan spesifik olarak bağlayan Protein A bağlı katı faz üzerinde immünoafinite kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kolondan sırasıyla; kolon hacminin 5 katı kadar bağlama tamponu, 1:1 oranında bağlama tamponu ile karıştırılmış saflaştırılacak örnek, tekrar bağlama tamponu ve absorbans değeri sıfırlanana kadar elüsyon tamponu geçirilmiştir. Son olarak kolonu temizlemek amacıyla %20 etanol geçirilmiştir. Protokol detayı şu şekildedir; kolon, kullanılabilir hale gelmesi için kendi hacminin 5 katı kadar bağlama tamponu ile yıkanmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürülüp diyaliz edilen protein fraksiyonları 10 dakika boyunca 13200rpm'de santrifüj edildikten sonra üst faz ayrı tüpe alınmış ve 1:1 oranında bağlama tamponu ile dilue edilmiştir. Elde edilen antikor ve bağlama tamponu karışımı 0,45µm filtreden geçirildikten sonra kolona verilmiş ve fraksiyonlar 1,5ml'lik eppendorf tüplere toplanmıştır. Tüplerin spektrofotometrede 280nm dalga boyuna karşı ölçümleri yapılmıştır. Ardından absorbans değeri sıfırı gösterene kadar kolondan bağlama tamponu geçirilmiştir.

Sonrasında kolon materyaline bağlanmış olan antikorların eldesi için kolondan elüsyon tamponu geçirilmiş ve toplanan fraksiyonların absorbands değeri sıfırlanana kadar bu işleme devam edilmiştir. Antikorlar 75ul denge (Neutralizing) tamponu içeren tüplerde 1'er ml olmak üzere toplanmıştır. Kolon ise tekrar kullanılmak üzere absorbands değerleri kontrol edilerek %20 etanol ile yıkanmış ve +4°C'de saklanmıştır. Kromatografi sonucunda elde edilen bütün kolon fraksiyonları antikor aktivitesi ve antikor elüsyon performansının tespiti amacıyla indirekt ELISA ile kontrol edilmiştir.

3.2.10 Antikorların liyofilizasyonu ve ekstinksiyon katsayılarının hesaplanması

Saflaştırma sonucu yüksek antikor cevabına sahip olan fraksiyonlar bir araya toplanmış ve dH₂O'ya karşı +4°C'de diyaliz edilmiştir. Ardından santrifüj tüpü içerisinde toplanmış ve ağzı parafilm ile kapatıldıktan sonra üzerinde küçük delikler açılmıştır. Örnekler gece boyu -80°C'de dondurulmuştur. Dondurma işleminden sonra liyofilizatör cihazında gün boyu liyofilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bir Molar çözeltinin 1 cm'lik küvette verdiği absorbands, molar ekstinksiyon katsayısı olarak adlandırılmaktadır. Birçok bileşik karakteristik absorbsiyon spektrumu verir. Bilinmeyen bir bileşiğin absorbsiyon spektrumu bu bileşiğin kantitatif karakterizasyonunu sağlamaktadır. Bu amaçla, liyofilize edilen örneklerden 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,1mg/ml ve 0,05mg/ml'lik örnekler hazırlanarak 280nm'deki absorbandsları ölçülmüş ve bu değerler kullanılarak bir eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin eğiminden yola çıkarak ekstinksiyon katsayıları belirlenmiştir.

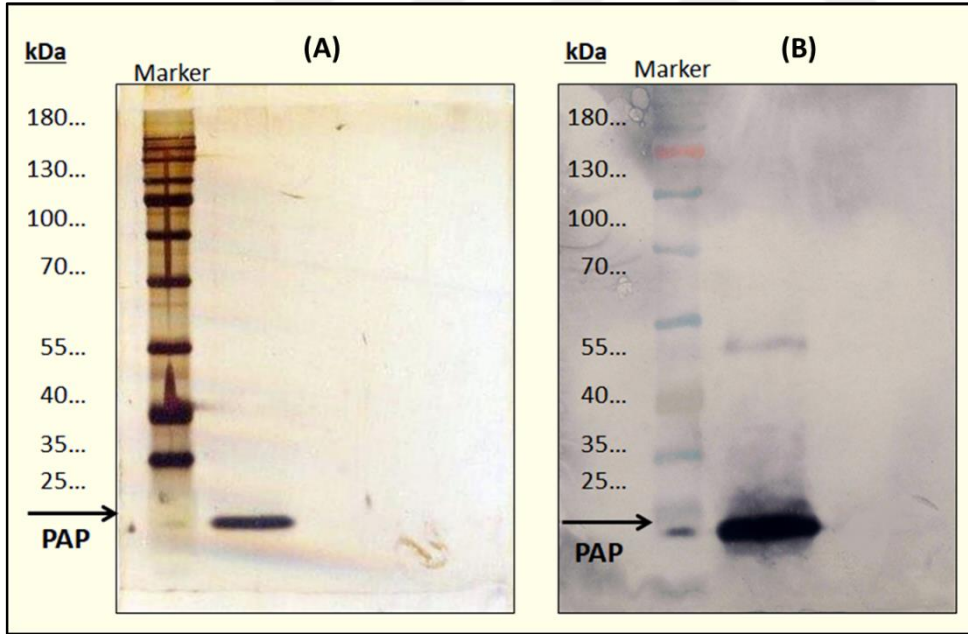
İstatistiksel analizler

Bu tez çalışmasında bütün deneyler iki grup en az 4 deney tekrarlı yapılmıştır. ANOVA testi kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 İmmünizasyonda Kullanılan PAP Antijen Yapısının İncelenmesi

İmmünizasyon çalışmalarında kullanılan PAP antijeni (Reg3A) Sinobiological (11235-H08H) firmasından temin edilmiş ve tüm çalışma bu antijenle yürütülmüştür. Antijenin stabilitesinin korunması için temininden hemen sonra çalışmaya uygun şekilde aliquotlar hazırlanmış ve eppendorf tüpler içerisinde -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Deney sırasında kullanılan aliquotların daima bir kez çözülürük kullanılması sağlanmıştır. İmmünizasyon işlemlerine başlamadan önce, Sinobiological firmasından alınan PAP antijeninin karakterizasyonu hakkında fikir sahibi olmak ve kontrolünü sağlamak amacıyla SDS-PAGE, daha sonra western blotlama ve gümüş boyama teknikleri kullanılmış ve neticesinde Şekil 4.1'deki sonuçlar elde edilmiştir. Marker olarak Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder kullanılmış ve sonuçlarda da görüldüğü üzere yaklaşık 18,4 kDa ağırlığındaki PAP antijeninin literatürde belirtilen mevcut protein yapı ve özelliklerine uyumlu olduğu belirlenmiştir.

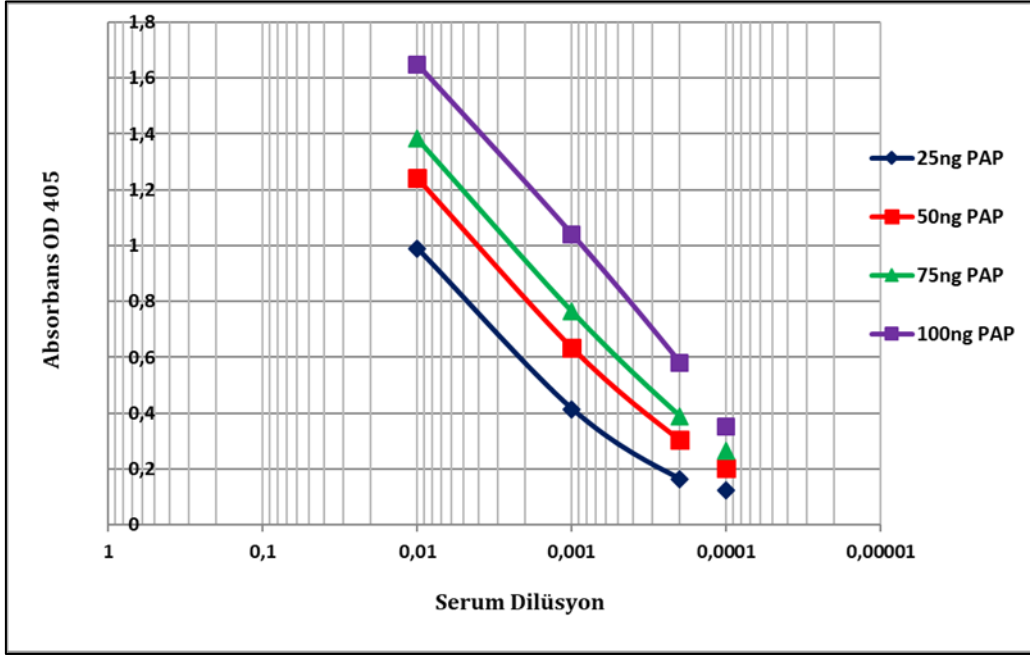


Şekil 4.1. Ticari PAP antijeninin jel gümüş boyama (A) ve immünoblotlama (B) görüntüleri

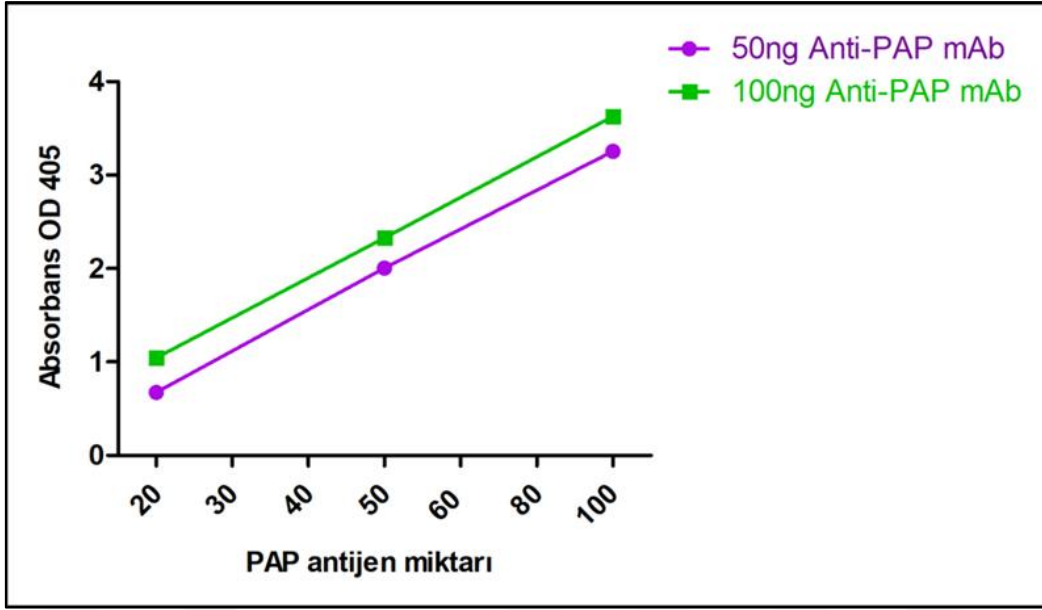
4.2 Antijen Kaplama Miktar Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan PAP antijeninin serumdaki antikor ile en optimal birleşme konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla dolaylı ELISA yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki PAP

antijeni (kuyucuk başına 25ng, 50ng, 75ng ve 100ng) 96 kuyucuklu plaklara kaplanmış ve Anti-PAP antikorunu içeren bağışıklanmış fare serumlarının farklı dilüsyonları (1/100, 1/1000, 1/5000 ve 1/10000) ile ticari olarak temin edilmiş olan saf anti-PAP tavşan monoklonal antikorunun kuyu başına 50ng ve 100ng miktarları denenerak antijen kaplama optimizasyonu yapılmıştır. Gözlemlenen antijen-antikor reaksiyon seviyeleri fare serumları ile Şekil 4.2, ticari monoklonal antikor ile Şekil 4.3’de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki PAP (25ng, 50ng, 75ng ve 100ng)’ın farklı dilüsyonlardaki bağışık fare serumu ile (2.immünizasyon) verdiği bağlanma etkinliği



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki PAP antijeninin (20ng, 50ng, 100ng) 50 ve 100ng anti-PAP monoklonal antikor ile verdiği bağlanma etkinliği

Elde edilen sonuçlara göre ilerleyen deneylerde ELISA plaklarını kaplamak için kullanılacak antijen miktarı kuyucuk başına 100ng veya 50ng PAP antijeni olacak şekilde seçilmiştir.

4.3 Fare İmmünizasyon Sonuçları

PAP antijenine karşı monoklonal antikor üretmek amacıyla immünizasyon uygulamalarında iki deney grubunda, beşer adet 6-8 haftalık Balb/C türü fare kullanılmıştır.

1. Grup: 25 µg/fare PAP olacak şekilde, 14 gün aralıklarla deri altından enjeksiyonlar yapılmıştır.
2. Grup: 50 µg/fare PAP olacak şekilde, 14 gün aralıklarla deri altından enjeksiyonlar yapılmıştır.

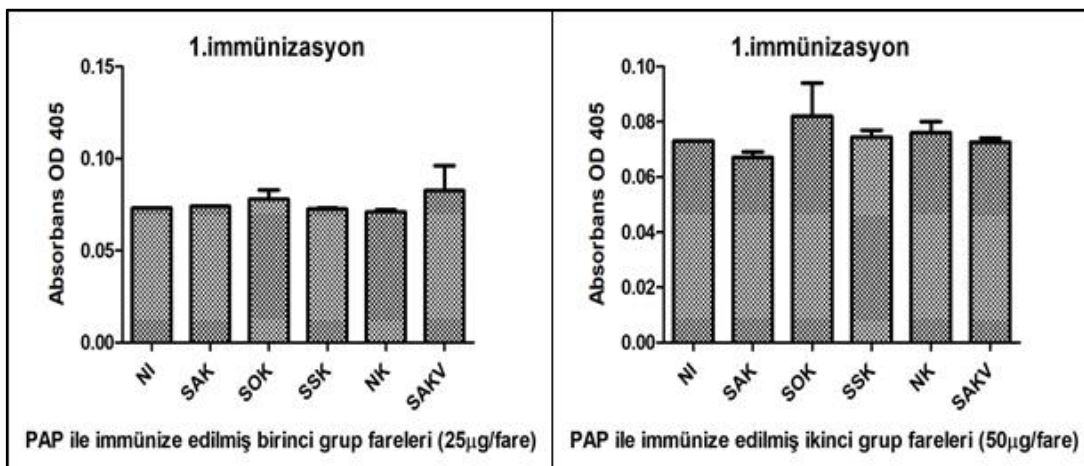
İmmünizasyon uygulamaları, enjeksiyon yöntemi ve kullanılan antijen miktarları Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Farelere uygulanan PAP antijeninin immünizasyon programı ve içerikleri

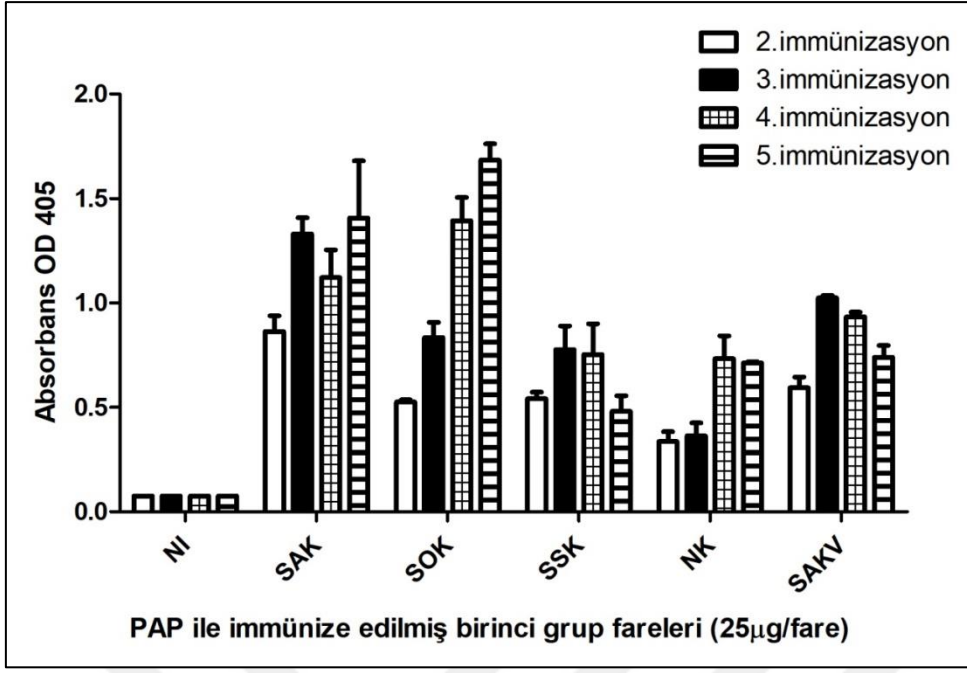
İmmünizasyonlar	Doz	İmmünizasyon Tarihi	Uygulama Yolu
1.İmmünizasyon	25µg antijen/fare	13.06.2016	İntraperitoneal
	50µg antijen/fare		
2.İmmünizasyon	25µg antijen/fare	27.06.2016	İntraperitoneal
	50µg antijen/fare		
3.İmmünizasyon	25µg antijen/fare	11.07.2016	İntraperitoneal
	50µg antijen/fare		
4.İmmünizasyon	25µg antijen/fare	25.07.2016	İntraperitoneal
	50µg antijen/fare		
5.İmmünizasyon	25µg antijen/fare	8.08.2016	İntraperitoneal
	50µg antijen/fare		

İmmünize edilmiş farelerin her enjeksiyondan 10 gün sonra serumlarındaki antikor aktivitelerinin belirlenmesi için kuyruk kanları alınmış ve sodyum sitrat içerisinde santrifüj edilerek serumu ayrılmıştır. Ardından dolaylı ELISA ile test edilmiştir. Birinci immünizasyon sonrasındaki her iki deney grubunun sonuçları Şekil 4.4’de, 2.,3.,4. ve 5.immünizasyonlar sonrası elde edilen immun yanıtlarının seviyelerini belirlemek üzere yapılan 1.grubun ELISA test sonuçları Şekil 4.5’de, 2.grubun sonuçları ise Şekil 4.6’de gösterilmiştir.

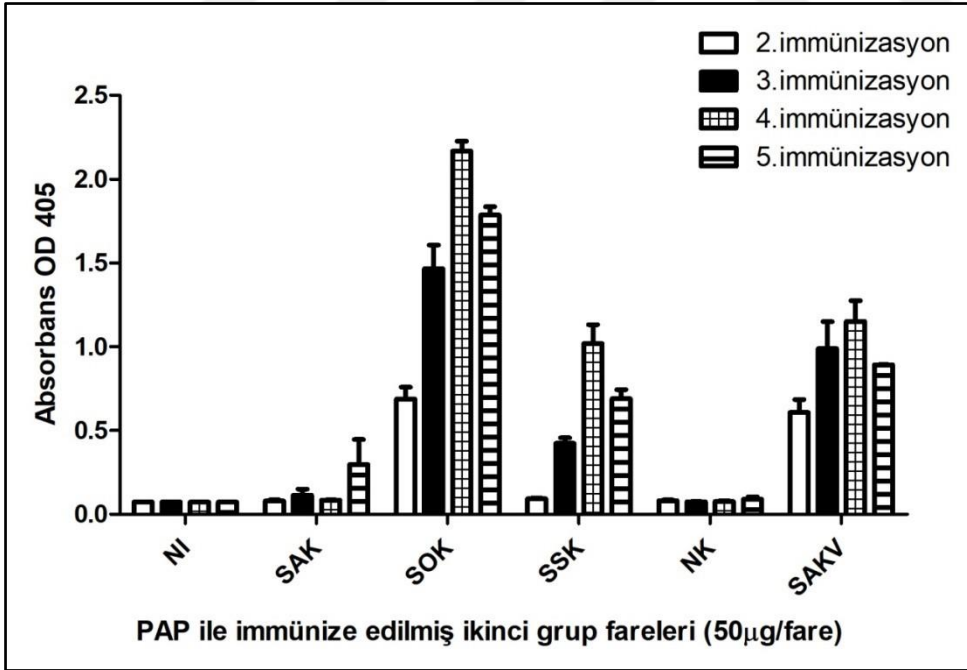
İmmünize edilmiş fareler sırasıyla; non-immünize (NI), sağ kulağı kesilmiş (SAK), sol kulağı kesilmiş (SOK), sağ-sol kulağı kesilmiş (SSK), normal kulak (NK) ve sağ kulağı v şeklinde kesilmiş (SAKV) isimleriyle işaretlenmiş ve bütün deney düzeneklerinde bu şekilde kullanılmıştır.



Şekil 4.4. PAP ile immünize edilmiş iki grup farenin 1.immünizasyon sonrası antikor yanıt kontrolü



Şekil 4.5. 25µg/fare PAP ile immünize edilmiş birinci grup farelerinin devam eden immünizasyonlar sonrası (1/1000 serum dilüsyonu) verdikleri antikor cevapları $p < 0.0001$



Şekil 4.6. 50µg/fare PAP ile immünize edilmiş ikinci grup farelerinin (1/1000 serum dilüsyonu ile) immünizasyonlar sonrası verdikleri antikor cevapları $p < 0.0001$

Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretiminde farklı özelliklerde ve farklı yapıda tasarlanmış çeşitli adjuvanlar kullanılmaktadır. Bunlardan yaygın olarak kullanılanları Specol (Leenaars 1995, 1998), Montanide incomplete Seppic adjuvants (ISAs1) (Leenaars ve ark. 1995, 1998), TiterMax ve TiterMax Gold (Bennett ve ark. 1992), RIBI Adjuvant System (RAS) (Johnston ve ark. 1991; Leenaars ve ark. 1995, 1998) adjuvanlarıdır. Ancak keşfedildiğinden beri (Freund 1956, Freund ve McDermott 1942, Freund ve ark. 1937) Freund's complete adjuvanı antikor üretiminde en yaygın ve etkili adjuvandır. FCA'nın genel immüno stimülatör yetenekleri herhangi bir adjuvan tarafından bugüne kadar aşılammıştır (Stills ve Bailey 1991). Hem complete hem de incomplete Freund's adjuvanlar güçlü immün sistem uyarıcı özelliği ve hü moral yanıtı indüklemesi nedeniyle fare immünizasyonları için en uygun adjuvan olarak seçilmiş ve çalışmada kullanılmıştır. Freund adjuvanı ile immünize edilen hayvanlarda immün cevabın çok uzun süreler korunduğu ve içeriğindeki mikobakteri lizatının T hücrelerini aktifleştirerek B hücrelerinin stimülasyonunu ve olgunlaşmasını indüklediği literatürden de bilinmektedir (Lindblad 2000).

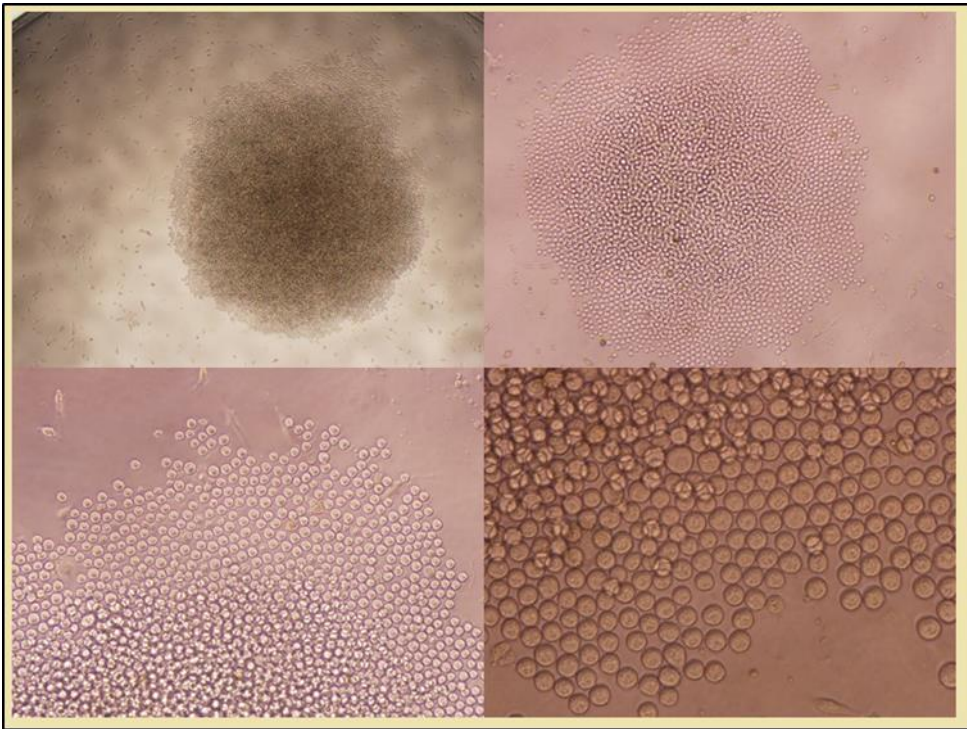
Önerilen yöntem ile yapılan immünizasyonların sonuçlarına göre, immünize edilen her bir gruptaki 5'er fareden 5. immünizasyon sonunda, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, sırasıyla 1. grupta yer alan 25ug antijen ile immünize edilen SAK ve SOK işaretli farelerin ve 2. grupta yer alan 50ug antijen ile immünize edilen SOK işaretli farenin diğerlerine göre yüksek antikor yanıtı verdiği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında PAP antijenine karşı diğerlerine göre daha yüksek düzeyde antikor cevabı verdiği belirlenen 3 fare ile 3 adet füzyon çalışması yapılmıştır. Proje kapsamında diğer farelerin immünizasyon ve füzyon çalışmalarına devam edilmektedir.

4.4 Füzyon Sonuçları

PAP antijeni ile bağışıklanan fareler arasında bu antijene en yüksek immün yanıtı veren 3 fare ile füzyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hibritlerin antikor aktivite yanıtlarının kontrol edilmesi dolaylı ELISA protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Füzyonun 10.gününde hibritlerin mikroskop görüntüleri Şekil 4.7'de görülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında füzyon sırasında dalak hücreleri ile myeloma hücrelerinin birleşme (Dalak: Myeloma) oranı 1:3 ile 1:4 arasında kullanılmıştır (Çizelge 4.2). Bu oranlar genellikle önerilen 1:1 ile 1:5 arasında olması nedeni ile literatür ile de uyumludur (Rojas ve Apodaca 2002).

Füzyonun başarısını etkileyen önemli faktörlerden bir diğeri ise doğru kimyasalın uygun yöntemle kullanımıdır. Doğru kimyasalın belirlenmesi ve kullanımıyla gerek başarılı bir füzyon gerekse de oluşan hibrit hücrelerin canlı kalabilmeleri sağlanmış olacaktır. Hibridoma teknolojisinde kimyasal madde olarak; lizolesitin ve polietilen glikol kullanılmaktadır. Polietilen glikol (PEG) hücre hibridizasyon işleminde en çok kullanılan kimyasal ajan olup, hücre zarında bulunan çift lipit tabakasının yapısını bozar, membran akışkanlığını artırır ve hücre füzyonunu kolaylaştırmaktadır. Bağışık lenfositler ile myeloma hücrelerinin füzyonu için, 1000-6000 arasında molekül ağırlığına sahip olan polietilen glikol sıklıkla kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlığına sahip PEG kolayca hücrelere girerek sitotoksositeye sebebiyet verirken, yüksek molekül ağırlığındaki PEG ise daha az toksik olmasına karşın yüksek viskoziteye sahip olduğundan kullanımı zorlaşmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda 4000 molekül ağırlığındaki PEG kullanılmış ve bu ağırlığın optimum değer olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Shirahata ve ark. 1998, Campbell ve Vliet 1991). PEG, memeli hücreleri için toksik etkiye sahip olduğundan, füzyon işleminden sonra yıkanarak hemen ortamdan uzaklaştırılmalıdır (Hui ve Stenger 1993). PEG' in kullanıldığı füzyon işlemlerinde; reaksiyon ortamının pH'sı, sıcaklığı, PEG konsantrasyonu ve füzyon süresi gibi parametreler kritik noktalardır. Füzyon işleminin gerçekleştiği reaksiyon ortamında, pH değerinin 8-8,2 arasında ve sıcaklığın 20-37 °C arasında olması iyi bir hibridizasyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır (Hui ve Stenger 1993).



Şekil 4.7. Füzyonun 10.gününde tespit edilen hibrit hücrelerin mikroskobik görüntüleri

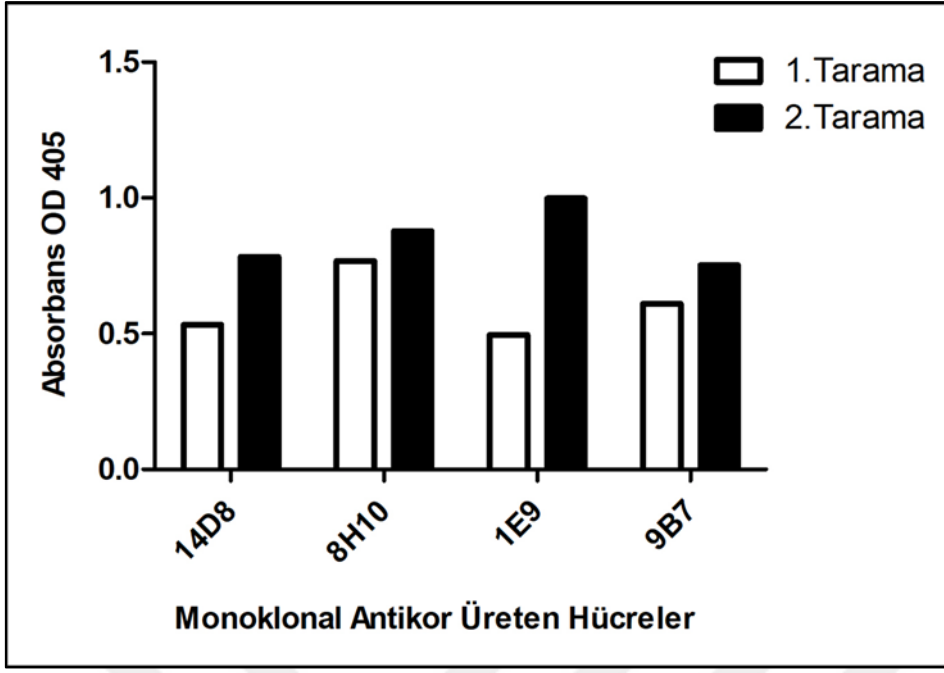
Füzyonun başarısını ve elde edilen hibrit hücrelerin canlılık ve stabilitesini etkileyen önemli faktörlerden biri de füzyon sırasında kullanılan partner hücrelerinin canlılık oranı ve yapısal düzgünlüğüdür. Sunulan tez çalışmasında kullanılan F0 myeloma hücrelerinin füzyon öncesi canlılık oranlarının mutlaka %90 üzerinde olmasına dikkat edilmiştir. Canlılığı %90'dan düşük, yani ölü hücre oranı yüksek olan hücre grupları füzyona dahil edilmemiştir.

4.4.1 Hibridomaların ELISA ile Seçimi

Füzyon sonrasında PAP antijenine spesifik antikorları üreten hibrit hücrelerin antikor aktivite seviyeleri dolaylı ELISA ile belirlenmiştir. Bu hibritlerin 1. ve 2.tarama sonuçları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Tekrarlanan ELISA kontrol çalışmalarında bir fareden elde edilen antikor aktivitesine sahip hücrelerin (32 adet) %25'i PAP antijenine karşı spesifik antikor yanıtı vermiş ve bunların da %50'si bu yanıtı sürdürebilmiştir (Çizelge 4.2). Diploid bir fare hücresi 40 kromozom içerirken bir hibrit hücre ortalama 80 kromozom içermekte, ilk birkaç gün içinde ise bu kromozomların birçoğu travmatik ve kararsız membran füzyonu olaylarından dolayı kaybolmaktadır. Bu kromozom kayıplarının, hücrenin ölümüne, üremesinin durmasına, immünoglobulin sentezleme yeteneğinin kaybolmasına sebep olduğu bildirilmektedir (Stewart 2001). Bu tez çalışmasında da PAP antijenine karşı spesifik antikor yanıtı veren hibritlerin %50'sinin yanıtı kaybetme nedeninin benzer olduğu düşünülmektedir.

Yapılan 2. Füzyon çalışması 1.grupta (25ug antijen/fare) yer alan SAK faresi ile yapılmış, toplam 128 hibrit klonu test edilmiş, bu hibrit hücreler arasından sadece 1 tanesinden cevap alınmış ancak spesifik olmadığı belirlenmiştir. Üçüncü füzyon çalışması ise 1.gruptaki SOK faresi ile yapılmış ve test edilen 298 klon sayısından 13 tanesinin antikor yanıtı verdiği tespit edilmiş ancak hücre kültürü çalışmalarının en büyük risklerinden biri olan kontaminasyon sebebiyle hücreler kaybedilmiş ve çalışma sonlanmıştır.



Şekil 4.8. 14D8, 8H10, 1E9 VE 9B7 hibridoma hücrelerinin indirekt ELISA sisteminde 1. ve 2. Tarama sonucunda verdiği antikor cevapları

Çizelge 4.2. Füzyonda kullanılan hücre sayısı ve füzyon sonrası elde edilen hibrit hücre sayıları

Füzyon No	1	2	3
Dalak hücresi sayısı	300.10 ⁶	300.10 ⁶	255.10 ⁶
F0 sayısı (ATCC CRL1646)	90.10 ⁶	100.10 ⁶	100.10 ⁶
Dalak/ F0 oranı	1/3,6	1/3	1/2,55
Test edilen hibrit sayısı	2300	128	298
Antikor aktivitesine sahip hücre sayısı	32	1	13
PAP'ye spesifik Mab üreten hücre sayısı	8	0	0
Elde edilen hibrit hücre hatları	9B7, 14D8, 8H10, 1E9	0	0

4.4.2 Alt klonlama (tek hücre düşürme) işlemi

Sağlıklı bir kültürde antikor üretiminin düşmesi, üretici olmayan varyantların aşırı ürediğinin bir göstergesidir. Bu nedenle başlangıçta pozitif sonuç veren kültürlerin tekrarlı klonlama işlemlerinin yapılması önem arz etmektedir (Frame ve Hu 1990).

Tez çalışmasında da ELISA testlerinde PAP antijenine spesifik antikor üreten 4 hücre ayrı ayrı (9B7, 14D8, 8H10, 1E9) tek klondan oluşan hibritlere dönüştürmek amacı ile alt klonlama (sınırlı seyreltme) işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla; antikor yanıtı alınan kuyulara ait hücreler hemositometre ile sayılmış ve 96 kuyucuklu plaklara seyreltme yapılarak ekimi yapılmıştır. Tek düşürmeler sonrasında hücrelerin ürettiği antikorlar ELISA ile test edilmiş, pozitif yanıt alınan klonlara 2. ve 3. tek düşürme işlemleri yapılarak monoklonal antikor üreten hibrit hücreler elde edilmiştir.

4.4.3 Hibrit hücrelerin geniş ölçekte üretimi

PAP antijenine karşı monoklonal antikor üreten hibrit hücrelerin (9B7, 14D8, 8H10, 1E9) geniş ölçekte üretim çalışmaları tek kullanımlık steril hücre kültür şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hibrit hücreler 150 cm² ve 175 cm²'lik (TPP) kültür şişelerine ekilmiş ve çoğalan hücrelerin kültür üst sıvıları belirli aralıklarla ve pasajlama esnaslarında steril kaplarda toplanmıştır. Toplanan üst sıvılardan hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için santrifüj işlemi uygulanmış ve anti-PAP antikorları içeren kültür üst sıvıları amonyum sülfat çöktürmesi için hazır hale getirilmiştir.

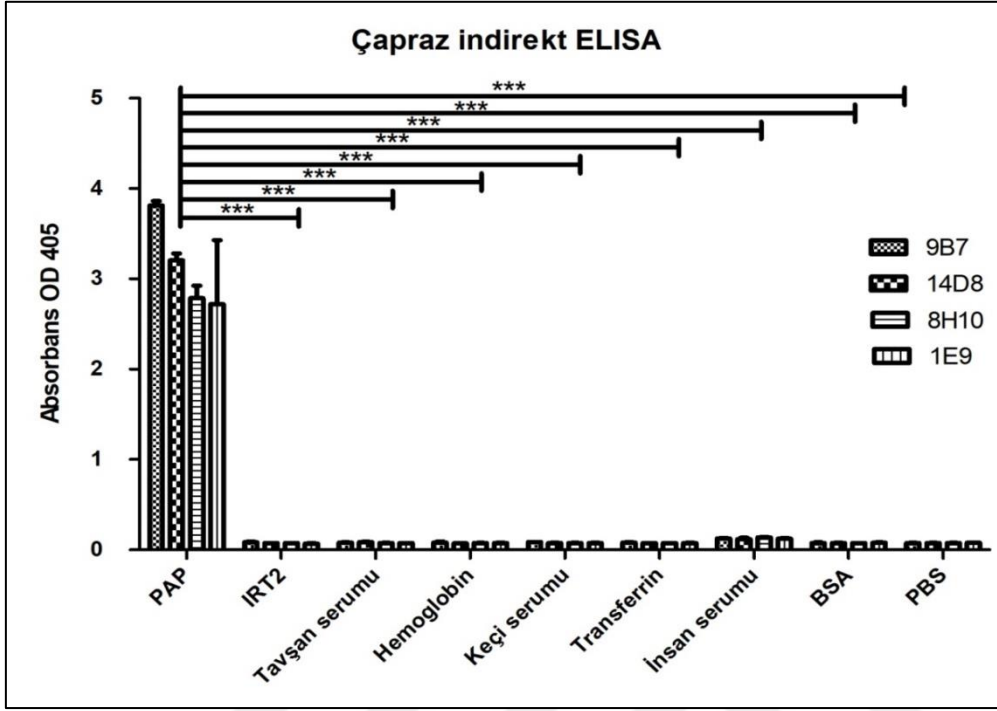
4.5 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu

4.5.1 Çapraz reaksiyonların belirlenmesi

Füzyon sonrasında elde edilen 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9 antikorlarının PAP antijenine ve diğer muhtemel proteinlere karşı verdikleri çapraz yanıtları görmek amacıyla dolaylı ELISA yöntemi kullanılmıştır.

Kuyular sırasıyla 100ng PAP, 100ng IRT2, 1:1000 tavşan serumu, 100ng hemoglobin, 1:1000 keçi serumu, 100ng insan transferrin, 1:1000 insan serumu, 100ng BSA ve negatif

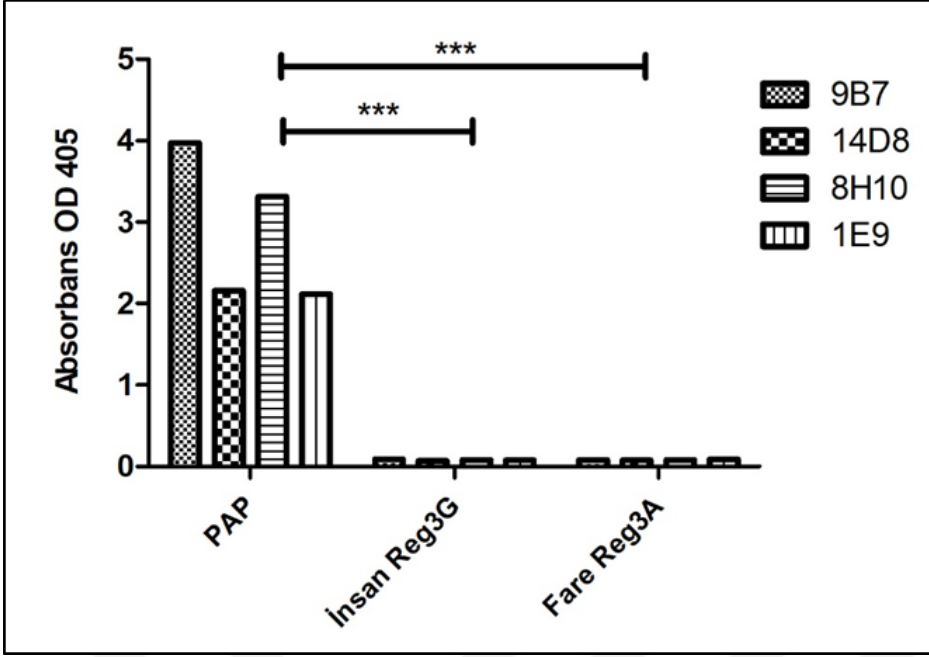
kontrol olarak da PBS ile kaplanmıştır. PAP antijenine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar test edilmiş ve sonuçları Şekil 4.9’de değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. Üretilmiş monoklonal antikorların PAP antijenine olan özgüllüğünü gösteren grafik $p < 0,0001$

Bu sonuca göre, anti-PAP monoklonal antikorlarının diğer protein ve serumlarla çapraz reaksiyon vermediği, oldukça dikkat çekici oranda sadece PAP antijenine spesifik bir tanıma gösterdiği belirlenmiştir.

PAP antijeni ile yüksek oranda benzerlik (Sırasıyla %85 ve %80) gösteren ve tanıma bölgeleri içeren insan Reg3G ve fare Reg3A proteinleri ile doğrulama çapraz ELISA testi yapılmış ve elde edilen bulgular sonucu üretilmiş monoklonal antikorların sadece PAP antijenine spesifik olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Üretilmiş monoklonal antikorlar ile insan Reg3G ve fare Reg3A proteinlerinin etkileşim çapraz ELISA grafiği

Tanı çalışmalarında kullanılacak olan bu monoklonal antikorların özellikle insan Reg3G ve fare Reg3A proteinleri ile çapraz vermemesi; ticari olarak satılan anti-Reg3A monoklonal antikorları ile karşılaştırma yapılarak test edilmiş ve uygun sonuçlar elde edilmiştir.

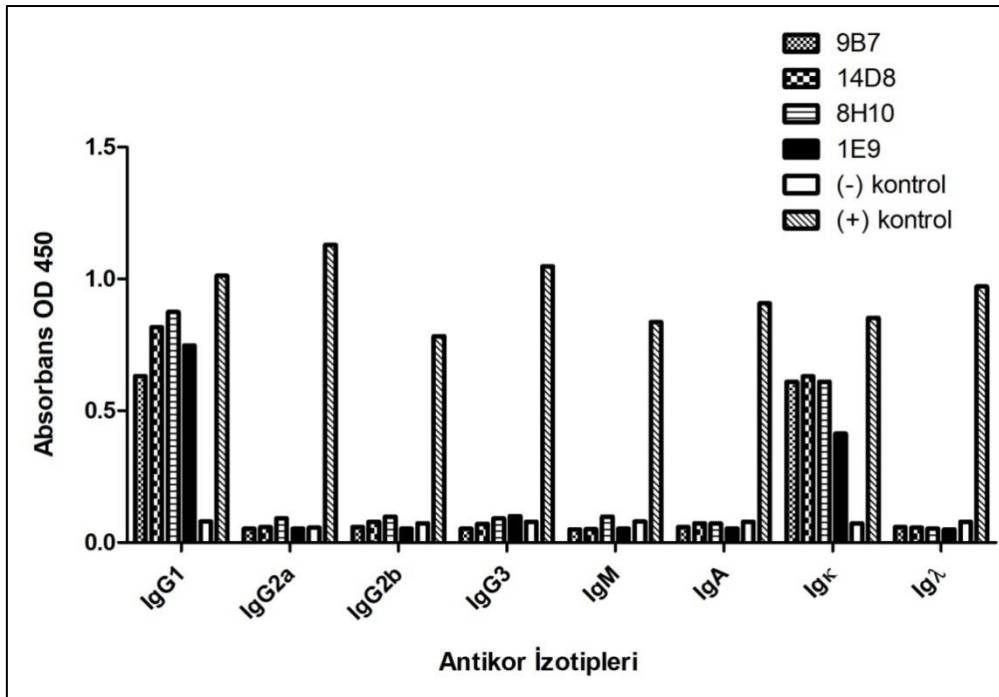
4.5.2 Antikor izotipinin belirlenmesi

Elde edilen monoklonal antikorların karakterizasyon çalışmalarında; PAP antijenine özgün 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9 monoklonal antikorlarının immüoglobulin tipleri Roche IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping antikor alt tipi belirleme strip kiti ile belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Anti-PAP monoklonal antikorların strip kit ile izotip ve alt izotiplerinin belirlenmesi

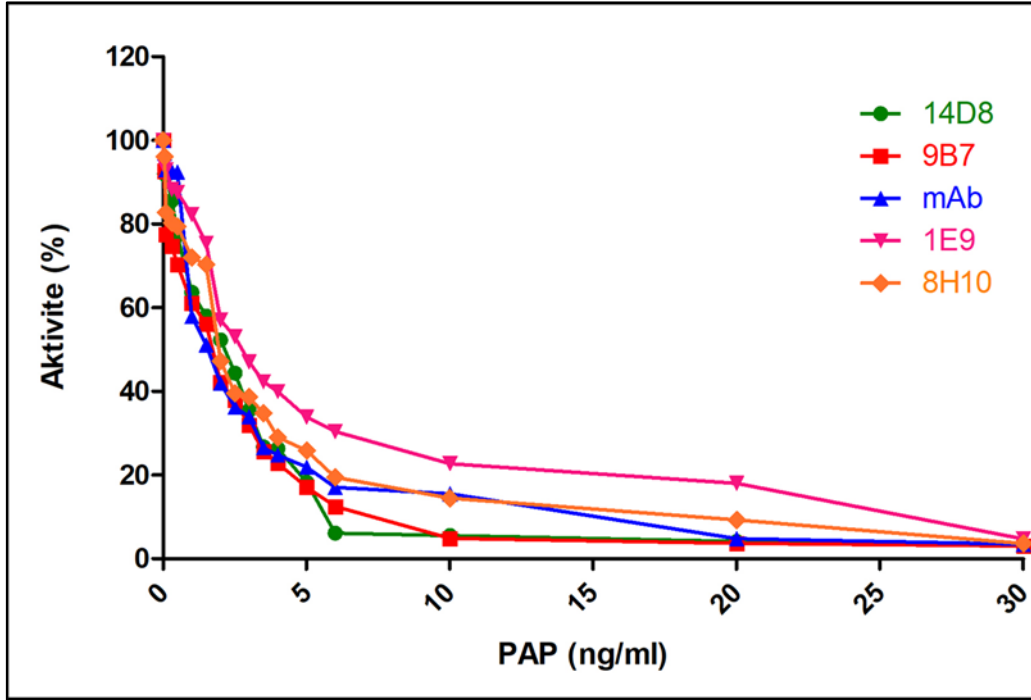
Yapılan alt tip belirleme kit çalışmasında; 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9 isimli monoklonal antikorların immünglobulin tipinin IgG1, hafif zincirinin ise K (kappa) tipinde olduğu tespit edilmiştir. Antikorlar Mouse immünoglobulin isotyping ELISA kiti ile de test edilmiş ve yapılan alt tipleme çalışması yukarıda verilen bulguları desteklenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Anti PAP monoklonal antikorların izotip ve alt izotiplerinin ELISA test ile belirlenmesi

4.5.3 Antikor afinitesinin belirlenmesi

Elde edilen monoklonal antikorların karakterizasyon çalışmalarında; PAP antijenine özgün 9B7, 14D8, 1E9 ve 8H10 monoklonal antikorlarının afinitelerinin belirlenmesi amacıyla literatürde de (Rath ve ark. 1988) önerildiği gibi yarışmalı ELISA testi yapılmış ve %50 (IC50) inhibisyon konsantrasyonu Mario H. Vargas tarafından hazırlanan ED50plus v.1 (2000) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.13'te gösterilmektedir.

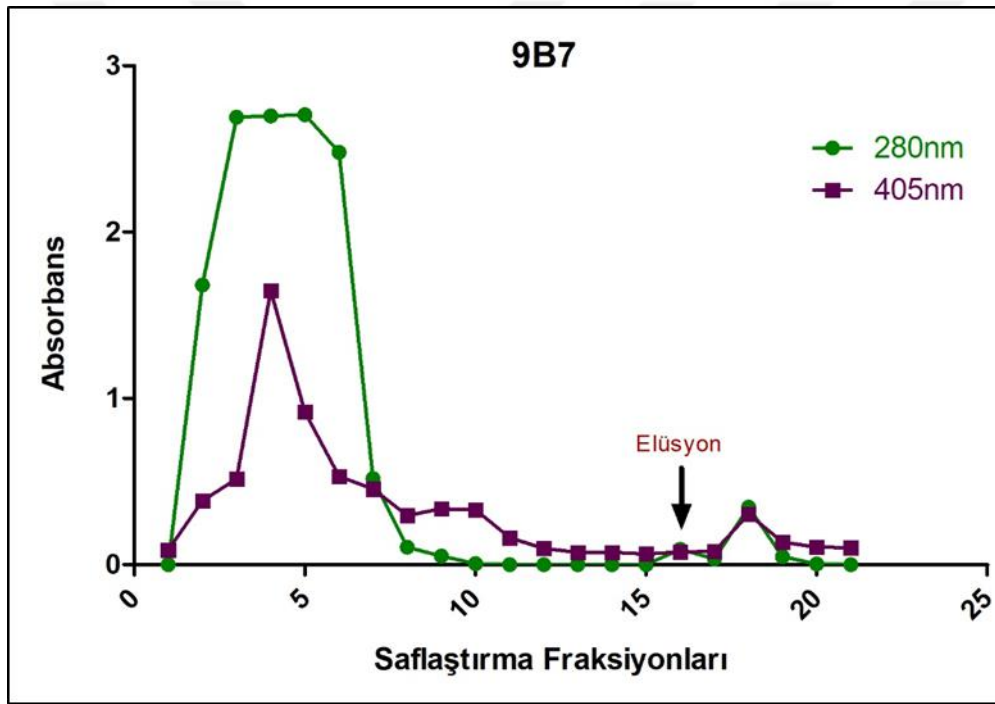


Şekil 4.13. Anti-PAP antikorlarının PAP'la ön inkübasyonlu yarışım ELISA sonuçları
 $p < 0,0003$

Hesaplama sonucunda elde edilen 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9 sırasıyla 2.74 ng/ml, 4.07 ng/ml, 5.11 ng/ml ve 7.66 ng/ml IC50 değerlerine sahiptirler. Mevcut olan ve çalışma boyunca pozitif kontrol olarak kullanılan ticari anti-Reg3A antikoru (IC 50 = 4.44 ng/ml) ile karşılaştırıldığında 8H10 ve 1E9 isimli antikorların daha düşük afiniteye sahip oldukları 9B7 ve 14D8 isimli antikorların ise daha yüksek afiniteye sahip oldukları belirlenmiştir. Ancak bu son iki antikoru (8H10 ve 1E9) kit çalışmalarında capture (yakalayıcı) antikor olarak kullanılabilirliği sebebiyle saflaştırma işlemleri yapılmıştır.

4.6 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

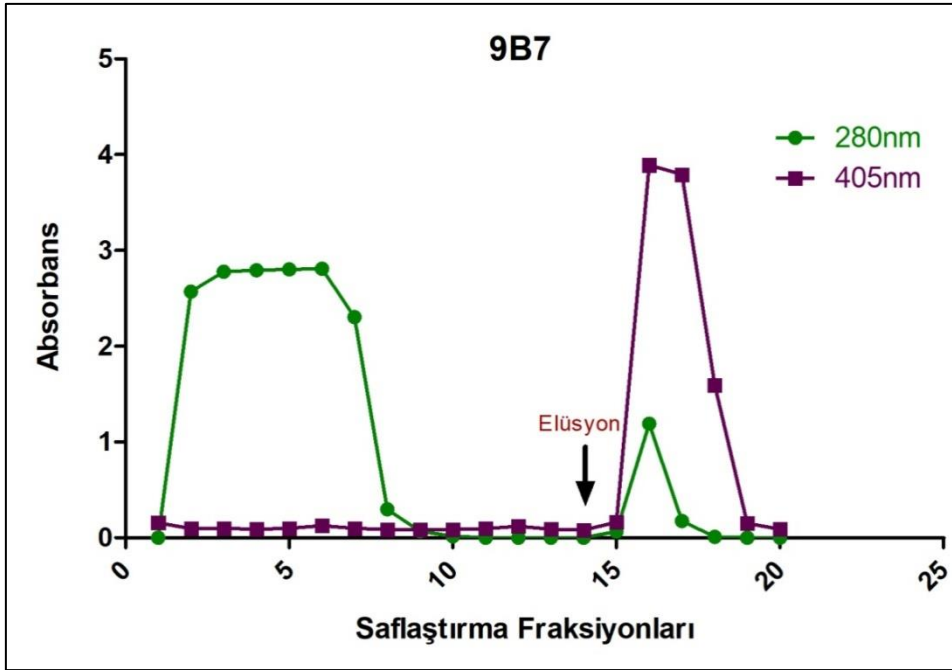
Bu amaçla geniş ölçekte üretime geçilen hücrelerin üst sıvıları toplanmış, ardından protein ve antikorları ayırmak için Amonyum Sülfat çöktürmesi yapılmıştır. IgG1 alt tipine sahip antikorlu içeren protein çözeltisi gece boyu diyaliz işlemine tabii tutulmuş, ardından Protein A kolonuyla üretici firmanın önerdiği bağlama tamponunu kullanılarak (20mM sodyum fosfat tamponu) pürifiye edilmiştir. Ancak bu standart bağlama tamponunun kullanılması ile Şekil 4.14'te görüldüğü gibi elde edilen saf antikor miktarının çok düşük (0,2 mg/ml) olduğu görülmüştür. Bu durumun, saflaştırmak üzere kolona verilen konsantre protein örneğindeki antikorların Protein A kolonuna etkin şekilde bağlanamamasından kaynaklandığı belirlenmiştir.



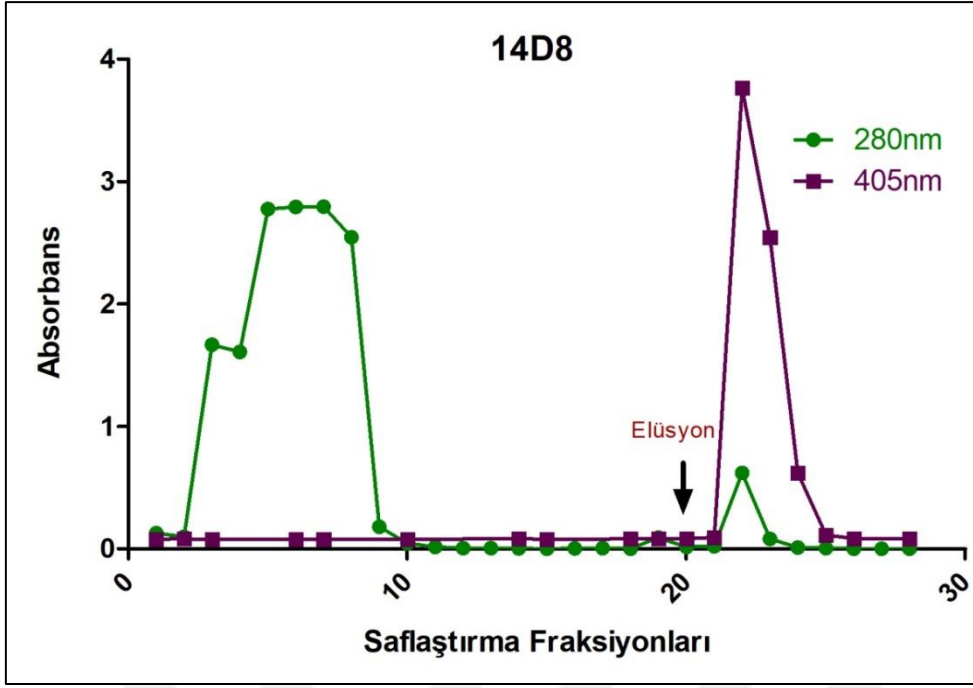
Şekil 4.14. Anti-PAP 9B7 Monoklonal antikorunun Protein A kolonunda fosfat tamponunu kullanılarak elde edilen saflaştırma sonuçları

Fare IgG1 antikorların, diğer IgG alt izotiplerine kıyasla protein A'ya karşı daha az afiniteye sahip oldukları literatürde de bildirilmektedir (Hober ve ark. 2007). Bu nedenle Protein A ve IgG arasındaki etkileşimin hidrofobik olduğu dikkate alınarak (Anonim 2013) bu çalışmada elde edilen IgG1 antikorların hidrofobik etkileşimini arttırmak için yüksek tuz içeren (3M NaCl 1,5M Glisin) ve pH değeri 8 olan bağlama tamponu kullanılmış ve daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

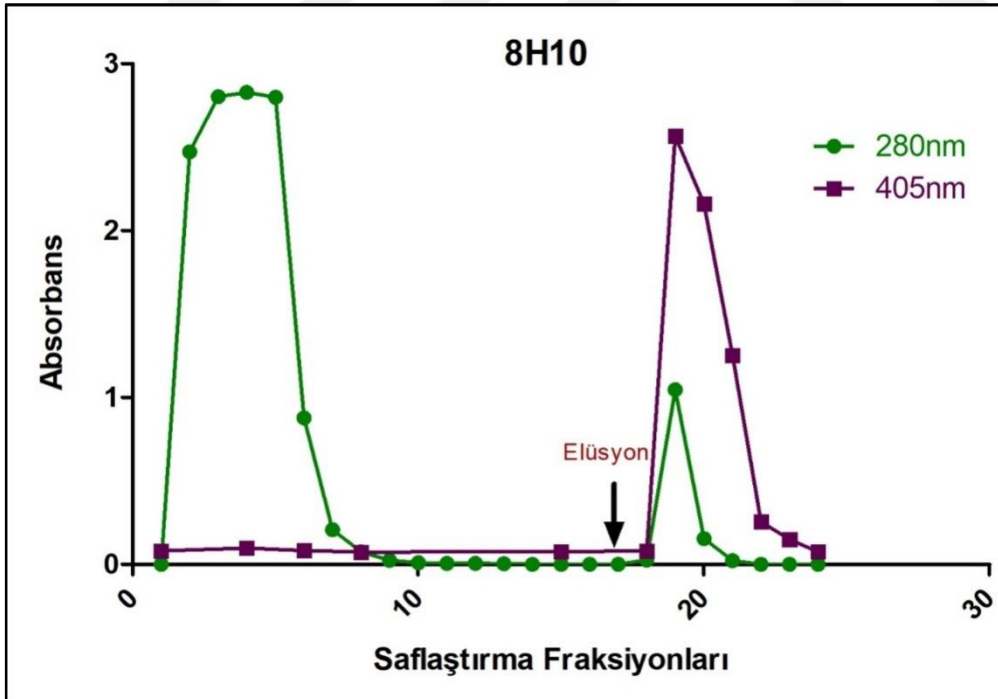
Bağlanma, yıkama ve elüsyon aşamalarının her birinde toplanan fraksiyonların protein konsantrasyonları 280nm’de absorbanları ölçülerek belirlenmiştir. Saflaştırmanın ardından kolon fraksiyonlarının antikor aktivitesi ve antikor elüsyonlarının tespiti indirekt ELISA testi ile kontrol edilmiştir. Elde edilen 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9’nun saflaştırma sonuçları sırasıyla Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’te gösterilmiştir.



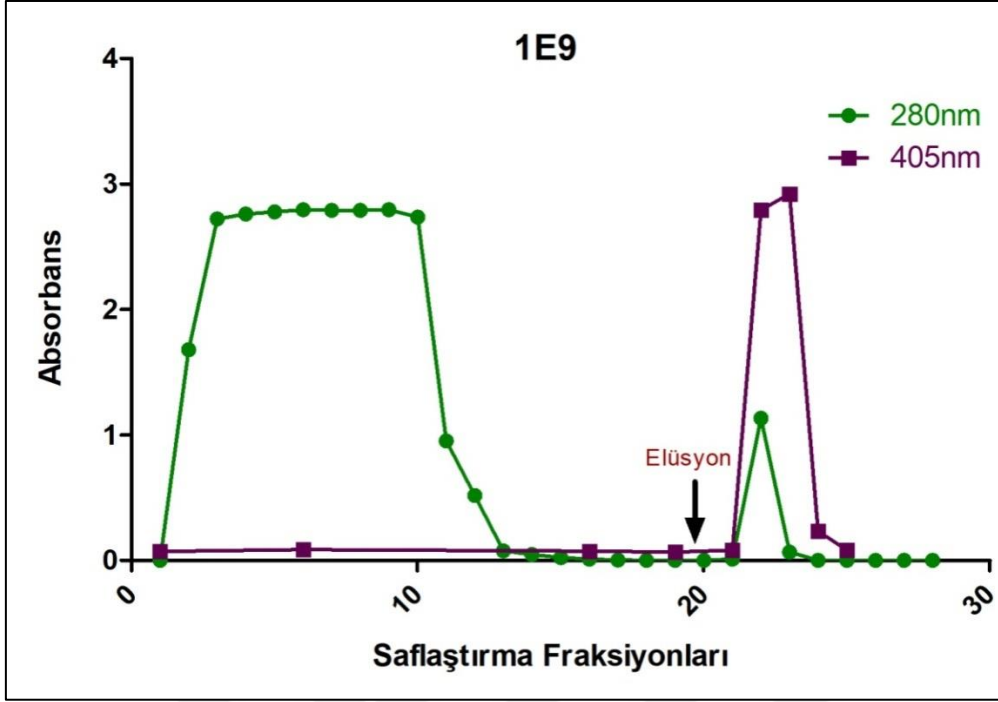
Şekil 4.15. Anti-PAP 9B7 monoklonal antikorunun Protein A kolonunda saflaştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)



Şekil 4.16. Anti-PAP 14D8 Monoklonal antikorunun Protein A kolonunda safıştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)



Şekil 4.17. Anti-PAP 8H10 Monoklonal antikorunun Protein A kolonunda safıştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)



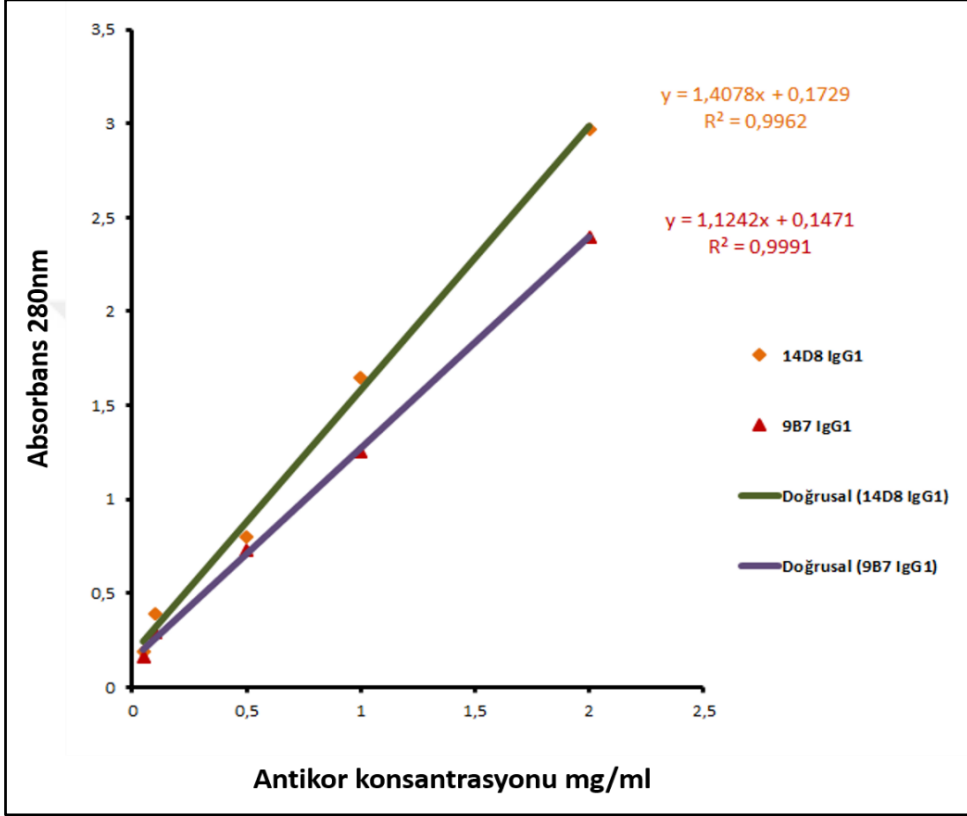
Şekil 4.18. Anti-PAP 1E9 Monoklonal antikorunun Protein A kolonunda saflaştırma işlemi ile elde edilen fraksiyonların protein miktarları (280 nm) ve ELISA testinde verdiği cevaplar (405 nm)

Saflaştırma sonuçları değerlendirildiğinde, PAP antijenine spesifik monoklonal antikorların, Protein A immünafinite kolon kromatografisinde başarı ile saflaştırıldığı görülmektedir. Grafiklerden (Şekil 4.15, 4.16, 4.17 ve 4.18) görüldüğü üzere, antikor örnekleri (9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9) kolona bağlandıktan sonra, elüsyon tamponunun düşük pH'daki asidik etkisi ile kolondan ayrılarak fraksiyon tüplerine toplanmakta ve yapılan ELISA testlerinde anti-PAP aktivitesi vermektedir.

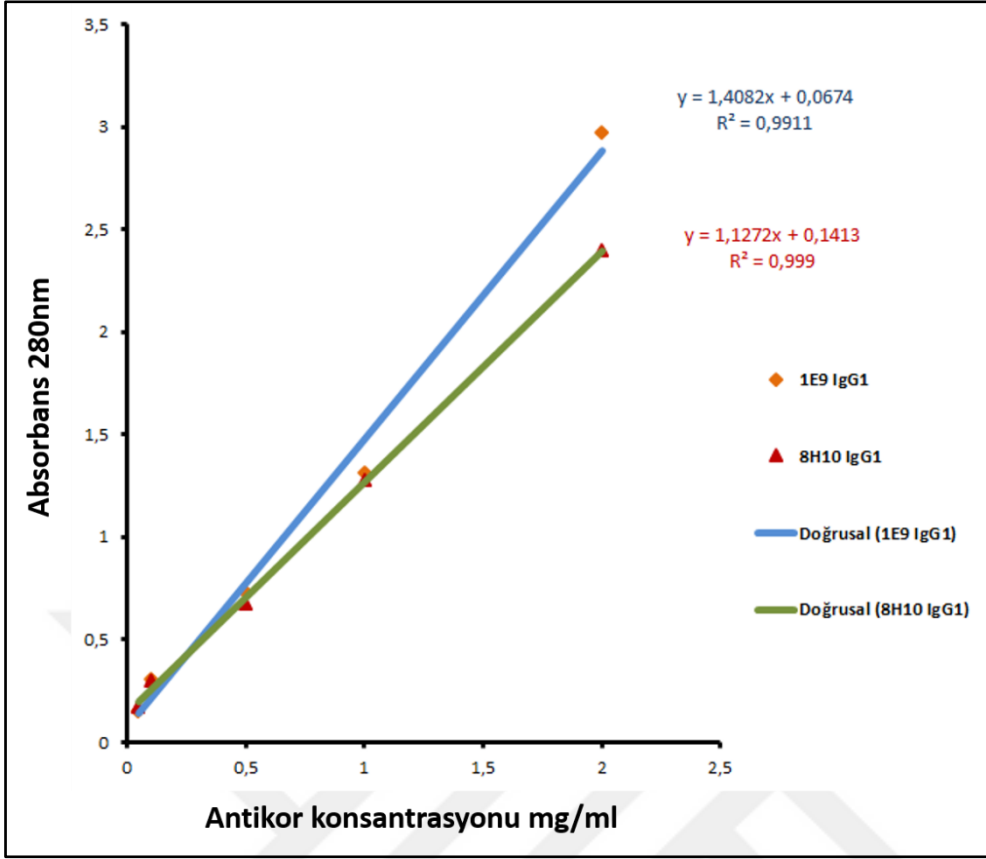
4.6.1 Antikorların ekstinksiyon katsayıları

Antikor miktarının belirlenmesi, doğru test tasarımı, sistemin karakterizasyonu ve immünoassay geliştirilmesi için kritik önem taşımaktadır. Spektral ölçüm, kantifikasyon için en basit ve en yaygın kullanılan yöntemdir. Yaygın olarak bilinen antikor absorpsiyonları farklı antikorlar için geçerli olmayabilir ve bu nedenle geliştirilen her antikorun spektral absorptivitesinin immünoassaylarda kullanılmadan önce belirlenmesi daha sağlıklı sonuçlar alınmasını sağlayabilir. Bu amaçla, saflaştırılmış 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9 antikor çözeltileri herhangi bir tuz veya tampon iyonundan temizlemek için çift damıtılmış suya karşı diyaliz

edildikten sonra liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilize saf antikorlar %0.1 ekstinksiyon ($\epsilon_{0,1}$) katsayılarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Farklı antikor konsantrasyonlarının spektrum ölçümlerini gösteren doğrusal grafiklerdeki eğimler, her bir % 0.1'lik antikor çözeltisinin diğer bir deyişle antikorların 1 mg/mL solüsyonunun absorpsiyonuna karşılık gelmektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. 9B7 ve 14D8 antikorlarının hesaplanan sönümlenme katsayıları



Şekil 4.20. 1E9 ve 8H10 antikorlarının hesaplanan sönümlenme katsayıları

Bu sonuçlara göre elde edilen 9B7, 14D8, 8H10 ve 1E9 antikorları sırasıyla 1.12, 1.4, 1.12 ve 1.4 ekstinksiyon (sönümlenme) katsayılarına sahiptir (Çizelge 4.4). Görüldüğü üzere 14D8 ve 1E9 antikorlarının bilinen ve literatürde (Pace 1995) sıklıkla kabul edilen antikor ekstinksiyon değerleri (1.3 ile 1.4) ile uyumlu olduğu bulunurken, 9B7 ve 10H8'in literatürden bir miktar farklı değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Düşük ekstinksiyon değerleri sıklıkla karşımıza çıkmamasına rağmen literatürde görülmektedir.

Bu katsayılardan yola çıkarak (Proteinin absorbansı/ ekstinksiyon katsayısı= 1 ml'deki protein miktarı) 1mg/ml'de bulunan antikor miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.3.)

Saflaştırılmış IgG antikorlarının 1 mg/ml' de bulunan miktarının, literatürde genelleştirilmiş olarak kabul edilen 1.43 EC değeri üzerinden ve deneysel olarak bu çalışmada hesaplanan ekstinksiyon (EC) katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır (Proteinin absorbansı/ EC = 1 ml' deki protein miktarı). Elde edilen hesaplama sonuçları Çizelge 4.3 'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Geliştirilmiş antikorların ekstinksiyon katsayıları ($\epsilon^{ \%0,1}$) ve mg/ml deki konsantrasyonları.

Antikor	$\epsilon^{ \%0,1}$	mg/ml Konsantrasyon (Hesaplanan $\epsilon^{ \%0,1}$)	mg/ml Konsantrasyon ($\epsilon^{ \%0,1} = 1.43$)
9B7	1.12	1,30	1,01
14D8	1.40	0,44	0,43
1E9	1.40	0,8	0,77
10H8	1.12	0,92	0,72

Deneyisel olarak elde edilen molar ekstinksiyon katsayıları ELISA kitlerinin geliştirilmesinde gerekli olan antikor titrasyon değerlerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Monoklonal antikorlar ile ilgili çalışmalar çok yakın bir tarihte, ilk defa Georges Kohler ve Cesar Milstein'in 1970'lerde Cambridge Üniversitesi'nde yaptıkları çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Kohler ve Milstein bu çalışmalarda kanser hücrelerini, aşılانmış farelerin dalak hücreleri ile kaynaştırdıklarında antikor üreten hücrelerin varlığını keşfetmişler; böylece ölümsüz, sürekli, tek bir antijenik epitopa karşı antikor salgılayan hibrit hücrelerini elde etmişlerdir. Füzyon işleminin sonunda, dalak hücresinden antikor üretim özelliği sağlanırken, kanser hücresinden de ölümsüzlük özelliği kazanılmış oldu. Kohler ve Milstein çalışmalarını 7 Ağustos 1975 tarihli Nature dergisinde (256: 495-7) 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of redefined specificity' başlıklı makalede derlemiş ve bu sayede 1984 yılında Nobel tıp ödülünü kazanmışlardır.

Monoklonal antikorların 1984'te Nobel ödülünü alması, antikorları bir anda temel araştırmalarda olduğu kadar tanı testleri ve tıbbi tedavilerde de önemli araçlar haline getirmiştir. Bu tarihten itibaren MAb'lar hastalıkların teşhisi için geliştirilen çeşitli tanı testlerinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Hepatit B tanısında kullanılan monoklonal antikora dayalı ELISA testleri (Weber ve ark. 2001) ve Kistik Fibrosiz tanısında kullanılan antikora dayalı sandwich ELISA testleri de bunlara örnek olarak verilebilir (Ross 2008, Sommerburg 2017).

PAP'a yönelik monoklonal antikor üretimi çalışmaları ise başlangıç safhasında olmakla birlikte PAP'ın kanser gibi birçok ölümcül hastalığın önemli belirteçlerinden biri olduğu verilerinin elde edilmesi ile üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır (Iovanna ve ark. 1994, Xie ve ark. 2003, Fitzgibbons ve ark. 2014). İlk defa 1984 yılında izole edilen PAP'ın 90'lı yılların ortalarına kadar gelen çalışmalarda gerek pankreas gerekse vücudun diğer sistemlerine ait enfeksiyöz ve non enfeksiyöz hastalıkların önemli bir belirteci olduğu konusunda veriler mevcuttur.

Bizim çalışmamızda tanı yöntemlerinde kullanılmak amacıyla model olarak seçilen bir belirteç karşı yüksek afiniteli monoklonal antikor geliştirilmesi, karakterizasyonu ve saflaştırması hedeflenmiştir. Seçilmiş olan model belirteç için dünyadasadece patentli bir ticari ELISA kiti mevcut olup bunun dışında benzer araştırmalar bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, Kistik Fibrozisin erken tanısında ELISA temelli sistemlerde kullanmak üzere Anti-PAP monoklonal antikörlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Projenin nihai hedefi ise Kistik Fibrozis hastalığı olan yenidoğan bebeklerin topuk kanı örneklerinde yüksek seviyelerde gözlenen PAP'ın erken ve hassas tanısı için monoklonal antikörlerin kullanımına dayalı teşhis sistemlerinin geliştirilmesidir. Bu amaca ilave olarak, geliştirilen antikör ve geliştirilecek teşhis kitinin, pankreatit hastalığının tanısında da kullanılabileceği düşünülmektedir.

Antikör üretirken göz önüne alınması gereken kritik unsurlar; antijen seçimi, aseptik antijen işleme, adjuvan seçimi, antijen adjuvan karışımının hazırlanması, aşılama yolunun seçimi ve enjeksiyon hacminin belirlenmesi olarak sıralanabilir. Antikör üretim basamakları ise sırasıyla; antijene spesifik B hücrelerinin üretilmesi, bu hücrelerin myeloma hücreleri ile füzyonuna müteakip spesifik hibridoma klonunun seçilmesi, MAb karakterizasyonu ve saflaştırılması olarak sıralanmaktadır. Monoklonal antikör üretimi için antikör salgılayan B hücreleri myeloma hücreleri ile birleştirilerek ölümsüzleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında myeloma hücre hattı ile 3 füzyon çalışması gerçekleştirilmiş ve proje çerçevesinde farklı füzyon deneyleri halen devam etmektedir.

Bu çalışmada kullanılan model protein olan PAP antijenine karşı 9B7, 14D8, 1E9 ve 8H10 adlı 4 tane spesifik hibrit hücre elde edilmiştir. Tanıda kullanılacak olan monoklonal antikörler çapraz reaksiyon açısından hedef örnekte bulunabilecek gerek yapısal benzerlik gerekse istenmeyen yanıtları oluşturabilecek diğer proteinler ile test edilmesi önemlidir. Bu amaç için ELISA testi kullanarak elde edilen antikörlerin ilgili proteinler (insan serumu, BSA, hemoglobülin, transferin, fare Reg3A, insan Reg3G) ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir.

Bu hibritlerden 9B7 ve 14D8'in sırasıyla 2.70ng/ml ve 4.07ng/ml yüksek afiniteye sahip olduğu, öte yandan 1E9 ve 8H10 isimli hibritlerin ise düşük afiniteli olduğu tespit edilmiştir. 1E9 ve 8H10 düşük afiniteli olmalarına rağmen tanı kit sistemlerinde (Sandwich ELISA) capture (yakalayıcı) antikör olarak kullanılabileceği ön çalışmalarla değerlendirilmiştir.

Bu antikörleri üreten hibrit hücreleri tek bir klon olarak (monoklonal) elde etmek amacıyla sınırlı seyreltme (limited dilution) yöntemi kullanılmıştır. Hibrit hücrelerin devam eden kültürü sırasında bazı durumlarda stabilite problemi yaşanabilmektedir, bu nedenle

hybridoma teknolojisinde tek düşürme işleminin birkaç kez tekrarlanması ile stabilize sağlanmalıdır.

Üretilen monoklonal antikorların hepsinin IgG1 alt tipinde olduğu tespit edilmiştir. Antikorların izotip ve altizotip belirlenmesi, uygun saflaştırma metodunun seçilmesi, tanı sistemlerine uygunluğunun tespiti ve işaretleme çalışmaları adına önem taşımaktadır. Bu amaç için çeşitli hazır kitler bulunmak ile birlikte strip ve ELISA sistemleri en çok tercih edilen yöntemlerdir. Bu tez çalışmasında her ikisi de kullanılmış ve uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Saflaştırma çalışmalarında hazır çeşitli kitlerin olmasına rağmen geliştirilmiş olan her antikorun izotipine, altizotipine ve yapısını bağlı olarak saflaştırma optimizasyonun yapılması gerekmektedir. Saflaştırma aşamasındaki en temel iki basamak olan antikorun bağlanması ve daha sonra fraksiyonel olarak kolondan ayırarak (elüsyon) toplanmasıdır, bu nedenle kullanılacak olan bağlama ve elüsyon tamponun optimize edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada da IgG antikorları için standart olarak kullanılan fosfat tamponunun (20mM Sodyum fosfat) yeterli olmadığı, bunun yerine yüksek tuz içeren bağlama tamponunun (3M NaCl, 1,5M Glisin pH 8) kullanımının daha uygun olduğu deneme çalışmaları sonucu belirlenmiştir. Sözkonusu bağlama koşullarının IgG1 alt tipliantikorların Protein A kolonuna daha iyi bağlanmasını sağladığı tespit edilmiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında üretimi ve karakterizasyonları tamamlanmış olan 4 monoklonal antikorun yakın bir zamanda kullanıldığı sandviç tabanlı test kitleri geliştirilerek hastaların serumundaki PAP antijeninin tespiti için kullanılacaktır. Sözkonusu kit sisteminin optimizasyonu için elde edilen antikorların enzimle (HRP veya Biotin) işaretleme çalışmalarının yapılması ve kit sisteminde kullanımına yönelik yakalayıcı ve işaretleyici en iyi çift antikorların tespiti sonrasında uygun antikor miktarların belirlenmesi gibi optimizasyon çalışmaları gerekmektedir. Bu şekilde ilerleyen çalışmalarda, Anti-PAP antikorlarının Sandviç ELISA kit sistemlerinde kullanılabilirliği ve kan spotu veya serum örnekleri kullanılarak ticari kitlerle karşılaştırma ve optimizasyon çalışmaları planlanmaktadır.

Hayvancılıktaki ekonomik kayıpları minimuma indirmek için hastalıklar ile etkin mücadele tarımsal biyoteknoloji çalışmalarının en önemli uğraşlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalıklarla mücadele ise erken tanıya dayanmaktadır. Hayvan ve insan hastalıklarının tanısında kullanılan sistemler oldukça benzerdir. Hastalıkların tanısında yaygın

olarak kullanılan birçok yöntemin (ELISA, LFD vb) temelinde yine MAb'lar yer almaktadır. Bu açıdan ele alındığında tanı amaçlı kullanılmak üzere MAb'ların geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında, bir hastalık belirteci olarak kullanılan PAP'a karşı MAb geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Tanı amaçlı kullanım için hastalık belirteci olan PAP'a karşı geliştirilen bu antikorun üretim ve karakterizasyon süreci, hayvan hastalıklarının tanısı, aşı geliştirilmesi veya daha başka sebeplerle farklı proteinlerin tespitine yönelik antikorların üretim çalışmaları için faydalı bir model oluşturmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH (2007). Temel İmmünoloji ISBN - 975-6395-61-3. 1. Baskı
- Abdo EM, Nicolet J, Frey J (2000). Antigenic and Genetic Characterization of Lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 7(4), 588–595.
- Ademokun AA, Dunn-Walters D (2010). İmmüne responses: primary and Secondary.
- Akçael E, Yücel F, Öztürk S (2014). Hibridoma Teknolojisi Ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Gelistirilmesi Kurs Kitabı. TÜBİTAK- GMBE, Gebze, Kocaeli.
- Aksit F, Akgun Y, Kiraz N (1995). Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. 8. Baskı, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Anonim (2003). Islets of Langerhans. <https://www.britannica.com/science/islets-of-Langerhans>. *Eycyclopaedia britannica*. (erişim tarihi 20.03.2018)
- Anonim (2008). Structural Biochemistry/Protein function/Epitope. https://en.wikibooks.org/wiki/File:Chem114A_epitopes.jpg#file.WikimediaCommons. (erişim tarihi 20.03.2018)
- Anonim (2013). Bio-Rad Laboratories “Protein A Antibody Purification Handbook”, 1st Edition, Proteus.
- Anonim (2015). Antigen Antibody interaction. <http://microbiology4.blogspot.com.tr/2015/07/antigen-antibody-interaction.html>. (erişim tarihi 20.03.2018)
- Anonim (2017). Noncommunicable Diseases. World Health Organization. Fact Sheet Updated. Media Centre: Geneva, Switzerland.
- Anonim (2018). Clonal Selection. *Evolving Science*. <https://www.evolvingosciences.com/Clonal%20Selection.html>. (erişim tarihi, 20.03.2018)
- Arora s, Ayyar BV, O’Kennedy R (2014). Affinity Chromatography for Antibody Purification. *Protein Downstream Processing. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1129. Humana Press, Totowa, NJ.
- Aryal S (2015). Antigen- Properties, Types and Determinants of Antigenicity. *Online Microbioly Notes*.
- Averill S, Davis DR, Shortland PJ, Priestley JV, Hunt SP (2002). Dynamic Pattern Of Reg-2 Expression in Rat Sensory Neurons After Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* 22: 7493-7501.
- Ayling RD, Regalla J, Nicholas RAJ (1999). A field test for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type using the latex slide agglutination test. *Agriculture and Biotechnology. Mycoplasmas of Ruminants:*

Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics Vol III, Office for official publications of the European Communities, Luxembourg, 155-158.

- Baeza N, Sanchez D, Christa L, Guy-Crotte O, Vialettes B, Figarella C (2001) Pancreatitis-associated protein (HIP/PAP) gene expression is upregulated in NOD mice pancreas and localized in exocrine tissue during diabetes. *Digestion* 64: 233-239.
- Barrette RW, Urbonas J, Silbart LK (2006). Quantifying Specific Antibody Concentrations by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Slope Correction. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13(7), 802–805.
- Barthelley S, Maurin N, Roussey M, Ferec C, Murolo S, Berthezene P, Iovanna JL, Dagorn JC, Sarles J (2001). Evaluation sur 47213 enfants d'une stratégie de dépistage neonatal de la mucoviscidose associant les dosages de pancreatitis-associated protein et de trypsinogène immünoréactive *Arch Pediatr*. 8: 275-281.
- Baumgarten A (2014). Antigen-Antibody Reaction. In *AccessScience*. McGraw-Hill Education.
- Bennett B, Check IJ, Olsen MR, Hunter RL (1992). A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J Immunol Methods* 153:31-40.
- Bonifacino JS Dell'Angelica EC, Springer TA (2001). Immunoprecipitation. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, Inc. p 8.3.1 – 8.3.28 .
- Bödeker H, Fiedler F, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL (1998). Pancreatitis-associated protein is upregulated in mouse pancreas during acute pancreatitis. *Digestion* 59: 186-191.
- Butler JE (1992). The Behavior of Antigens and Antibodies Immobilized on a Solid Phase. *Structure of Antigens*. Boca Raton, FL: CRC Press: 209-259. Vol.1, 209; CRC Press, Inc.
- Cambrosio A, Keating P (1992). Between Fact and Technique: The Beginnings of Hybridoma Technology. *Journal of the History of Biology*, 25(2), 175-230.
- Campbell AM, Vliet PC (1991). Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Hollanda: Elsevier Science Publishers, vol:23, 189-204.
- Chadseesuwana, U., Sangdokmai, A., Pimpitak, U., Puthong, S., Palaga, T., & Komolpis, K. (2016). Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.02.002>
- Chakraborty C, Vrontakis M, Molnar P, Schroedter IC, Katsumata N, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG (1995). Expression of pituitary peptide 23 in the rat uterus: regulation by estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 108: 149-154.
- Chapman K (2002). The protein chip biomarker system from ciphergen biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans*; 30: 82-87. 6.
- Cheillan D, Vercherat M, Chevalier-Porst F (2005). False-positive results in neonatal screening for cystic fibrosis based on a three-stage protocol (IRT/DNA/IRT): Should we adjust IRT cut-off to ethnic origin? *J Inherit Metab Dis* (2005) 28: 813.
- Chen P, Arias AE, Morisset J, Calvo E, Dagorn JC, Iovanna J, Bendayan M (1996). Presence of pancreatitis-associated protein in pancreatic acinar cells of rats treated with chlorophenylalanine methyl ester. *Pancreas* 13: 147-153.

- Christa L, Carnot F, Simon MT, Levavasseur F, Stinnakre MG, Lasserre C, Thepot D, Clement B, Devinoy E, Brechot C (1996). HIP/ PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells. *Am J Physiol* 271: G993-G1002.
- Christa L, Felin M, Morali O, Simon MT, Lasserre C, Brechot C, Sève AP (1994). The human HIP gene, overexpressed in primary liver cancer encodes for a C-type carbohydrate binding protein with lactose binding activity. *FEBS Lett* 337: 114-118.
- Closa D, Motoo Y, Iovanna JL (2007). Pancreatitis-associated protein: From a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(2), 170–174.
- Cohen J.J (2016). Antibody. In *AccessScience*. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.040100>
- Collier A, Ghosh S, McGlynn B, Hollins G (2012). Prostate cancer, androgen deprivation therapy, obesity, the metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease: A review. *Am. J. Clin. Oncol.*35, 504–509.
- Crawford NP, Colliver DW, Galandiuk S (2003). Tumor markers and colorectal cancer: Utility in management. *J. Surg. Oncol.* 84, 239–248.
- Crotty S (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Mar;15(3):185-9.
- Cutting GR (2015). Cystic Fibrosis Genetics: From Molecular Understanding To Clinical Application. *Nature Reviews. Genetics*, 16(1), 45–56.
- de St Groth SF, Scheidegger D (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35: 1-21.
- Deb R, Chakraborty S, Singh U, Kumar S, Sharma A (2012). Foot-and-mouth disease (FMD). In: *Infectious Diseases of Cattle*, Satish Serial Publishing House. 96-112.
- Deb R, Chakraborty S, Veeregowda B, Verma AK, Tiwari R, Dhama K (2013). Monoclonal antibody and its use in the diagnosis of livestock diseases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 50-62.
- Duarte KMR, Gomes LH, Gesztesi JL, Lopes JD, Tavares FCA (2001). Monoclonal Antibodies To Identify Tomato Mosaic Tobamovirus (TOMV). *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(3), 240-242.
- Duplan L, Michel B, Boucraut J, Barthellémy S, DesplatJego S, Marin V, Gambarelli D, Bernard D, Berthézène P, Alescio-Lautier B, Verdier JM (2001). Lithostathine and pancreatitis associated protein are involved in the very early stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 79-88.
- Dusetti NJ, Frigerio JM, Keim V, Dagorn JC, Iovanna JL (1993) Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis-associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate-recognition domain-containing genes. *J Biol Chem* 268: 14470-14475.
- Ellis HJ, Selvarajah U, Ciclitira PJ. (2017). Monoclonal Antibody Characterization of the Coeliac Toxic Gluten Content of Wheat Starch Standards for a Gluten Test Kit. *Int J Hepatol Gastroenterol.* 3(1): 046-049.

- Fitzgibbons TP, Paolino J, Dagorn JC, Meyer TE. (2014). Usefulness of pancreatitis-associated protein, a novel biomarker, to predict severity of disease in ambulatory patients with heart failure. *Am J Cardiol.* 113(1):123-6.
- Flaherty DK (2012a). Immunogenicity and antigenicity. *Immunology for pharmacy.* St. Louis, Mo: Elsevier.
- Flaherty DK (2012b). Antibodies. *Immunology for Pharmacy Chapter 9.* St. Louis, Mo: Elsevier.
- Frame, K. K. Hu, W. (1990), The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 35: 469-476. doi:10.1002/bit.260350504
- Frank SA (2002). *Immunology and Evolution of Infectious Disease.* Princeton (NJ): Princeton University Press; Chapter 4, Specificity and Cross-Reactivity.
- Freund J, Casals J, Hosmer EP. 1937. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 37:509-513.
- Freund J, McDermott D. 1942. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 49:548-553.
- Freund J. 1956. The mode of action of immunol adjuvants. *Adv Tuberc Res* 7:130-148
- Fuller SA, Takahashi M, Hurrell JG (2001). Immunization of Mice. *Current Protocols in Molecular Biology.* 18: II:11.4:11.4.1–11.4.6.
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JGR (1998). Immunoblotting and immunodetection. In: Coligan JE Kruisbeek AM Margulies DH Shevach EM Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology*. New York : John Wiley and Sons, Inc . p 8.10.1 – 8.10.21
- Ganguly S, Wakchaure R (2016). Hybridoma technology: A Brief Review On Its Diagnostic And Clinical Significance. *Pharmaceutical And Biological Evaluations.* vol. 3 (issue 6): 554-555. www.onlinepbe.com
- Giannopoulos K, Murray PG (2000). Monoclonal antibodies. *Molecular pathology.* 53(3):111–7
- Givan AL (2001). *Flow Cytometry: First Principles.* New York: Wiley-Liss, Inc.
- Goding JW (1996). Production of Monoclonal Antibodies. *Monoclonal Antibodies (Third Edition).* Pages 141–191.
- Greenfield E.A (2014). Chapter 7 Generating Monoclonal Antibodies. Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts 02115 2014 Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Gretzer MB, Partin AW (2003). PSA Markers in Prostate Cancer Detection. *Urol. Clin. N. Am.* 30, 677–686.
- Grimsley GR, Pace CN (2004). Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science.* 33:3.1:3.1.1–3.1.9.
- Grodzki AC, Berenstein E (2010a). Antibody Purification: Affinity Chromatography-Protein A and G Sepharose. In: *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols),* vol 588. Humana Press.
- Grodzki AC, Berenstein E (2010b) Antibody Purification: Ammonium Sulfate Fractionation or Gel Filtration. *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols),* vol 588. Humana Press.

- Hamel J, Brodeur BR (1990). Induction of an immune response to the porin of H influenzae type b by monoclonal anti-idiotypic antibodies. *Microb Pathogenesis* . 1990;9:81–93.
- Harlow E, Lane D (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual* . Cold Spring Harbor NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press .
- Hau J, Hendriksen M (2003). Production Of Monoclonal And Polyclonal Antibodies. *ILAR Journal* vol 46 (3).
- Hnasko RM, McGarvey JA (2015). Affinity Purification of Antibodies. *Methods in Molecular Biology*, vol 1318. Humana Press, New York, NY.
- Hober S, Nord K, Linhult M (2007). Protein A chromatography for antibody purification *Journal of Chromatography B* Volume 848, Issue 1, Pages 40-47.
- Hoffmann P, Jiménez-Díaz M, Weckesser J, Bessler WG (1996). Murine bone marrow-derived macrophages constitute feeder cells for human B cell hybridomas. *J Immunol Methods*. 196:85–91.
- Hornbeck P (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, Inc. p 2.1.2 – 2.1.22.
- Howard GC, Bethell DR (2000). Basic methods in antibody production and characterization. CRC Press. 51-53.
- HuI SW, Stenger DA (1993). Electrofusion of cells: Hybridoma production by electrofusion and Polyethylen glycol. *Methods in Enzymology*, (220), 212-227.
- Hulspas R (2010). Titration of Fluorochrome-Conjugated Antibodies for Labeling Cell Surface Markers on Live Cells. *Current Protocols in Cytometry*. 54:6.29:6.29.1–6.29.9.
- Iovanna J, Orelle B, Keim V, Dagorn JC (1991). Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem*; 266: 24664-24669
- Iovanna JL, Keim V, Nordback I, Montalto G, Camarena J, Letoublon C, Lévy P, Berthézène P, Dagorn JC. (1994) Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. Multicentric Study Group on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 106: 728-734
- Jackson LR, Trudel LJ, Fox JG, Lipman NS (1999). Monoclonal antibody production in murine ascites. II. Production characteristics. *Lab Anim Sci*. Feb;49(1):81-6.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science. The structure of a typical antibody molecule.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2005a). Part II. The Recognition of Antigen, *Immunobiology* 6th Ed. Garland Science. Publishing, New York.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2005b). Part IV. The Adaptive Immune Response. *Immunobiology* 6th Ed Garland Science Publishing, New York.
- Jeffrey KA (2014). Chapter 12 – Assessment of Immune Parameters and Immunodiagnostics. *Introductory Immunology Basic Concepts for Interdisciplinary Applications* Pages 135–152.

- John E, Coligan, A, Kruisbeek M (1997). *Current Protocols in Immunology* John Wiley & Sons, Inc.
- John RC (2009). *Methods in Molecular Biology, The ELISA Guidebook*. Second Edition. Humana Press, a part of Springer Science + Business Media.
- Johnston BA, Eisen H, Fry D (1991). An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab Anim Sci* 41:15-21.
- Katsumata N, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG (1995). Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. *Endocrinology* 136: 1332-1339.
- Keim V, Rohr G, Stöckert HG, Haberich FJ (1984). An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion*. 29: 242-249.
- Kodadek T (2002). Development Of Protein Detecting Microarrays And Related Devices. *Trends Biochem Sci*. 27: 295-300.
- Kohler G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497. doi:10.1038/256495a0
- Langer N, Steinicke F, Lindigkeit R, Ernst L, Beuerle T (2017). Determination of cross-reactivity of poly- and monoclonal antibodies for synthetic cannabinoids by direct SPR and ELISA. *Forensic Sci Int*. 280:25-34.
- Lasserre C, Christa L, Simon MT, Vernier P, Bréchet C (1992). A Novel Gene (HIP) Activated in Human Primary Liver Cancer. *Cancer Res* 52: 5089-5095.
- Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S (2001). Ulcerative Colitis And Crohn's Disease: Distinctive Gene Expression Profiles And Novel Susceptibility Candidate Genes. *Hum Mol Genet*; 10: 445-456.
- Leenaars M, Hendriksen M (2005). Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *Ilar J*.46:269 79.
- Leenaars P, Koedam M, Wester P, Baumans V, Claassen E, Hendriksen CF (1998). Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Lab Anim* 32:387406.
- Leenaars PP, Hendriksen CF, Koedam MA, Claassen I, Claassen E (1995). Comparison of adjuvants for immune potentiating properties and side effects in mice. *Vet Immunol Immunopath* 48:123-138.
- Lemus R, Karol MH (2008). Conjugation of Haptens. In: Jones MG, Lympany P. (eds) *Allergy Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Medicine*, vol 138. Humana Press.
- Leow CH, Fischer K, Leow CY, Cheng Q, Chuah C, McCarthy J (2017). Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors. *Diagnostics* 7, no. 4: 52.
- Lequin RM (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 51.12: 2415-2418. (Short review paper).
- Liddell E (2013). Chapter 3.1 – Antibodies. *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Pages 245-265.
- Liddell E, Cryer (1991). *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. John Wiley & Sons Ltd., New York.

- Lindblad EB (2000). Freund's adjuvants. In: O'Hagan DT, ed. *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Adjuvants—Preparation Methods and Research Protocols*. Totowa NJ: Humana Press. p 49-63
- Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R (2010). Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5), 480–499.
- Liu JKH (2014). The History of Monoclonal Antibody Development – Progress, Remaining Challenges And Future Innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113–116.
- Livesey FJ, O'Brien JA, Li M, Smith AG, Murphy LJ, Hunt SP (1997). A Schwann Cell Mitogen Accompanying Regeneration Of Motor Neurons. *Nature*; 390: 614-618.
- Loeb W, Quimby F (1999). *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. 2nd Edition. Philadelphia, PA: Taylor and Francis.
- Mats O, (1992). *Human Monoclonal Antibody Technology. A tool to Investigate Human Antibody Repertoires*. Department of Immunotechnology, Lund University, Lund, Sweden. Lund, ISBN 91-628- 0556-8.
- Mayer G (2017). *Immunoglobulins- Antigen-Antibody Reactions and Selected Tests*. Microbiology and Immunology On-line. University of South Carolina.
- McCulloch KC (1993). The application of biotechnology to the diagnosis and control of animal diseases, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 12 (2), 325-353.
- McKie AT, Simpson RJ, Ghosh S, Peters TJ, Farzaneh F (1996). Regulation of Pancreatitis-Associated Protein (HIP/PAP) mRNA Levels In Mouse Pancreas And Small Intestine. *Clin Sci (Lond)*; 91: 213-218.
- Milstein C (1999). The hybridoma Revolution: An Offshoot Of Basic Research. *BioEssays*. 21(11):966-73.2.
- Molina-Ruiz AM, Santonja C, Rütten A, Cerroni L, Kutzner H, Requena L (2015). Immunohistochemistry in the Diagnosis of Cutaneous Viral Infections—Part I. Cutaneous Viral Infections by Herpesviruses and Papillomaviruses. *American Journal of Dermatopathology*, 37(1): 1–14.
- Morel N, Volland H, Dano J, Lamourette P, Sylvestre P, Mock M, Créminon C (2012). Fast and Sensitive Detection of Bacillus anthracis Spores by Immunoassay. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6491–6498. <http://doi.org/10.1128/AEM.01282-12>
- Morioka K, Fukai K, Sakamoto K, Yoshida K, Kanno T (2014). Evaluation of Monoclonal Antibody-Based Sandwich Direct ELISA (MSD-ELISA) for Antigen Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus Using Clinical Samples. *PLoS One*, 9(4): e94143.
- Morisset J, Iovanna J, Grondin G (1997). Localization Of Rat Pancreatitis-Associated Protein During Bile Salt-Induced Pancreatitis. *Gastroenterology* 112: 543-550.
- Murphy K (2011). Garland Science. Book Janeway's Immunobiology 8th ed. ISBN: 9780815342434.
- Neil SL, Lynn RJ, Laura J.T, Frances Weis-Garcia (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources, *ILAR Journal*, Volume 46, Issue 3. Pages 258–268.
- Neil SG (2008). Immunoglobulin Function. *Clinical Immunology (Third Edition)*. Principles and Practice Pages 237–248.

- Neil SG, Lisa AC (2013). Immunoglobulin Function. *Clinical Immunology* (Fourth Edition) Pages 183-192.
- Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL (1992). Human Pancreatitis-Associated Protein. Messenger RNA Cloning And Expression In Pancreatic Diseases. *J Clin Invest* 90: 2284-2291.
- Ozturk M, de la Monte SM, Gross J, Wands JR (1989). Elevated levels of An Exocrine Pancreatic Secretory Protein in Alzheimer Disease Brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 419-42.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995). How to Measure And Predict The Molar Absorption Coefficient Of A Protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(11), 2411–2423.
- Page M, Thorpe R (2002). Immunogen Preparation and Immunization Procedures for Rats and Mice. In: Walker J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press.
- Pandey S (2010). Hybridoma Technology For Production Of Monoclonal Antibodies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1 (2): 88–94.
- Pelsue S (2018). Hybridoma Development: The Path to Identifying and Isolating a Specific Monoclonal Antibody. <http://mainebiotechnology.com/hybridoma-development-the-path-to-identifying-and-isolating-a-specific-monoclonal-antibody/> (erişim tarihi 18.03.2018).
- Pier G (2004). Antigen, Antigenicity, and Immunogenicity, p 185-206. *Immunology, Infection, and Immunity*. ASM Press, Washington, DC.
- Polley MJ, Cohen Z (2014). Antigen. In *AccessScience*. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.040600>
- Quinlan N, O’Kennedy R (1994). Enhanced Cloning efficiencies of Murine Hybridomas Using Human Plasma Supplemented Medium. *J Immunol Methods*. 171:253–258.
- Rath S, Stanley CM, Steward MW (1988). An inhibition enzyme immunoassay for estimating relative antibody affinity and affinity heterogeneity. *J Immunol Methods*. 106(2):245-9.
- Reid SM, Ferris NP, Brüning A, Hutchings GH, Kowalska Z, Akerbolm L (2001). Development of a Rapid Chromatographic Strip Test For The Pen-Side Detection Of Foot-And-Mouth Disease Virus Antigen. *Journal of Virological Methods*, 96, 189-202.
- Reverberi R, Reverberi L (2007). Factors Affecting The Antigen-Antibody Reaction. *Blood Transfusion*, 5(4), 227–240.
- Rojas R, Apodaca G (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 944-956.
- Ross LF (2008). Newborn Screening for Cystic Fibrosis: A Lesson in public health disparities. *The Journal of Pediatrics*, 153(3), 308–313.
- Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M (2002). Identification of hepatocarcinointestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 62: 1868-1875.

- Rudnick SI, Gregory PA (2009). Affinity and Avidity in Antibody-Based Tumor Targeting. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. Mary Ann Liebert, Inc.
- Sarles J, Barthelémy S, Ferec C, Iovanna J, Roussey M, Farriaux J, Dagorn J (1999). Blood Concentrations Of Pancreatitis Associated Protein In Neonates: Relevance To Neonatal Screening For Cystic Fibrosis. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 80(2), F118–F122.
- Sarles J, Berthezene P, LE Louarn C, SomMA C, Perini JM, Catheline M, Mirallie S, Luzet K, Roussey M, Farriaux JP, Berthelot J, Dagorn JC (2005). Combining Immunoreactive Trypsinogen And Pancreatitis-Associated Protein Assays, A Method Of Newborn Screening For Cystic Fibrosis That Avoids DNA Analysis. *J Pediatr*. 147: 302-305.
- Sarles J, Giorgi R, Berthézène P, Munck A, Cheillan D, Dagorn J, Roussey M (2014). Neonatal screening for cystic fibrosis: Comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 13, issue pp. 384-390.
- Schroeder HWJr, Cavacini L (2010). Structure and Function of Immunoglobulins”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125: S41- S52.
- Schunk KM, Macallum GE (2005). Applications and Optimization of Immunization Procedures, *ILAR Journal*, Volume 46, Issue 3, Pages 241–257.
- Shirahata S, Katakura Y, Teruya K (1998). Cell hybridization, hybridomas, and human hybridomas, *Laboratory of Cellular Regulation Technology. Methods in Cell Biology*, (57), 111-145.
- Shulman M, Wilde CD, Köhler G (1978). A Better Cell Line For Making Hybridomas Secreting Specific Antibodies *Nature* 276, 269–270.
- Siddiqui MZ (2010). Monoclonal Antibodies as Diagnostics; an Appraisal. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(1), 12–17.
- Simon MT, Pauloin A, Normand G, Lieu HT, Mouly H, Pivert G, Carnot F, Tralhao JG, Brechot C, Christa L (2003). HIP/PAP Stimulates Liver Regeneration After Partial Hepatectomy And Combines Mitogenic And Anti-Apoptotic Functions Through The PKA Signaling Pathway. *FASEB J*17: 1441-1450.
- Simpson RJ, Deenmamode J, McKie AT, Raja KB, Salisbury JR, Iancu TC, Peters TJ (1997). Time-Course Of Iron Overload And Biochemical, Histopathological And Ultrastructural Evidence Of Pancreatic Damage In Hypotransferrinaemic Mice. *Clin Sci (Lond)*; 93: 453-462.
- Sims EJ, Mugford M, Clark A, Aitken D, McCormick J, Mehta G, Mehta A (2007). UK Cystic Fibrosis Database Steering Committee (2007). Economic Implications Of Newborn Screening For Cystic Fibrosis: A Cost Of Illness Retrospective Cohort Study. *Lancet*.369(9568): 1187-95.
- Singh A, Chaudhary S, Agarwal A, Verma SA (2014). Chapter 15- Antibodies: Monoclonal and Polyclonal. *Animal Biotechnology*. Pages 265-287.
- Smith BT (2012). Introduction to Diagnostic and Therapeutic. *University of New Mexico Health Science Center*, 17 (0039): 1–34.
- Sommerburg O, Lindner M, Muckenthaler M (2010). Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not

- involve DNA testing in a Northern European population. *J Inher Metab Dis* 33(Suppl 2): 263.
- Sommerburg O, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, Happich M, Kulozik AE, Stopsack M, Gahr M, Hoffmann GF, Mall MA (2015). Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatr Pulmonol.* 50(7):655-64.
- Sommerburg O, Stahl M, Hammermann J, Okun JG, Kulozik A, Hoffmann G, Mall M (2017). Newborn Screening on Cystic Fibrosis in Germany: Comparison of the new Screening Protocol with an Alternative Protocol. *Klin Padiatr.* 229(2):59-66.
- Spencer CA (2017). Assay of Thyroid Hormones and Related Substances. [Updated 2017 Feb 20]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000
- Srikumaran S, Onisk DV, Borca MV, Nataraj C, Zamb T J (1990). Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1. *Immunology*, 70(3), 284–289.
- Srinivasan P, Ekanem E, Diouf A, Tonkin ML, Miura K, Boulanger MJ, Long CA, Narum DL & Miller LH (2014). Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 111(28): 10311–10316.
- Stewart S.J (2001). Monoclonal antibody production, In: *Basic methods in antibody production and characterization*, Howard G.C., Bethell D.R. (Eds.), CRC Press, LLC. USA, 2001: 51-67.
- Stills HF Jr, Bailey MQ. 1991. The use of Freund's complete adjuvant. *Lab Anim* 20:25-30.
- Stopsack M, Hammermann J (2011). Improved cut off combination for IRT and PAP in Newborn Screening for Cystic Fibrosis. In *Clinical Biochemistry*. 44 (7), 545.
- Strimbu K, Tavel JA (2010). What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <http://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>.
- Tachibana K, Marquardt H, Yokoya S, Friesen HG (1988). Growth hormone-releasing hormone stimulates and somatostatin inhibits the release of a novel protein by cultured rat pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 973-978.
- Tamborrini M, Holzer M, Seeberger PH, Schürch N & Pluschke G (2010). Anthrax spore detection by a luminex assay based on monoclonal antibodies that recognize anthrosecontaining oligosaccharides. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17 (9): 1446–1451.
- Vaccaro, MI, Calvo EL, Suburo AM, Sordelli DO, Lanosa G, Iovanna JL (2000). Lipopolysaccharide directly affects pancreatic acinar cells: implications on acute pancreatitis pathophysiology. *Dig Dis Sci* 45: 915-926.
- Van der Pijl JW, Boonstra JG, Barthellemy S, Smets YF, Hermans J, Bruijn JA, de Fijter JW, Daha MR, Dagorn JC (1997). Pancreatitis-associated protein: a putative marker for pancreas graft rejection. *Transplantation* 63: 995-1003.
- Van Horn L (2009). What do cancer, diabetes, and cardiovascular disease have in common? *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 1329.
- Van Regenmortel MH (2001). Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals*.29(3-4):209-13.

- Verma AK, Kumar A, Mahima, Sahzad (2012). Epidemiology and diagnosis of foot and mouth disease: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 82, 543-551.
- Wacoo AP, Wendiro D, Vuzi PC, Hawumba JF (2014). “Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops” *Journal of Applied Chemistry*, vol. 2014, Article ID 706291, 15 pages. doi:10.1155/2014/706291.
- Waller DF, Hew BE, Holdaway C, Jen M, Peckham GD (2016). Rapid Detection of *Bacillus anthracis* Spores Using Immunomagnetic Separation and Amperometry. *Biosensors*, 6(4), 61. <http://doi.org/10.3390/bios6040061>
- Weber B, Melchior W, Gehrke R (2001). Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol* 2001;64:312-9. 10.1002/jmv.1052.
- Weidler S, Stopsack K, Hammermann J, Sommerburg O, Mall M, Hoffmann G, Kohlmüller D, Okun J, Macek M, Votava F, Krulišová V, Balaščaková M, Skalická V, Lee-Kirsch M, Stopsack M (2016). A product of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screening. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15 (6) :752-758.
- Wols HAM (2006). Plasma Cells. DOI: 10.1038/npg.els.0004030
- Xie MJ, Motoo Y, Iovanna JL, Su SB, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N (2003). Overexpression of pancreatitis-associated protein (PAP) in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 48: 459-464.
- Yeo PPB, Lewis M, Evered D C (1977). Radioimmunoassay Of Free Thyroid Hormone Concentrations In The Investigation Of Thyroid Disease. *Clinical Endocrinology*, 6: 159–165.
- Yücel F, Benlioglu K, Çirakoglu B (1999). A Simple And Quick Way For Diagnosis of *Erwinia Amylovora*. 10.17660/ActaHortic.1999.489.1
- Zhang C (2012). Hybridoma Technology for the Generation of Monoclonal Antibodies. In: *Antibody Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 901. Humana Press, Totowa, NJ.
- Zumaquero-Ríos JL, García-Juarez J, De-la-RosaArana JL, Marcet R, Sarracent-Pérez J (2012). *Trichinella spiralis*: Monoclonal antibody against the muscular larvae for the detection of circulating and fecal antigens in experimentally infected rats. *Experimental Parasitology*, 132(4): 444–449.

ÖZGEÇMİŞ

Ilham BAHHAR 13 Haziran 1988 tarihinde Fas'ta doğmuştur. İlk, orta ve lise eğitimini 2006 yılında Kazablanka da (Fas) tamamlamıştır. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden bölüm 3.'sü olarak 2015 yılında mezun olduktan sonra aynı üniversitede aynı bölümde hayvansal biyoteknoloji ana bilim dalında yüksek lisans eğitimini başlamıştır. Bu süreç içerisinde TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Tanı Teknolojisi laboratuvarında 'Yeni Doğan Taramalarında Kistik Fibrozisin Erken Tanısı İçin Immunreaktif Tripsinojen (IRT) Ve Pankreatitle İlişkili Protein (PAP) ELİSA Kitlerinin Geliştirilmesi' adlı 1003 Projesi kapsamında bursiyer olarak çalışmıştır.

